

УДК 577.152.315

МЕЛАТОНИН УЛУЧШАЕТ СНИЖЕННУЮ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАННЫХ АТФаз И СОХРАНЯЕТ УЛЬТРАСТРУКТУРУ СЕРОГО И БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА В МОДЕЛИ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

© 2021 М. Тунсер^{1*}, Б. Пехливаноглу¹, С.Х. Суруджу², Т. Исбир³

¹ Department of Physiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey;
E-mail: metuncer@hacettepe.edu.tr; tuncermeltem@gmail.com

² Department of Anatomy, Koç University School of Medicine, 34450 Istanbul, Turkey

³ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Yeditepe University, 34755 Istanbul, Turkey

Поступила в редакцию 11.11.2020

После доработки 22.03.2021

Принята к публикации 28.03.2021

Ишемия/реперфузия (И/Р) является одной из наиболее частых неврологических проблем, и раннее вмешательство имеет решающее значение для снижения повреждений, уменьшения уровня смертности и заболеваемости. Основываясь на сообщениях о благотворном влиянии мелатонина, мы исследовали его влияние на активность $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы, а также на ультраструктуру серого и белого вещества переднего мозга крыс в И/Р-модели. Взрослые крысы-альбиносы линии Wistar ($n = 78$) были случайным образом разделены на группы: контрольная, ишемия (И), ишемия/реперфузия (И/Р), группы с низкой (И/Р + мелатонин 400 мкг/кг), умеренной (И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг) и высокой (И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг) дозой мелатонина. Были проведены двухсосудистая окклюзия в сочетании с гипотонией (15 мин), индуцированной ишемией, и реперфузия (75 мин), достигнутая реинфузией крови. Была исследована активность мембраносвязанных ферментов, уровень малонового диальдегида в мозге и ультраструктура мозгового вещества в лобно-теменной коре. Мелатонин дозозависимо снижает выработку малонового диальдегида. Активность ферментов, ослабленная при И и И/Р, повышалась при введении мелатонина. И и И/Р серьёзно нарушали морфологию серого и белого мозгового вещества. Мелатонин во всех применяемых дозах уменьшал повреждения ультраструктуры как в сером, так и в белом веществе. Благоприятное действие мелатонина можно объяснить его антиоксидантными свойствами, предполагающими, что он может быть перспективным нейропротекторным агентом против повреждений, вызванных И/Р, эффективным как для серого, так и для белого вещества благодаря благоприятным биологическим свойствам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: малоновый диальдегид, мелатонин, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФаза, реперфузионное повреждение.

DOI: 10.31857/S0320972521050079

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия/реперфузия (И/Р) головного мозга, широко известная как инсульт, имеет разрушительные патологические, физиологические и поведенческие последствия и занимает лидирующее место по уровню заболеваемости и смертности во всем мире [1]. В повреждении мозга, вызванном И/Р, участвует ряд взаимосвязанных биохимических событий [2, 3]. В основном длительная ишемия мозга снижает уровень аденозинтрифосфата (АТФ) и понижает внутриклеточный рН из-за окислительного стресса и истощения субстрата и энергии. Эти ожидаемые условия нарушают активность мембраносвязанных АТФаз и зависимых от АТФаз механизмов транспорта ионов, что приводит к повышению внутриклеточного и митохондриального уровня кальция и, как следствие, гибели клеток по различным механизмам [4]. При реперфузии активные формы кислорода и провоспалительные нейтрофилы проникают в ишемизированные ткани с последующим высвобождением различных цитокинов и активацией микроглии и астроцитов, инициируя раннюю воспалительную реакцию и усугубляя ишемическое повреждение [4–8]. Хотя используются различные терапевтические агенты, действующие на различные мишени, показатели смертности и неврологических дисфункций после И/Р-повреждений

Принятые сокращения: И/Р – ишемия/реперфузия; МДА – малоновый диальдегид; САД – среднее артериальное давление; ЭЭГ – электроэнцефалография; Pi – неорганический фосфат.

* Адресат для корреспонденции.

всё ещё высоки, что указывает на постоянную потребность в разработке новых методов лечения.

Мелатонин (N-ацил-5-метокситриптами́н), эндогенный гормон пинеальной железы, синтезируемый N-ацетилированием из серотонина, обладает мощным антиоксидантным, антиапоптотическим и противовоспалительным действием в головном мозге через рецепторы, сопряжённые с G-белком, и ядерные мембранные рецепторы [9]. Недавние исследования показывают, что мелатонин проявляет защитное действие против И/Р-повреждений в различных тканях, включая мозг, с помощью нескольких механизмов, таких как снижение стресса эндоплазматического ретикулума, стимуляция выработки АТФ в митохондриях и модуляция внутриклеточного гомеостаза кальция [9–12]. На животных моделях было также показано, что мелатонин уменьшает повреждения серого и белого вещества, вызванные церебральной ишемией [13]. Известно, что экзогенный мелатонин модулирует активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы в эритроцитах человека и предотвращает острое этанол-индуцированное ингибирование Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы в синапсах крыс [14], а также обращает вспять влияние И/Р на активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы при интрацеребровентрикулярном применении в 24-часовой реперфузии [15]. Однако о его остром влиянии на активность АТФазы мозга во время И/Р-повреждений не сообщалось. Необходимо выявить все возможные действия мелатонина при И/Р-повреждениях головного мозга для повышения его потенциала в качестве защитного и терапевтического средства при ишемическом инсульте.

Исходя из этого, мы предположили, что мелатонин защищает как серое, так и белое вещество мозга от И/Р-повреждений путём улучшения окислительного статуса и активности мембранных АТФаз. Поэтому мы поставили перед собой цель оценить потенциальное влияние мелатонина на активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы, а также на ультраструктуру серого и белого вещества в И/Р-модели мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и экспериментальный план. В это исследование были включены 78 самцов крыс-альбиносов линии Wistar (1–16 недель, 200–250 г). Протокол эксперимента был одобрен Этическим комитетом по исследованиям на животных Университета Хаджеттепе (Hacettepe

University; Разрешение № 2018/68-07). Все эксперименты на животных проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Крыс содержали в индивидуальных плексигласовых клетках при 12/12-часовом цикле свет/темнота и постоянной температуре ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности ($55 \pm 10\%$). Животные имели свободный доступ к стандартной лабораторной пище и воде.

Животные были случайным образом разделены на шесть экспериментальных групп в соответствии с числами, сгенерированными компьютером: контроль (фиктивная операция, $n = 15$), ишемия (И, $n = 13$), ишемия/реперфузия (И/Р, $n = 13$), низкая доза мелатонина (И/Р + мелатонин 400 мкг/кг массы тела, $n = 12$), умеренная доза мелатонина (И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг, $n = 13$) и высокая доза мелатонина (И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг, $n = 12$). Для морфологического исследования было отобрано по пять животных из каждой группы. Животным давали возможность адаптироваться к лабораторным условиям (обращение, содержание и т.д.) в течение недели, а затем использовали в порядке прибытия в лабораторию, который описан ниже в протоколе эксперимента. Ни одно из животных не было исключено из исследования. Эксперименты начинали всегда в 9:00 и заканчивали в 12:00. Исследователи, проводившие структурный, биохимический и статистический анализ, не знали, с какой из исследуемых групп они имели дело, за исключением тех, кто выполнял хирургические операции.

