

Егоров А.Н., Беленичев И.Ф., Соколик Е.П., Абрамов А.В., Снахи О.В.

СНИЖЕНИЕ АПОПТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ СА1 ЗОНЫ ГИППОКАМПА КРЫС В УСЛОВИЯХ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ И НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ЦЕРЕБРОКУРИНА И ТИОЦЕТАМА

Запорожский государственный медицинский университет, Украина

Реферат. Установлено, что пренатальная алкоголизация приводит к гиперпродукции NO и индукции нитрозирующего стресса в мозге новорожденных крысят, о чем свидетельствовало повышение нитротирозина в цитозоле и митохондриях. Регулируя соотношение митохондриальных/цитозольных концентраций NO и активных форм кислорода, цереброкурин и тиоцетам ограничивают действие этих соединений на активацию или депривацию процессов экспрессии генов, транскрипцию и трансляцию в нейрональных клетках мозга животных, перенесших ПА и, тем самым, возможно, обеспечивают нормальное развитие когнитивно-мнестических функций ЦНС. Повышение экспрессии белка Bcl-2 в группе животных, получавших тиоцетам и цереброкурин, свидетельствует об активации антиапоптотической защиты поврежденных нейронов.

Ключевые слова: пренатальная алкоголизация, цереброкурин, тиоцетам, СА-1 зона гиппокампа, апоптоз

Существует ряд заболеваний, при которых апоптозу принадлежит решающая роль в реализации механизма развития патологии [1]. В патогенезе многих нейродегенеративных заболеваний важную роль играет нарушение дыхательной функции митохондрий. Результатом этого является снижение содержания в клетках энергетических эквивалентов и последующее уменьшение образования глутатиона, возрастание уровня активных форм кислорода (АФК) и NO, что ведет к дальнейшему развитию апоптоза [2, 3]. В настоящее время нейроапоптоз рассматривается как одна из ведущих причин когнитивно-мнестических расстройств на фоне хронического алкоголизма. При этом наблюдается чрезмерная генерация АФК, и отмечается значительный дефицит в организме антиоксидантов [4]. Следует отметить, что возрастание внутриклеточного уровня АФК может быть вызвано стимуляцией рецепторов различных типов клеток фактором некроза опухоли- α (TNF- α), нарушением компенсаторных митохондриально-цитозольных шунтов энергии, метаболизмом этанола [5]. В настоящее время практически нет работ о медикаментозной коррекции нейроапоптоза при хронической алкогольной интоксикации [6]. Не существует и подходов к использованию нейропротекторов с антиапоптотическим действием в комплексной терапии пренатальной хронической алкоголизации. Нашими работами описаны нейропротективные эффекты цереброкурина, тиоцетама и пирарцетама при алкогольной энцефалопатии [7]. Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы явилась оценка антиапоптотического действия цереброкурина, тиоцетама и пирарцетама в условиях пренатальной алкогольной интоксикации.

Материалы и методы

Опыты проводили на самках белых крыс массой 150-180 г, полученных из питомника ГУ «Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины». Крысы с 5-го по 20-й день беременности получали

этанол в дозе 6-8 г/кг/день, контрольные крысы – изокалорический раствор сахарозы. Потомству алкоголизированных крыс сразу после рождения в течение 25 дней внутривбрюшинно вводили тиоцетам (125 мг/кг), пирарцетам (125 мг/кг) и цереброкурин (0,05 мл/кг), потомству крыс контрольной группы вводили физиологический раствор. В каждой группе было по 20 новорожденных. Биохимические исследования головного мозга проводили на 26-е сутки эксперимента, с этой целью животных декапитировали под тиопенталовым наркозом (30 мг/кг). Выделение митохондриальной и цитоплазматической фракций мозга проводили методом дифференциального центрифугирования методом Мак-Ильвейна и Роднайта.

Для иммуноферментных исследований ткань головного мозга гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора в солевой изотонической среде (0,15M KCl) на холоде в соотношении ткань-солевой раствор 1:20 [8]. Затем при той же температуре методом дифференциального центрифугирования на рефрижераторной центрифуге Sigma 3-30k (Германия) выделяли цитозольную и митохондриальную фракции. В митохондриальной и цитозольной фракциях головного мозга определяли содержание нитротирозина с помощью ELISA-набора NITROTYSOSINE фирмы HBT, который представляет собой твердофазный энзим-связывающий иммуносорбентный набор, работающий по принципу «сендвича». Для морфологических и гистоиммунохимических исследований ткань головного мозга экспериментальных животных помещали на сутки в фиксатор Буэна и после стандартной гистологической проводки ткань заключали в парапласт X-TRA, после чего на ротационном микротоме изготавливали срезы изучаемых отделов головного мозга толщиной 5 микрон (для морфометрических исследований) и 15 микрон (для гистоиммунохимических исследований) [9].