Анестезия и хирургическая операция. Все животные были анестезированы 25%-ным уретаном («Urethane, ВР63 Synthetic», Дания) (1,2–1,4 г/кг, внутривентрикулярная инъекция). Этот анестетик предпочтителен из-за его благоприятного действия в моделях ишемии/реперфузии, он демонстрирует минимальное вмешательство в протокол [16]. Платиновые дисковые электроды помещали подкожно на теменные области с двух сторон и на носовую кость в качестве эталона, и все они были подключены к полиграфу («Grass Model 7 Polygraph», США) для записи электроэнцефалографии (ЭЭГ). Черепную и ректальную температуры измеряли с помощью термозондов («YSI 409B» и «YSI 401», США), подключённых к телетермометру («YSI Tele-thermometer 41TA», США) в качестве индикаторов температуры мозга и тела. Обе температуры поддерживали стабильными на уровне $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ с помощью нагревательной лампы. Трахею интубировали, и проводили искусствен-

ное дыхание с помощью респиратора для мелких животных с положительным давлением («В. Braun Apparatebau, Melsungen», Германия).

Верхнюю полую вену катетеризировали для внутривенного введения препарата и манипулирования объёмом крови. Правую бедренную артерию отделяли от связанной вены и нерва и канюлировали предварительно гепаринизированным катетером для непрерывного контроля артериального давления. Он был прикреплён к датчику давления («Statham Laboratories», «Physical Pressure Transducer P23AA», Пуэрто-Рико) и подключён к полиграфу. После того, как все приборы были присоединены, правая и левая общие сонные артерии были изолированы. Их подвешивали хирургическими шёлковыми нитями, пропущенными через крошечные стеклянные трубочки, и готовили к облитерации, как в модели окклюзии с двумя сосудами, описанной Smith et al. [17], за исключением группы фиктивных операций, где артерии обнажали только на соответствующее время. По завершении хирургических процедур животным давали стабилизироваться в течение 30 мин.

Глубину анестезии контролировали каждые пять минут в течение всего эксперимента, и при необходимости вводили дополнительную дозу анестетика.

Ишемия и реперфузия переднего мозга. Ишемия переднего мозга была вызвана окклюзией двух общих сонных артерий в сочетании с системной гипотензией [17]. Перед ишемией среднее артериальное давление (САД) снижали до 80 мм рт. ст., чтобы предотвратить ауторегуляторное повышение. Кровоток в общих сонных артериях был прерван, и САД снижалось до 35 мм рт. ст. за счёт забора крови. Снижение активности ЭЭГ указывало на начало ишемического периода. Отобранную кровь (всего 3–4 мл) до реинфузии хранили в гепаринизированном шприце при температуре 37 °С. Во время ишемии САД поддерживали постоянным за счёт забора крови и реинфузии, когда это было необходимо. На 14 минуте ишемии САД повысили до 80 мм рт. ст. реинфузией крови. Реперфузию начинали через 15 мин ишемии после визуализации кровотока, остаток крови вводили в течение 15–30 сек, и подтверждали изменение активности ЭЭГ. Мелатонин («Sigma-Aldrich», США), растворенный в абсолютном этаноле, разводили в физиологическом растворе до конечной концентрации этанола 1% и вводили внутривенно в первую минуту реперфузии в дозах 400, 1200 или 2400 мкг/кг массы тела или носителя. Объём инъекции составлял 1 мл/кг массы тела. Гидрокарбонат натрия («Drogsan», Турция) вводили внутривенно (50 мг/кг) для про-

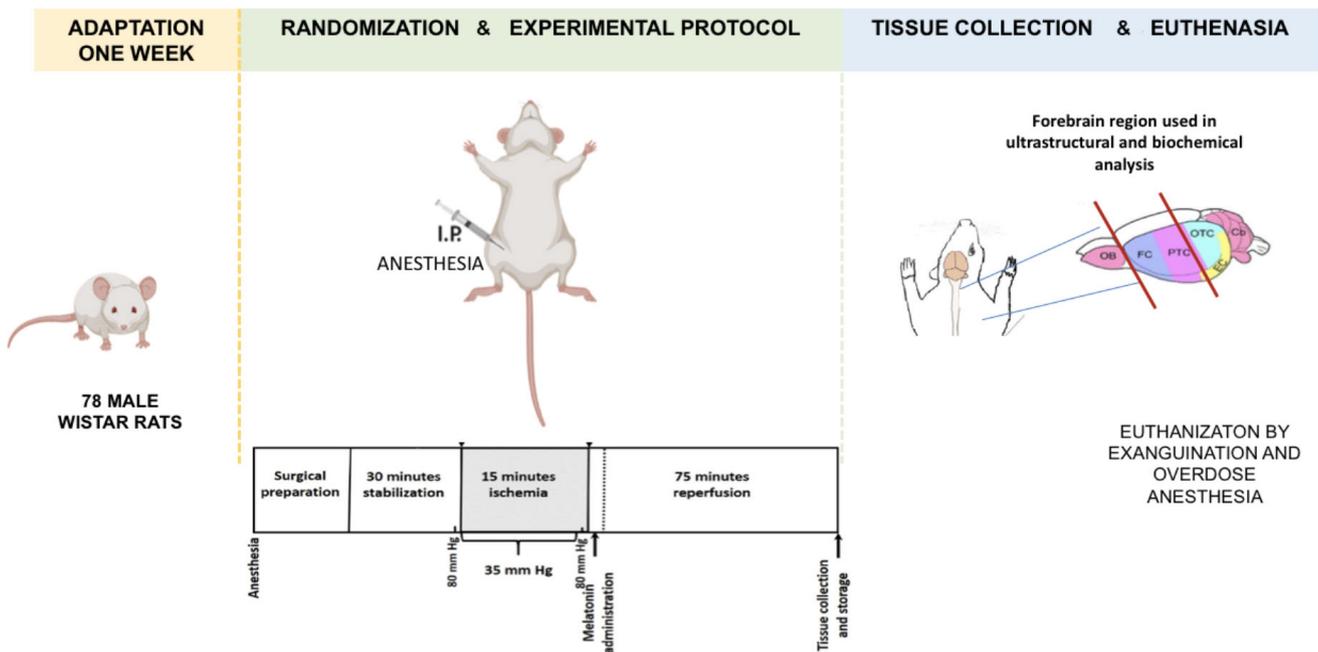


Рис. 1. План эксперимента. Временная шкала эксперимента, представляющая модель, использованную в исследовании. Принятые сокращения: ОВ (olfactory bulb) – обонятельная луковица; FC (frontal cortex) – лобная кора; PFC (parietal-temporal cortex) – теменно-височная кора; ОТС (occipital-temporal cortex) – затылочно-височная кора; Сb (cerebellum) – мозжечок; ЕС (entorhinal cortex) – энторинальная кора. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

филактики ацидоза, если это было необходимо. Реперфузию продолжали в течение 75 мин, параллельно вводили 0,9% NaCl для коррекции САД. Протокол эксперимента показан в виде схематической диаграммы на рис. 1.

Вскрытие мозга и завершение экспериментов по биохимическим измерениям. После реперфузии мозг и мозжечок осторожно извлекали. Для выделения переднего мозга полушария разрезали коронарно на 1–2 мм позади задней центральной извилины (рис. 1), а лобно-теменно-височную кору помещали в жидкий азот и хранили при температуре -80°C до использования в биохимических исследованиях. Вся процедура вскрытия завершалась менее чем за 5 мин, эксперименты прекращали передозировкой анестезии и обескровливанием.