При изучении морфологии нейронов и глиоцитов для определения нуклеиновых кислот срезы окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону.

Определяли следующие показатели:

– плотность апоптотических и деструктивно измененных нейронов как количество клеток на 1мм² площади среза;

– клеточный состав СА-1 зоны гиппокампа в процентах [10].

Для гистоиммунохимического исследования использовали метод непрямой иммунофлюоресценции. Для определения интенсивности экспрессии антиапоптотического белка bcl-2 гистологические срезы выделяли из парапласта и

регидрировали, трижды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (рН=7,4) и в течение 30 минут инкубировали с 2н раствора соляной кислотой (Т=37°C). Затем в течение 24 часов инкубировали во влажной камере (Т=4-6°C) с первичными поликлональными антителами кроликов IgC (1:500) bcl-2 производства Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). После инкубации срезы четырежды по 5 минут отмывали фосфатным буфером (рН=7,4). Затем в течение 1 часа (Т=37°C) инкубировали с вторичными антителами козы к фрагменту IgG мыши, конъюгированными с флюоресцентным красителем (FITC) фирмы Sigma-Aldrich (кат. № F2266). После заключительной четырехкратной отмывки фосфатным буфером (рН=7,4) срезы заключали в глицерин-фосфатный буфер (9:1). На флюоресцентном микроскопе Axioskop (Zeiss, Germany) определяли интенсивность экспрессии bcl-2 по плотности bcl-2-позитивных клеток в срезах с помощью видеокамеры СОНУ-4922 (USA) и вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS -386 (Kontron Elektronik, Germany). Также определяли количественное содержание bcl-2 белков методом иммуноблоттинга, для чего выделение нейронов коры мозга проводилось в два этапа [11]. На первом этапе мозговая ткань дезинтегрировалась с целью получения клеточной суспензии, на втором — осуществлялось дифференциальное ультрацентрифугирование. Для приготовления белковых проб клетки собирали, отделяя их от субстрата смесью растворов трипсина и версена (1:1), трижды промывали в 10 мл холодного PBS, центрифугируя при 200 g в течение 5 минут. К клеточному осадку добавляли 100 мкл лизирующего буфера, состоящего из 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 0,5 % Тритона X-100, 2 мМ EDTA и 1 мМ PMSF (производство Sigma, США). Экстракты центрифугировали при 8000 g в течение 10 минут, отбирали супернатант и измеряли в нем концентрацию общего белка по методу Бредфорд (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лаэммли (Laemmli, 1970). После перенесения белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану ее инкубировали в течение 1 ч с моноклональными антителами к bcl-2 и вторичными антителами против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченными пероксидазой хрена (Sigma, США).

Результаты представлены в виде выборочного среднего значения и стандартной ошибки среднего значения. Достоверность отличий между экспериментальными группами проводили при помощи непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95% ($p < 0,05$). Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета лицензионной программы «STATISTICA for Windows 6.1» (StatSoft Inc., № AXX R712D833214SAN5), а также «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003».

Результаты и обсуждение

Нашими исследованиями было установлено, что пренатальная алкоголизация (ПА) приводит к гиперпродукции NO и индукции нитрозирующего стресса в мозге новорожденных крысят, о чем свидетельствовало повышение нитротирозина в цитозоле

Таблица 1. Влияние исследуемых препаратов на содержание нитротирозина в головном мозге животных, перенесших пренатальную хроническую алкоголизацию

Экспериментальные группы	Нитротирозин в цитозольной фракции головного мозга, нмоль/г белка	Нитротирозин в митохондриальной фракции головного мозга, нмоль/г белка
Интakтная	32,1±1,5	10,0±0,5
Контрольная (ПА)	87,2±4,8	37,2±1,8
ПА+цереброкурин	61,4±1,3*#	21,1±1,2*#
ПА+тиоцетам	41,1±2,1*#	16,0±1,4*#
ПА+пирацетам	85,0±3,5	30,7±1,3