Измерение перекисного окисления липидов в головном мозге. Для оценки перекисного окисления липидов мозга использовали уровень реактивных соединений тиобарбитуровой кислоты. Малоновый диальдегид (МДА), общий индикатор степени реакции перекисного окисления, является продуктом перекисного окисления липидов, который реагирует с тиобарбитуровой кислотой с образованием красных час-

тиц, поглощающих при длине волны 535 нм. Все ткани мозга были извлечены при температуре -20°C за день до анализа, разрезаны на мелкие кусочки с помощью ножниц и гомогенизированы (2 мин при 5000 об./мин) в 10 объёмах (1/10, w/v) охлаждённого во льду буфера Tris-HCl (50 мМ, pH 7,4) с использованием стеклянного гомогенизатора с тефлоновым пестиком. К образцу мозга (менее 0,2 мл 10%-ного (w/v) гомогената ткани) добавляли 0,2 мл 8,1% додецилсульфата натрия и 1/5 (w/v) водного раствора тиобарбитуровой кислоты. Объём смеси доводили до 4 мл дистиллированной водой и нагревали на масляной бане при 95°C в течение 60 мин. После охлаждения водопроводной водой к образцу добавляли 1 мл дистиллированной воды вместе с 5 мл смеси N-бутанол/пиридин (15/1, v/v), затем энергично встряхивали. После центрифугирования при 4000 об./мин в течение 10 мин органический слой отделяли, и измеряли его поглощение при 535 нм на спектрофотометре «Gilford 250» («Gilford Instrument Laboratories, Inc.», США). Тетраметоксипропан использовали в качестве внешнего стандарта, а уровень перекисей липидов выражали в нмоль МДА на г влажной ткани [18].

Активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы. За сутки до биохимического анализа температуру всех тканей головного мозга довели до -20°C . 10%-ный тканевый гомогенат готовили в 0,3 М сахарозе, содержащей 1 мМ магния, с помощью тефлонового пестика с зазором 0,25–0,38 мм при 1000 об./мин. АТФазную активность полученных супернатантов определяли путём измерения скорости высвобождения неорганического фосфата (Pi) из Na_2ATP [19]. Инкубационная среда была приготовлена, как описано ранее [20]: для Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы среда содержала 6 мМ MgCl_2 , 5 мМ KCl, 100 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 135 мМ Tris-HCl, pH 7,4; для Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы – 6 мМ MgCl_2 , 0,15 мМ CaCl_2 , 0,1 мМ ЭДТА и 135 мМ Tris-HCl, pH 7,4. После 5-минутной предварительной инкубации при 37°C в каждую пробирку добавляли Na_2ATP («Boehringer, Mannheim», Germany) до конечной концентрации 3 мМ. После инкубации при 37°C в течение 30 мин реакцию останавливали, помещая все образцы, включая холостую пробу и стандарт, на лёд, поскольку ранее было показано, что эта процедура предпочтительнее [21, 22]. Pi определяли в аликвотах объёмом 1 мл от инкубированных смесей с помощью добавления раствора луброл-молибдата («Sigma-Aldrich»), приготовленного, как описано ранее [20]. Смеси перемешивали на вортрексе и после 10-ми-

Таблица 1. Система оценки образцов при просвечивающей электронной микроскопии

Местоположение	Оценочные баллы	Обнаружение
Внутрицитоплазматический отёк ^а	0 1 2 3	отсутствие лёгкий средний тяжёлый
Ядро ^а	0 1 2 3	норма комковатость разрыхлённый хроматин дефект ядерной мембраны
Митохондрия ^б	0 1 2 3	норма лёгкий отёк средний отёк тяжёлый отёк
Аксон ^в	0 1 2 3	норма лёгкий отёк средний отёк тяжёлый отёк
Миелин ^в	0 1 2 3	норма трещина между слоями сог и экструдированные везикулы сильное растрескивание миелина

Примечание. ^а) 20 нейронов/образец, ^б) 100 митохондрий/образец, ^в) 100 аксонов/образец.

нутной инкубации при комнатной температуре измеряли поглощение при 240 нм на спектрофотометре «Gilford 250» («Gilford Instrument Laboratories, Inc.»). Все анализы (вместе с ферментом и холостыми реакциями) были выполнены в трех повторах. Содержание фосфатов в образцах сравнивали со стандартами K_2HPO_4 . Удельную активность рассчитывали как нмоль P_i /ч/мг белка [20, 23]. Все реагенты были аналитической чистоты, если не указано иное. Растворы готовили на деионизированной воде.

Содержание белка определяли по методу, описанному Лоури, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин [24].

Просвечивающая электронная микроскопия. Все вышеупомянутые процедуры были применены к животным в группе, предназначенной для исследования с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В конце протокола после ишемии или 75-минутного периода реперфузии ($n = 5$) выполняли транскардиальную перфузию сосудов, которую начинали с введения 250 мл физиологического раствора (37°C) с последующим введением ~ 1000 мл раствора, содержащего 2% параформальдегида и 2,5% глутаральдегида в фосфатном буфере (0,1 М, рН 7,4, 37°C). Животных умерщвляли с помощью передозировки анестезии в конце периода реперфузии. Ткань была постфиксирована с помощью OsO_3 , обезвожена в градиентной серии спиртовых растворов и залита «Araldite CY212». Ультратонкие срезы (60–90 нм) окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Их исследовали и фотографировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа «JEOL JEM 1200 EX» («JEOL Ltd.», Япония). Срезы тканей получали из коры и белого вещества лобной и теменной долей отдельно и с обеих сторон. Мы использовали систему оценок Görgülü et al. [25] и Kaptanoglu et al. [26] для оценки всех полей в каждой выборке (табл. 1). Внутрицитоплазматический отёк, морфологический вид ядра и митохондрий оценивали в сером веществе, в то время как аксоны и внешний вид миелиновых оболочек оценивали в белом веществе. Исследователь, оценивающий срезы, не знал, какую именно группу он анализирует.

Физиологические параметры. Газовый состав артериальной крови, т.е. парциальное давление кислорода и углекислого газа, рН и гематокрит, определяли с помощью анализатора газов крови «1640/Blood Gas and Electrolytes» («Beckman Coulter Inc.», США) в образцах артериальной крови, взятых до ишемии, и при необходимости поддерживали в физиологических пределах.

Статистический анализ. Минимальное количество животных в группах было предварительно определено программой «G-power» со значимостью $\alpha = 0,05$ и мощностью $\beta = 0,80$. Данные были выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение и статистически проанализированы с помощью программы «SPSS 17.0» для Windows. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Поскольку при тестировании с помощью критерия Шафиро–Уилка данные не распределялись нормально, мы применили дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса с апостериорным критерием Данна, а затем U -тест Манна–Уитни для попарных сравнений с поправкой Бонферрони, примененной к p -значениям. Электронно-микроскопические данные оценивали с помощью теста хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Физиологические измерения. САД (мм рт. ст.), измеренное ранее, было сопоставимо между экспериментальными группами во время периодов ишемии и реперфузии (табл. 2). Доишемическое парциальное давление кислорода и углекислого газа в артериальной крови, рН и гематокрит находились в физиологических пределах во всех группах (табл. 3). Время до снижения активности ЭЭГ после начала ишемии было одинаковым в И- и И/Р-группах (табл. 3).