Примечание: * — $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; # — $p \leq 0,05$ по отношению к группе, которая получала пирацетам, где ПА — пренатальная алкоголизация

и митохондриях на 63% и 73%, соответственно, в группе контроля по сравнению с интактной группой (табл. 1). Высокореактивные дериваты NO, по мнению многих авторов и нашим данным, являются мощными индукторами нейроапоптоза [12]. NO и пероксинитрит, участвуя в S-нитрозилировании, играют не последнюю роль в посттрансляционной модификации каспаз. При этом радикальная группа NO переносится на цистеин активного центра каспаз с образованием группы R-S-NO [13].

Проводимая экспериментальная терапия с 1 по 25 сутки жизни животных, перенесших ПА, приводила к снижению уровня нитротирозина как в митохондриях, так и цитозоле мозга крысят. Как видно из таблицы 1, наибольшая депрессия этого маркера нитрозирующего стресса регистрировалась в группах, получавших тиоцетам (53% — цитозольная и 57% — митохондриальная фракции) и цереброкурин (29% — цитозольная и 43% — митохондриальная фракции) по сравнению с группой нелеченных животных и с группой, которой вводили пирацетам. Полученные данные согласуются с нашими предыдущими работами, которыми показана высокая антиоксидантная активность тиоцетама и цереброкурина [14]. Регулируя соотношение митохондриальных/цитозольных концентраций NO и АФК, цереброкурин и тиоцетам ограничивают действие этих соединений на активацию или депривацию процессов экспрессии генов, транскрипцию и трансляцию в нейрональных клетках мозга животных, перенесших ПА и, тем самым, возможно, обеспечивают нормальное развитие когнитивно-мнестических функций ЦНС [15]. Торможение реакций нитрозирующего стресса после проводимой терапии и снижение проапоптотического пероксинитрита (ONOO-), по всей видимости, способствует торможению нейроапоптоза [16].

Так, гистоиммунохимические исследования показали, что у животных, перенесших ПА на 25 сутки жизни, плотность bcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа была достоверно ниже (88%), чем у крыс интактной группы (табл. 2).

Таблица 2. Влияние исследуемых препаратов на плотность Vcl-2-позитивных нейронов СА-1 зоны гиппокампа животных, перенесших пренатальную хроническую алкоголизацию

Группы животных	Плотность Vcl-2-позитивных нейронов в 1 мм ²
Интактная	211,8±17,0
Контрольная (ПА)	112,2±10,8
ПА+цереброкурин	235,7±21,7*#
ПА+тиоцетам	198,5±11,0*#
ПА+пирацетам	114,0±12,5

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе, которая получала пирацетам, где ПА – пренатальная алкоголизация

Введение цереброкурина и тиоцетама животным, перенесшим ПА, с 1 по 25 сутки жизни привело к достоверному повышению плотности bcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа леченных животных на 111% и 77%, соответственно, по сравнению с контрольной группой животных. В группе контроля на фоне алкоголизации нами впервые было определено методом иммуноблоттинга снижение экспрессии антиапоптотического белка Vcl-2 у животных, перенесших ПА. Считают, что Vcl-2 является металлосодействующим белком, тушителем свободных радикалов, который тормозит развитие апоптоза. Белок bcl-2 предотвращает гибель клетки и функционирует как внутриклеточный антиоксидант. Проведенный недавно анализ белков семейства гена bcl-2 выявил сложную сеть реакций, регулирующих апоптоз. Внутри семейства гена bcl-2 одни участники могли подавлять апоптоз, а другие – вызывать его [17]. Среди белков, кодируемых генами этого семейства, Vcl-2 и Vcl-x1 действовали как репрессоры клеточной гибели, в то время как Вах и альтернативный продукт Vcl-x вызывали гибель клетки [18]. Если Вах преобладал над Vcl, то он препятствовал подавляющему воздействию Vcl-2 на апоптоз. Таким образом, баланс между молекулами Vcl-2, Вах Vcl-xL/S может определять судьбу нейроцитов при действии цитотоксических агентов или стресса. Известно, что пероксинитрит понижает уровень экспрессии bcl-2. Морфометрические исследования выявили в СА-1 зоне гиппокампа животных, перенесших ПА, появление апоптотически и деструктивно измененных нейронов.

Таблица 4. Экспрессия белка Vcl-2 в головном мозге животных, перенесших пренатальную хроническую алкоголизацию

Группа животных	Общий белок, грамм	Площадь, мм ²	Оптическая концентрация, усл.ед.	Оптическое содержание, усл.ед.
Интактная	4,8±0,02	58,27±1,1	0,17±0,001	6,81±0,21
Контрольная (ПА)	4,9±0,01	57,32±1,2	0,05±0,01	0,89±0,07
ПА+цереброкурин	4,8±0,01	60,52±1,0	0,19±0,002*#	7,83±0,10*#
ПА+тиоцетам	4,9±0,01	59,77±1,2	0,15±0,002*#	5,12±0,11*#
ПА+пирацетам	4,8±0,01	57,32±1,3	0,06±0,01*	0,97±0,07*

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе, которая получала пирацетам, ПА – пренатальная алкоголизация

Таблица 3. Влияние исследуемых препаратов на плотность апоптотически/деструктивно измененных нейронов СА-1 зоны гиппокампа животных, перенесших пренатальную хроническую алкоголизацию

Экспериментальные группы	Плотность клеток на 1 мм ²	Процент апоптотически измененных клеток
Интактная	3,07±0,08	1,07±0,08
Контрольная (ПА)	11,23±0,10	7,7±0,31
ПА+цереброкурин	2,82±0,10*#	1,00±0,07*#
ПА+тиоцетам	3,67±0,12*#	1,78±0,12*#
ПА+пирацетам	9,58±0,34	6,28±0,31

Примечание: * – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю; # – $p \leq 0,05$ по отношению к группе, которая получала пирацетам, где ПА – пренатальная алкоголизация

Введение цереброкурина и тиоцетама с 1 по 25 сутки жизни животным, перенесшим ПА, обеспечивало достоверное снижение апоптотических и деструктивно измененных нейронов СА-1 зоны гиппокампа на 87% и 77%, соответственно, по сравнению с группой контроля и группой животных, получавших пирацетам (табл. 3).

Введение цереброкурина и тиоцетама с 1 по 25 сутки жизни животным, перенесшим ПА, достоверно повышало плотность Vcl-2-позитивных нейронов в СА-1 зоне гиппокампа по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей по такой же схеме пирацетам. Также нами было установлено, что курсовое введение цереброкурина и тиоцетама достоверно повышает концентрацию Vcl-2 в тканях мозга экспериментальных животных. Повышение экспрессии белка Vcl-2 в группе животных, получавших тиоцетам и цереброкурин, свидетельствует об активации антиапоптотической защиты поврежденных нейронов (табл. 4).

Экспрессия белка Vcl-2 под действием тиоцетама и цереброкурина подавляла нитрозирующий стресс и апоптоз, индуцированные действием этилового спирта. Цереброкурин подавлял все проявления апоптоза (продукцию АФК, фрагментацию ядра нейронов СА-1 зоны гиппокампа, уменьшение количества апоптотически измененных клеток) на фоне гиперэкспрессии Vcl-2 (рисунки) и по силе антиапоптотического действия достоверно превосходил тиоцетам и пирацетам.

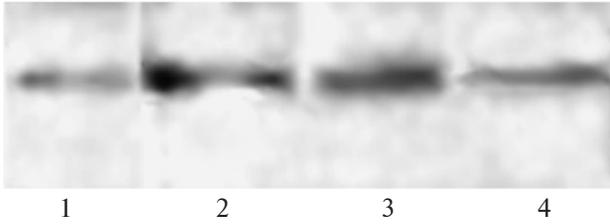


Рисунок. Экспрессия белка Bcl-2 в головном мозге крыс (электрофорезграмма): 1 — контроль; 2 — интакт; 3 — введение цереброкурина; 4 — введение тиоцетама

Антиапоптотический механизм нейропротективного действия тиоцетама обусловлен способностью его составляющего компонента (3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата) снижать раннюю NO-инициацию апоптоза, выступая сквенджером цитотоксических высокореактивных дериватов NO [19].

Кроме того, тиоцетам способен регулировать синтез белка и Red/Oxi-зависимую экспрессию глобальных факторов транскрипции, которые принимают участие в процессах памяти, а также повышать скорость оборота информационных макромолекул, защищая их структуры от окислительной модификации, проявляет энерготропное действие и за счет этого модулирует уровень Bcl-2 в нейронах [20].