Перекисное окисление липидов мозга. Уровень МДА (индикатора перекисного окисления липидов) в головном мозге был самым низким ($22,0 \pm 0,6$ нмоль/г влажной ткани) в контрольной группе и самым высоким — в И/Р-группе ($164,0 \pm 1,3$ нмоль/г влажной ткани). Уровни МДА были значительно выше в И- и И/Р-группах по сравнению с контролем, причём уровень МДА был значительно выше в И/Р-группе по сравнению с И-группой (рис. 2). Введение мелатонина значительно снизило уровни МДА во всех трех применяемых дозах, хотя значения всё ещё были выше, чем в контрольной группе. Мелатонин проявлял дозозависимый эффект снижения МДА ($p < 0,05$).

Активность мембраносвязанных Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы. Значения активности мембраносвязанных АТФаз приведены на рис. 3. Активность Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы была самой высокой ($185,3 \pm 3,5$ нмоль P_i /мг белка) в контрольной группе и самой низкой ($82,4 \pm 3,7$ нмоль P_i /мг белка) — в И/Р-группе. Разница между контролем и всеми остальными группами была значительной. Активность фермента была выше в группах, которым вводили мелатонин, по сравнению с И/Р-группой

Таблица 2. Среднее артериальное кровяное давление (мм рт. ст.) исследуемых групп в ходе экспериментов

САД (мм рт. ст.)	Контроль ^а (n = 10)	И (n = 8)	И/Р (n = 8)	И/Р + мелатонин ^б 400 мкг/кг (n = 7)	И/Р + мелатонин ^б 1200 мкг/кг (n = 8)	И/Р + мелатонин ^б 2400 мкг/кг (n = 7)
Базальное	103,6 ± 10,5	100,0 ± 17,3	103,4 ± 19,1	96,7 ± 14,2	98,3 ± 14,9	99,3 ± 8,6
До ишемии	101,7 ± 8,5	74,9 ± 7,6	74,9 ± 4,5	74,7 ± 6,0	72,0 ± 4,0	74,7 ± 4,1
Ишемия	102,8 ± 8,9	33,7 ± 6,1	35,4 ± 3,6	36,7 ± 3,9	36,0 ± 3,3	32,7 ± 3,0
Реперфузия (5-я минута)	105,6 ± 7,7	–	87,4 ± 18,5	84,7 ± 13,5	94,9 ± 14,2	79,3 ± 10,6
Реперфузия (75-я минута)	107,6 ± 6,8	–	91,4 ± 18,4	91,3 ± 13,7	89,1 ± 8,6	91,3 ± 12,2

Примечание. САД – среднее артериальное давление; И – ишемия; Р – реперфузия.

^{а)} Значение САД у контрольных животных измеряли в моменты времени, соответствующие времени в экспериментальных группах.

^{б)} Мелатонин применялся на первой минуте реперфузии.

Результаты животных, использованных в группе электронной микроскопии, не включены.

Таблица 3. Уровни газа, рН и гематокрита крови до ишемии и время до снижения активности ЭЭГ после начала ишемии в экспериментальных группах

Параметры	Контроль (n = 10)	И (n = 8)	И/Р (n = 8)	И/Р + мелатонин 400 мкг/кг (n = 7)	И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг (n = 8)	И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг (n = 7)
pO ₂ (мм рт. ст.)	185,7 ± 25,0	197,9 ± 27,4	118,7 ± 42,6	151,3 ± 36,5	192,4 ± 19,0	183,5 ± 41,5
pCO ₂ (мм рт. ст.)	37,4 ± 4,1	38,3 ± 3,5	35,4 ± 2,3	36,3 ± 3,6	37,4 ± 4,5	39,1 ± 5,2
рН	7,38 ± 0,05	7,35 ± 0,06	7,37 ± 0,05	7,38 ± 0,04	7,37 ± 0,05	7,35 ± 0,04
Гематокрит (%)	44,2 ± 1,9	43,6 ± 1,5	43,3 ± 1,3	44,3 ± 1,5	45,1 ± 1,6	42,5 ± 4,1
Время до снижения ЭЭГ (с)	–	17,4 ± 3,5	18,8 ± 2,4	19,0 ± 2,1	17,7 ± 3,2	18,2 ± 2,6

Примечание. И – ишемия; Р – реперфузия; pO₂ – парциальное давление кислорода; pCO₂ – парциальное давление углекислого газа; ЭЭГ – электроэнцефалография.

Результаты животных, использованных в группе электронной микроскопии, не включены.

($p < 0,05$). Мелатонин проявлял дозозависимый эффект, повышая активность Na⁺-K⁺/Mg²⁺-АТФазы ($p < 0,05$), но группы, получавшие мелатонин, всё же имели более низкую активность Na⁺-K⁺/Mg²⁺-АТФазы, чем контрольная группа.

Активность фермента Ca²⁺/Mg²⁺-АТФазы также была различна в разных группах. Группа И/Р имела значительно более низкую активность фермента ($568,0 \pm 6,2$ нмоль Pi/мг белка) по сравнению со всеми другими группами ($p < 0,05$). Введение мелатонина значительно увеличивало уровень активности фермента ($p < 0,05$), хотя в отличие от активности Na⁺-K⁺/Mg²⁺-АТФазы зависимость от дозы не была значимой.

Просвечивающая электронная микроскопия.

Изображения срезов мозга из каждой группы, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, представлены на рис. 4, а оценочные баллы, полученные в ходе исследования ультраструктуры мозга, представлены в табл. 4. Все параметры на изображе-

ниях просвечивающей электронной микроскопии показали значительные различия между группами. В контрольной группе наблюдалась нормальная ультраструктура мозга, за исключением небольшого внутрицитоплазматического отёка и небольшой комковатости в ядре. Митохондрии имели нормальный вид с хорошо заметными кристами. Аксональных изменений не было, миелиновые слои располагались равномерно (рис. 4). Самые низкие оценки по всем параметрам подтвердили эти наблюдения (табл. 4).

Наиболее заметные ультраструктурные изменения наблюдались в группах И и И/Р: в обеих группах присутствовали тяжёлый отёк, обширная вакуолизация и просветление цитоплазмы нейронов (рис. 4). Практически во всех образцах обнаружены дефекты клеточной мембраны и разрыхление хроматина ядер. Митохондрии демонстрировали отёк от умеренного до сильного без появления крист. Дегенерация миелина была тяжёлой, трещины между миелино-