Однако, как видно из полученных результатов, доминирование NO-зависимых механизмов нейроапоптотического действия не обеспечивает тиоцетаму высокую антиапоптотическую активность, характерную для цереброкурина. Дело в том, что механизм антиапоптотического действия цереброкурина, по нашему мнению, связан с его способностью воздействовать на геном нейронов в экстремальном состоянии, а именно: усиливать экспрессию глобального фактора транскрипции AP-1, усиливать экспрессию антиапоптотического белка Bcl-2, а также интенсифицировать синтез ключевых ферментов антиоксидантной защиты — Zn-Cu -СОД и Mn-СОД, экспрессию глутатион-зависимых ферментов. Кроме того, по некоторым данным, которые совпадают с нашими предыдущими исследованиями, цереброкурин модулирует активность митохондриальной NO-синтазы, тем самым ограничивая интенсивность нитрозирующего стресса, в результате чего также ингибируется нейроапоптоз [21]. Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что классик ноотропной терапии пирацетам не подавляет нейроапоптоз, возникающий вследствие ПА, комбинированный нейрометаболический церебропротектор тиоцетам проявляет антиапоптотическое действие за счет антиоксидантного механизма, а наиболее выраженным антиапоптотическим действием обладает нейротрофический церебропротектор цереброкурин, усиливающий экспрессию антиапоптотических белков и тормозящий Red/Oxi-зависимые механизмы нейроапоптоза. Полученные результаты являются экспериментальным обоснованием для клинического применения тиоцетама и цереброкурина в комплексной поэтапной терапии поражений ЦНС вследствие пренатального алкоголизма.

A.N. Egorov, I.F. Belenichev, E.P. Sokolik,
A.V. Abramov, O.V. Spahi

Reduction of Apoptosis Death of Neurons CA-1 Zone of Hippocampus of Rats in Conditions of Prenatal Chronic Alcoholisation by Therapy of Cerebrocurin and Tiocetam

Prenatal alcoholism leads to increase NO induction and nitrosine stress in the brain of a newborn rats, evidenced by the increase of nitrotyrosine in cytosole and mitochondria. By adjusting the ratio of mitochondrial/cytosole concentrations of NO and reactive oxygen forms, cerebrocurin and tiocetam limit the effect of these compounds on the activation or deprivation of the processes of gene expression, transcription and translation in neuronal cells of brain of animals that survived the prenatal alcoholism and, thus, may provide the normal development of the cognitive functions of central nervous system. Increased expression of the protein Bcl-2 in the group of animals receiving cerebrocurin and tiocetam, testifies to the activation antiapoptosis protection of damaged neurons. (Neuroscience: Theor. Clin. Asp. — 2012. — Vol. 8, № 2. — P. 145-149).

Key words: prenatal alcoholism, cerebrocurin, tiocetam, CA-1 zone of hippocampus, apoptosis

О.М. Егоров, І.Ф. Беленічев, О.П. Соколик,
А.В. Абрамов, О.В. Спахі

Зниження апоптичної загибелі нейронів СА-1 зони гіпокампу щурів в умовах пренатальної хронічної алкоголізації та на тлі введення цереброкуруну і тиоцетама

Встановлено, що пренатальна алкоголізація призводить до гіперпродукції NO та індукції нитрозуючого стресу в мозку новонароджених щурів, про що свідчило підвищення нітротирозиу в цитозолі та мітохондріях. Регулюючі співвідношення мітохондріальних/цитозольних концентрацій NO та активних форм кисню, цереброкурин і тиоцетам обмежують дію цих сполук на активацію або депривацію процесів експресії генів, транскрипцію і трансляцію в нейрональних клітинах мозку тварин, які перенесли ПА і, тим самим, можливо, забезпечують нормальний розвиток когнітивно-мнестичних функцій ЦНС. Підвищення експресії білка Bcl-2 у групі тварин, які отримували тиоцетам і цереброкурин, свідчить про активацію антиапоптотичного захисту пошкоджених нейронів. (Нейронауки: теор. клін. асп.— 2012. — Т. 8, № 2. — С. 145-149).