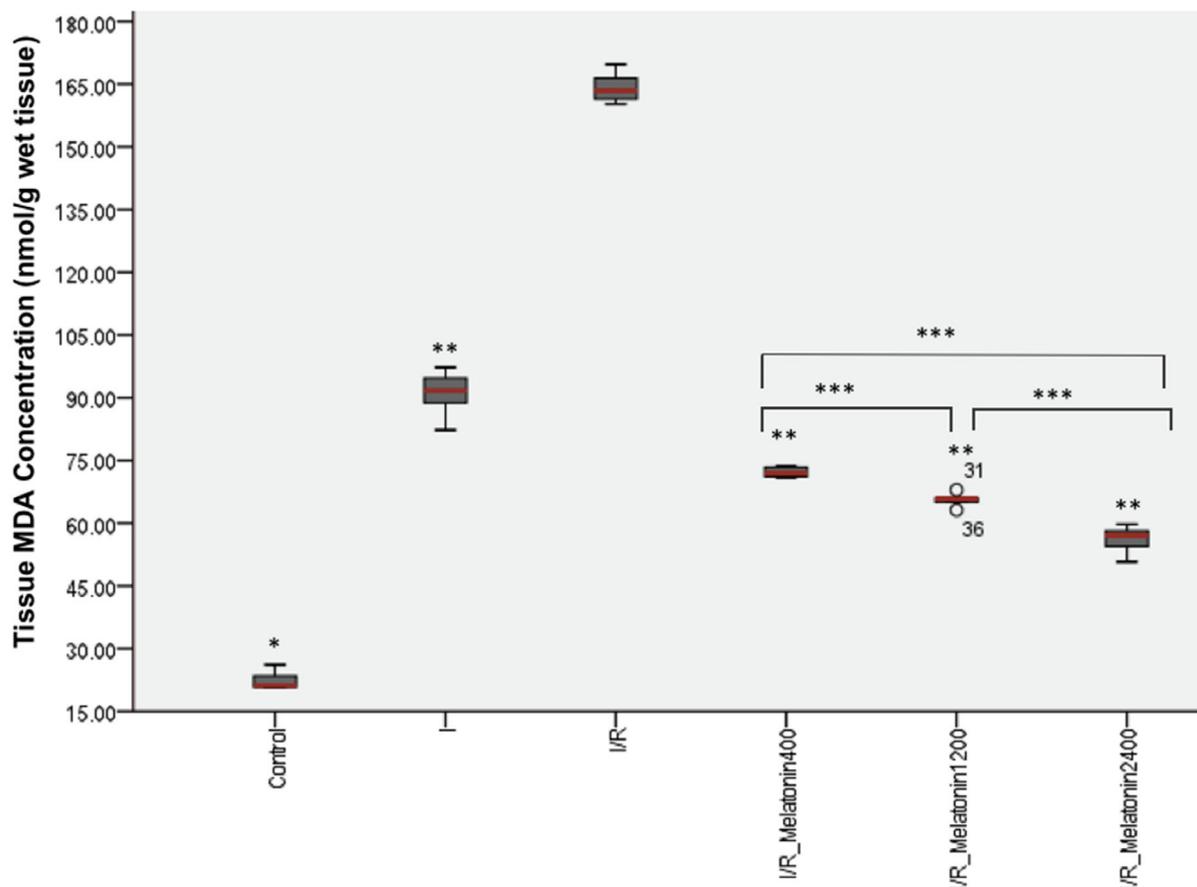


Рис. 2. Концентрация малонового диальдегида в головном мозге в опытных группах. Принятые сокращения: I – ишемия; R – реперфузия. * $p < 0,05$ (при сравнении контрольной группы со всеми другими экспериментальными группами); ** $p < 0,05$ при сравнении с I/R-группой; *** $p < 0,05$ при сравнении с другими группами, получавшими мелатонин

выми слоями были многочисленными. Везикулярная дегенерация, вид сот и экструдированные везикулы, наряду с обилием растрескавшегося миелина, наблюдались с разной интенсивностью почти во всех областях. Хотя степень

интрацитоплазматического отёка и повреждения ядер были аналогичны вышеупомянутым изменениям, наблюдаемым в I/R-группе ($p > 0,05$), в I-группе деструкция была меньше по сравнению с I/R-группой. Повреждения

Таблица 4. Оценочные баллы при просвечивающей электронной микроскопии

Местоположение	Контроль	И	И/Р	И/Р + мелатонин 400 мкг/кг	И/Р + мелатонин 1200 мкг/кг	И/Р + мелатонин 2400 мкг/кг
Внутрицитоплазматический отёк	0,05 ± 0,05	2,3 ± 0,13 ^а	2,68 ± 0,11 ^а	0,84 ± 0,14 ^{а,в}	0,57 ± 0,12 ^{а,в,г}	0,21 ± 0,1 ^{в,г}
Ядро	0,2 ± 0,1	1,78 ± 0,14 ^а	2 ± 0,11 ^а	0,58 ± 0,12 ^в	0,53 ± 0,12 ^в	0,37 ± 0,11 ^в
Митохондрия	0,10 ± 0,04	1,82 ± 0,09 ^а	2,35 ± 0,08 ^{а,б}	0,47 ± 0,07 ^{а,в}	0,41 ± 0,07 ^{а,в}	0,22 ± 0,06 ^в
Аксон	0,32 ± 0,11	1,95 ± 0,14 ^а	2,95 ± 0,05 ^{а,б}	0,42 ± 0,12 ^в	0,42 ± 0,12 ^в	0,21 ± 0,1 ^в
Миелин	0,11 ± 0,07	2 ± 0,15 ^а	2,95 ± 0,05 ^{а,б}	0,47 ± 0,12 ^в	0,42 ± 0,12 ^в	0,16 ± 0,09 ^в

Примечание. И – ишемия; Р – реперфузия.
^{а)} $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.
^{б)} $p < 0,05$ при сравнении с И-группой.
^{в)} $p < 0,05$ при сравнении с И/Р-группой.
^{г)} $p < 0,05$ при сравнении с И/Р + мелатонин 400-группой.

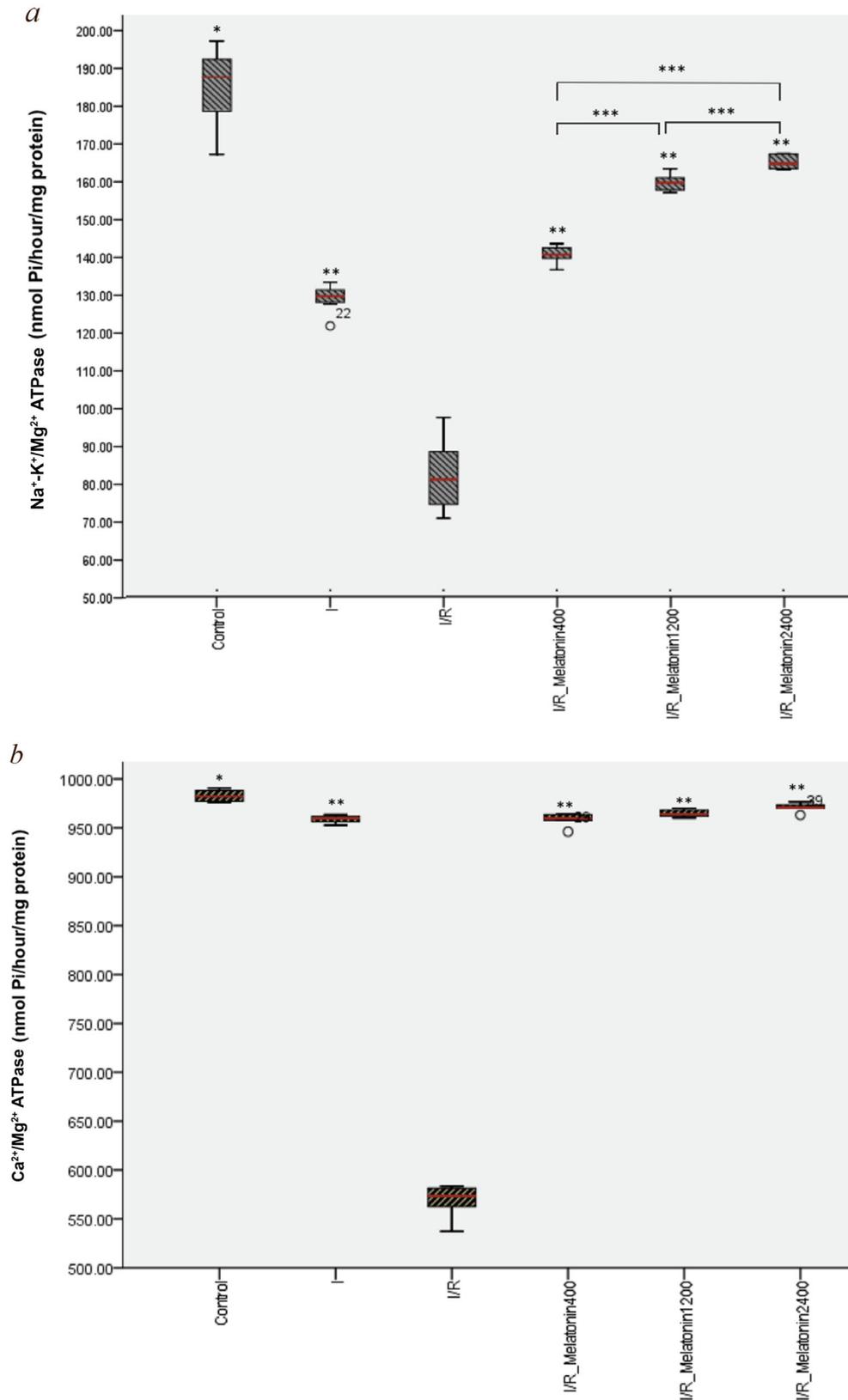


Рис. 3. Активность АТФаз в головном мозге. Активность $\text{Na}^+\text{-K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы (*a*) и $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -АТФазы (*b*) в экспериментальных группах. Принятые сокращения: I – ишемия; R – реперфузия. * Контрольная группа значительно отличалась ($p < 0,05$) по сравнению со всеми другими экспериментальными группами; ** $p < 0,05$ при сравнении с группой I/R; *** $p < 0,05$ при сравнении с другими группами, получавшими мелатонин

митохондрий, дегенерация миелиновой оболочки и аксонов были менее выражены в И-группе, чем в И/Р-группе ($p < 0,05$). Мелатонин во всех дозах уменьшал ультраструктурные повреждения, наблюдаемые в И/Р-группе ($p < 0,05$) (рис. 4 и табл. 4). Лёгкий внутрицитоплазматический отёк был очевиден в некоторых образцах нейронов, обработанных мелатонином; ядра в целом были нормальными или имели небольшую комковатость без разрыхления хроматина и дефектов ядерной мембраны. Митохондрии в основном хорошо сохранились, кристы были хорошо видны. Аксоны и миелиновая оболочка выглядели нормально (с небольшим отёком или без отёка в аксонах) и без каких-либо трещин миелина. Не было различий между дозами мелатонина ($p > 0,05$), за исключением значительного различия в степени внутрицитоплазматического отёка между группами И/Р + мелатонин 400 и И/Р + мелатонин 2400 ($p < 0,05$). Несмотря на относительно нормальный внешний вид серого и белого вещества образцов, обработанных мелатонином, количество оценочных баллов просвечивающей электронной микроскопии всё ещё были выше, чем в контрольной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы исследовали влияние мелатонина на перекисное окисление липидов, активность мембранных АТФаз и морфологические изменения в тканях мозга после ишемии и после И/Р-повреждений у крыс. Наши результаты продемонстрировали защитную роль мелатонина как в сером, так и в белом веществе головного мозга, реализуемую через его антиоксидантный эффект и за счёт повышения активности мембранных АТФаз.

Нейропатологические последствия транзиторной ишемии/реперфузии в ЦНС часто разрушительны и чрезвычайно трудно поддаются коррекции. Поэтому очень важно предотвратить возникновение И/Р и, в случае её возникновения, как можно раньше ограничить размер и/или распространение И/Р-повреждений [1]. Различные молекулы, включая мелатонин, были исследованы на экспериментальных моделях И/Р-повреждений для изучения возможных защитных эффектов [7, 27, 28]. Предыдущие исследования показали, что мелатонин исполняет защитную роль против И/Р-повреждений в нескольких тканях посредством различных путей, таких как активация каскада Raf–MEK–ERK и фосфорилирование его нижележащих мишеней, ослабление стресса эн-

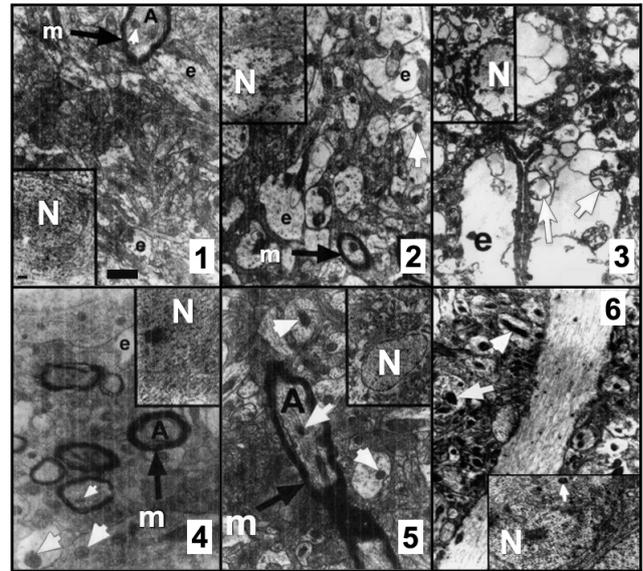


Рис. 4. Изображения образцов из каждой группы, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В контрольной группе (1) нормальная ультраструктура наблюдалась в белом и сером веществе. Группа ишемии (2) показала меньше повреждений по сравнению с группой ишемии/реперфузии (3) с небольшим количеством интактных миелинизированных аксонов и менее отёчными областями. В группе ишемии/реперфузии (3) наблюдались тяжёлые повреждения с обширным аксоплазматическим и цитоплазматическим отёком. Большинство нейрональных элементов демонстрировали везикулярное разрушение, создавая вид сот. В группах, получавших мелатонин (4, 5 и 6 – для доз мелатонина 400, 1200 и 2400 мкг/кг соответственно), наблюдалась защита ультраструктуры с очень небольшим количеством отёчных участков и интактными митохондриями. Мелатонин вводили на первой минуте реперфузии. Принятые сокращения: белые стрелки – митохондрии; N – ядро, показанное на врезках; e – отёчные участки; m – миелин (черные стрелки); A – миелинизированные аксоны; масштабная линейка – 0,5 мкм

доплазматического ретикулума, высвобождение цитохрома *c* из повреждённых митохондрий и активация каспазы 3, формирование пор, изменяющих проницаемость митохондрий, улавливание свободных радикалов [11, 28–31]. В настоящем исследовании мы впервые оценили влияние мелатонина на активность АТФаз в головном мозге во время И/Р-повреждений.

В нашем исследовании ишемия привела к заметному количеству повреждений как в сером, так и в белом веществе по сравнению с контрольной группой, тогда как самые большие морфологические нарушения были обнаружены в И/Р-группе, что согласуется с предыдущими результатами [32]. Наиболее значительные изменения, наблюдаемые с помощью просвечивающей электронной микроскопии в И/Р-группе, были менее выражены во всех группах, которым

вводили мелатонин; самый высокий защитный эффект наблюдали в группе, получавшей самую высокую дозу лекарства. Это согласуется с результатами Lee et al. [27], продемонстрировавшими защитный эффект мелатонина при очаговой ишемии головного мозга у крыс.