Ключові слова: пренатальна алкоголізація, цереброкурин, тиоцетам, СА-1 зона гіпокампу, апоптоз

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Kashihara N.* Implication of apoptosis in progression of renal disease / N. Kashihara, H. Sugiyama, H. Makino // *Contrib. Nephrol.* — 2003. — Vol. 139:156-172.
2. *Liaudet L.* Biology of nitric oxide signaling / L. Liaudet, F.G. Soriano, C. Szabo // *Crit. Care Med.* — 2000. — Vol. 28(Suppl). — P.37-52.
3. *Bauer G.* Reactive oxygen and nitrogen species: Efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis / G. Bauer // *Anticancer Res.* — 2000. — Vol. 20. — P.4115-4139.
4. *Chertin B.* The role of nitric oxide in reflux nephropathy / B. Chertin, U. Rolle, H. Farkas // *Pediatr. Surg. Int.* — 2002. — Vol. 18. — P. 630-634.
5. *Кричевская О.А.* Фактор некроза опухоли и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клиническое и патогенетическое значение / О.А. Кричевская, Н.Г. Ключкина, Е.Н. Александрова // *Науч.-практ. ревматология.* — 2005. — № 2. — С. 43-46.

6. *Рациональная нейропротекция* /И.Ф. Беленичев, В.И. Черный, Ю.М. Колесник [и др.] / — Донецк : Изд-ль Заславский А.Ю. — 2009. — С. 41–49.
7. *Влияние тиоцетама на показатели энергетического метаболизма и сопряженного с ним гамк-шунта в головном мозге потомства, рожденного от алкогользависимых матерей* /И.Ф. Беленичев, Е.О. Фильянский, С.В. Павлов [и др.] / Запорожский медицинский журнал. — 2010. — Том 12, №5. — С. 127-130.
8. *Теория и практика иммуноферментного анализа* / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев [и др.] / : Учебное пособие. — 2007.
9. *You H.X. Atomic force microscopy imaging of living cells: progress, problems and prospects* / H.X. You, L. Yu // *Methods Cell Sci.* — 1999. — Vol. 21, № 1. — P. 1–17.
10. *Герштейн Л.М.* Морфохимические особенности нейронов гиппокампа у крыс, различающихся по поведению / Л.М. Герштейн, И.М. Корнева, В.И. Рахманова // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* —2007. — Т. 144, №12. — С. 696–698.
11. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. Текст / Г.Г. Автандилов. — М: Медицина 1990. — 384 с.
12. *Буреш Я.* Методики и основание эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. М. Хьюстон // — М.: Высш. шк., 1991. — 400 с.
13. *Милош Т.С.* NO-зависимые механизмы дисфункции эндотелия — фактор патогенеза нарушений у потомства при экспериментальном введении липополисахарида / Т. С. Милош, Н. Е. Максимович // *Медицинский журнал.* — 2007. — С. 78-80.
14. *Егоров О.М.* Состояние глутатионовой системы головного мозга пренатально алкоголизированных крыс на фоне курсового назначения цереброкурина и тиоцетама / О.М. Егоров, И.Ф. Беленичев, О.П. Соколик // *Фармакология и врачебная токсикология.* — 2012. — С. 27-36. 2012. — №2. —С.27-36.
15. *Granger D.N.* Nitric oxide as antiinflammatory agent / D.N. Granger, P. Kubes // *Methods in Enzymology.* — 1996. — Vol. 269. — P. 434-442.
16. *Rice-Evans C.A.* Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research / C.A. Rice-Evans, A.T. Diplock, M.C.R. Symons // *Amsterdam-London-New York-Tokyo: Elsevier, 1991.* — 291p.
17. *Барышников А.Ю.* Иммунологические проблемы апоптоза./ А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин // *Эдиториал УРСС, М.* — 2002.
18. *Adams J.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen / J. Adams, P.J. Carder, S. Downey // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60 (II). — P. 2898-2905.
19. *Ahmad S.* Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells / S. Ahmad, N. Singh, R.I. Glazer // *Biochem. Pharmacol.* — 1999. — Vol. 58 (3). — P. 425-430.
20. *Al-Moundhri M.* Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer / M. Al-Moundhri, V. Nirmala, K. Al-Mawaly // *Pathol. Oncol. Res.* — 2003. — Vol. 9 (4). — P. 226-231.
21. *Altiok S.* Heregulin induces phosphorylation of BRCA1 through phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT in breast cancer cells / S. Altiok, D. Batt, N. Altiok // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274 (45). — P. 32274–32278.

Надійшла до редакції: 07.09.2012 р.