В настоящем исследовании уровень МДА, индикатора перекисного окисления липидов в тканях головного мозга, как и ожидалось, был высоким как в И-группах, так и в И/Р-группах и снижался в группах, получавших мелатонин даже в самой низкой дозе. Этот результат соответствует литературным данным [33].

АТФ имеет решающее значение для функции нейронов по поддержанию поляризации мембраны, гомеостаза Ca^{2+} , внутриклеточной передаче сигналов, а также аксонального и дендритного транспорта. Аддитивный эффект перекисного окисления липидов мембран и потребление клеточного АТФ в результате И или И/Р изменяет активность мембраносвязанных АТФаз и в конечном итоге нормальные функции клеток [4]. Свободные радикалы ухудшают проницаемость мембраны и транспортные функции, разрушая особую структуру мембраны и устраняя биологическую активность [32]. Наши результаты показали, что повышенное перекисное окисление липидов в тканях и нарушение активности АТФаз после И и И/Р были скорректированы введением мелатонина в различных дозах в начале реперфузии, что может быть связано с морфологическими нарушениями в сером и белом веществе переднего мозга. Этот результат согласуется с хорошо известным антиоксидантным действием мелатонина как нейропротектора [34, 35].

Во время ишемического периода АТФ-зависимые функции нарушаются из-за истощения клеточных источников энергии [4]. Мембраносвязанные АТФазы выполняют жизненно важные функции, а как показано в нашем исследовании, активность Ca^{2+}/Mg^{2+} -АТФазы ослабляется ишемией, из-за этого повышается внутриклеточное содержание Ca^{2+} , что приводит к смерти. С другой стороны, снижение активности $Na^{+}-K^{+}/Mg^{2+}$ -АТФазы, как и в нашем исследовании, приводит к нарушению мембранного потенциала, объема клеток и трансмембранных потоков Ca^{2+} , а также к нарушению работы возбуждающих нейромедиаторов [4, 36]. Снижение активности АТФаз может быть связано с повышенным перекисным окислением липидов из-за ишемии или И/Р [4]. Результаты настоящего исследования также указывают на восстановление активности мембраносвязанных АТФаз (вместе со значительным снижением уровня МДА) у животных, получавших мела-

тонин. Хотя И/Р-индуцированное снижение активности обеих АТФаз было значительно исправлено, оно всё ещё было ниже, чем в контрольной группе, однако можно ожидать, что дальнейшее увеличение дозы мелатонина улучшит результат.

Несмотря на то что накоплено огромное количество данных о И/Р-повреждениях и нейрозащитных мерах [2, 7], насколько нам известно, это одно из первых исследований, изучающих влияние мелатонина на активность мембранных АТФаз и на ультраструктуру серого и белого вещества мозга крыс. Белое вещество составляет ~50% мозга взрослого человека и является уязвимой мишенью для активных форм кислорода из-за высокого содержания липидов в миелиновой оболочке, большого количества эндотелиальных ферментов, продуцирующих активные формы кислорода в перфорирующих артериях, и низкого уровня внутренних антиоксидантов. Кроме того, более низкий кровоток и слабое коллатеральное кровообращение в белом веществе [37], чрезвычайно высокая чувствительность олигодендроцитов (в частности, к эксцитотоксичности [38, 39]), а также воспаление приводят к его высокой уязвимости во время ишемии, следовательно, белое вещество мозга часто повреждается серьезнее, чем серое вещество [40]. Исследования, посвященные повреждению белого вещества, ограничены из-за малого количества белого вещества у грызунов и отсутствия хорошего метода оценки [41]. Сообщалось, что двусторонняя модель окклюзии общей сонной артерии вызывает диффузную ишемию белого вещества в головном мозге крысы [42]. Исследования с использованием моделей двусторонней окклюзии сонной артерии или применения эндотелина-1 у грызунов показали наличие инсульта белого вещества и его влияние на смерть и различные аспекты дегенерации и восстановления [43]. Ясно, что количественная оценка повреждения серого и белого вещества одинаково важны для оценки эффективности потенциальных терапевтических агентов, поскольку оба вещества влияют на неврологическую дисфункцию и функциональное восстановление после инсульта. Многие вещества, успешно использованные в экспериментальных условиях, не смогли выступить в качестве терапевтических средств, потому что большинство исследователей упустили из виду долю белого вещества во время повреждения и/или восстановления. Хотя мы не исследовали изменения в глияльных клетках, стоит упомянуть астроциты, поскольку астроциты поддерживают нейроны, обеспечивая антиоксидантную защиту, субстраты для нейронального метаболизма и клиренс

глутамата в физиологических и патологических условиях [44]. Хотя астроциты более устойчивы, чем нейроны, ишемия или повреждения, вызванные И/Р, могут нарушать функции астроцитов, что может ещё больше усиливать гибель нейронов [45, 46].

Основным ограничением исследования является отсутствие данных о влиянии уровней экспрессии АТФаз на долгосрочные и поведенческие и/или функциональные результаты лечения мелатонином в И/Р-модели. Необходимы дальнейшие клинические и экспериментальные исследования *in vivo* и *in vitro*, чтобы подтвердить наши выводы о значительном эффекте мелатонина и механизмах, участвующих в его защитном действии при И/Р-повреждении, и предоставить поведенческие и/или функциональные данные для мелатонина, которые будут использоваться для профилактики и лечения И/Р-травм в клинической практике.

В заключение, скорее всего, благодаря своему антиоксидантному действию мелатонин повышает активность мембраносвязанных Na^+ - K^+ / Mg^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} / Mg^{2+} -АТФазы, которая была подавлена во время И/Р-повреждений мозга. Таким образом, мелатонин может являться многообещающим нейропротекторным агентом против И/Р-повреждений, эффективным как для серого, так и для белого вещества благо-

даря своим благоприятным биологическим свойствам.

Благодарности. Авторы благодарны профессору З. Дикле Балканчи, доктору медицины, профессору физиологии на пенсии, за её критический вклад в исследование, а также профессору А. Эргуну Караагаоглу, доктору философии, профессору биостатистики, за его участие в статистическом анализе.

Вклад авторов. Все авторы внесли свой вклад в концепцию и дизайн исследования. Подготовка материалов, сбор данных и анализ были выполнены Мельтемом Тунсером и Билге Пехливаноглу. Ультроструктурный анализ был выполнен Сельчук Суруджу, а биохимические измерения были выполнены Тургай Исбир. Первый вариант рукописи был написан Мельтемом Тунсером и Билге Пехливаноглу; все авторы внесли свои комментарии в предыдущие версии рукописи. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

Соблюдение этических норм. Были соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные инструкции по уходу и использованию животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee, R. H. C., Lee, M. H. H., Wu, C. Y. C., Couto, E. S. A., Possoit, H. E., et al. (2018) Cerebral ischemia and neuroregeneration, *Neural Regen. Res.*, **13**, 373-385, doi: 10.4103/1673-5374.228711.
- Granger, D. N., and Kvietys, P. R. (2015) Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept, *Redox Biol.*, **6**, 524-551, doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020.
- Li, Y., and Yang, G.-Y. (2017) *Pathophysiology of ischemic stroke*, in *Translational Research in Stroke* (Lapchak, P. A., and Yang, G.-Y., eds.) 1st Edn., Springer Singapore, pp. 51-75.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., and Korthuis, R. J. (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury, *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **298**, 229-317, doi: 10.1016/b978-0-12-394309-5.00006-7.
- Godinho, J., de Sa-Nakanishi, A. B., Moreira, L. S., de Oliveira, R. M. W., Huzita, C. H., et al. (2018) Ethylacetate fraction of *Trichilia catigua* protects against oxidative stress and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion, *J. Ethnopharmacol.*, **221**, 109-118, doi: 10.1016/j.jep.2018.04.018.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015) Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian J. Clin. Biochem.*, **30**, 11-26, doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- Rodrigo, R., Fernández-Gajardo, R., Gutiérrez, R., Matamala, J. M., Carrasco, R., et al. (2013) Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **12**, 698-714, doi: 10.2174/1871527311312050015.
- Weston, R. M., Jones, N. M., Jarrott, B., and Callaway, J. K. (2007) Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 100-114, doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600324.
- Ma, Z., Xin, Z., Di, W., Yan, X., Li, X., et al. (2017) Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury, *Cell. Mol. Life Sci.*, **74**, 3989-3998, doi: 10.1007/s00018-017-2618-6.
- Hu, S., Zhu, P., Zhou, H., Zhang, Y., and Chen, Y. (2018) Melatonin-induced protective effects on cardiomyocytes against reperfusion injury partly through modulation of IP3R and SERCA2a via activation of ERK1, *Arq. Bras. Cardiol.*, **110**, 44-51, doi: 10.5935/abc.20180008.
- Lin, Y. W., Chen, T. Y., Hung, C. Y., Tai, S. H., Huang, S. Y., et al. (2018) Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress, *Int. J. Mol. Med.*, **42**, 182-192, doi: 10.3892/ijmm.2018.3607.
- Blanco, S., Hernández, R., Franchelli, G., Ramos-Álvarez, M. M., and Peinado, M. (2017) Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage, *Nitric Oxide*, **62**, 32-43, doi: 10.1016/j.niox.2016.12.001.

13. Yawno, T., Mahen, M., Li, J., Fahey, M. C., Jenkin, G., and Miller, S. L. (2017) The beneficial effects of melatonin administration following hypoxia-ischemia in preterm fetal sheep, *Front. Cell Neurosci.*, **11**, 296, doi: 10.3389/fncel.2017.00296.
14. Chakravarty, S., and Rizvi, S. I. (2011) Circadian modulation of sodium-potassium ATPase and sodium – proton exchanger in human erythrocytes: *in vitro* effect of melatonin, *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)*, **57**, 80–86.
15. Toklu, H. Z., Deniz, M., Yuksel, M., and Keyer-Uysal, M. (2009) The protective effect of melatonin and amlodipine against cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative brain injury in rats, *Marmara Med. J.*, **22**, 34–44.
16. Hoffmann, U., Sheng, H., Ayata, C., and Warner, D. S. (2016) Anesthesia in experimental stroke research, *Transl. Stroke Res.*, **7**, 358–367, doi: 10.1007/s12975-016-0491-5.
17. Smith, M. L., Bendek, G., Dahlgren, N., Rosén, I., Wieloch, T., and Siesjö, B. K. (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model, *Acta Neurol. Scand.*, **69**, 385–401, doi: 10.1111/j.1600-0404.1984.tb07822.x.
18. Ildan, F., Oner, A., Polat, S., Isbir, T., Göçer, A. I., et al. (1995) Correlation of alterations on Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase activity, lipid peroxidation and ultrastructural findings following experimental spinal cord injury with and without intravenous methylprednisolone treatment, *Neurosurg. Rev.*, **18**, 35–44, doi: 10.1007/bf00416476.
19. Ildan, F., Göçer, A. I., Tuna, M., Polat, S., Kaya, M., et al. (2001) The effects of the pre-treatment of intravenous nimodipine on Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase, Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase, lipid peroxidation and early ultrastructural findings following middle cerebral artery occlusion in the rat, *Neurol. Res.*, **23**, 96–104, doi: 10.1179/016164101101198208.
20. Reading, H. W., and Isbir, T. (1980) The role of cation-activated ATPases in transmitter release from the rat iris, *Q. J. Exp. Physiol. Cogn. Med. Sci.*, **65**, 105–116, doi: 10.1113/expphysiol.1980.sp002495.
21. Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J., and Eisenthal, R. (2007) The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters, *Biochem. J.*, **402**, 331–337, doi: 10.1042/bj20061143.
22. Atkinson, A., Gatenby, A. D., and Lowe, A. G. (1973) The determination of inorganic orthophosphate in biological systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 195–204, doi: 10.1016/0304-4165(73)90178-5.
23. Reading, H. W., and Isbir, T. (1979) Action of lithium on ATPases in the rat iris and visual cortex, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 3471–3474, doi: 10.1016/0006-2952(79)90089-3.
24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
25. Görgülü, A., Palaoglu, S., Ismailoğlu, O., Tuncel, M., Sürücü, M. T., et al. (2001) Effect of melatonin on cerebral edema in rats, *Neurosurgery*, **49**, 1434–1442, doi: 10.1097/00006123-200112000-00024.
26. Kaptanoglu, E., Palaoglu, S., Surucu, H. S., Hayran, M., and Beskonakli, E. (2002) Ultrastructural scoring of graded acute spinal cord injury in the rat, *J. Neurosurg.*, **97**, 49–56, doi: 10.3171/spi.2002.97.1.0049.
27. Lee, M. Y., Kuan, Y. H., Chen, H. Y., Chen, T. Y., Chen, S. T., et al. (2007) Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats, *J. Pineal Res.*, **42**, 297–309, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00420.x.
28. Ramis, M. R., Esteban, S., Miralles, A., Tan, D. X., and Reiter, R. J. (2015) Protective effects of melatonin and mitochondria-targeted antioxidants against oxidative stress: a review, *Curr. Med. Chem.*, **22**, 2690–2711, doi: 10.2174/0929867322666150619104143.
29. Cervantes, M., Morali, G., and Letechipía-Vallejo, G. (2008) Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain, *J. Pineal Res.*, **45**, 1–7, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00551.x.
30. Gim, S. A., and Koh, P. O. (2015) Melatonin attenuates hepatic ischemia through mitogen-activated protein kinase signaling, *J. Surg. Res.*, **198**, 228–236, doi: 10.1016/j.jss.2015.05.043.
31. Santofimia-Castaño, P., Clea Ruy, D., Garcia-Sanchez, L., Jimenez-Blasco, D., Fernandez-Bermejo, M., et al. (2015) Melatonin induces the expression of Nrf2-regulated antioxidant enzymes via PKC and Ca²⁺ influx activation in mouse pancreatic acinar cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **87**, 226–236, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.033.
32. Reiter, R. J., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Manchester, L. C., and Tan, D. X. (2003) Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **993**, 35–47, doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07509.x.
33. Tütüncüler, F., Eskioçak, S., Başaran, U. N., Ekuclu, G., Ayyaz, S., and Vatanser, U. (2005) The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage, *Pediatr. Int.*, **47**, 434–439, doi: 10.1111/j.1442-200x.2005.02085.x.
34. Reiter, R. J., Tan, D. X., Leon, J., Kilic, U., and Kilic, E. (2005) When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **230**, 104–117, doi: 10.1177/153537020523000205.
35. Tan, D. X., Manchester, L. C., Terron, M. P., Flores, L. J., and Reiter, R. J. (2007) One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.*, **42**, 28–42, doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00407.x.
36. De Lores Arnaiz, G. R., and Ordieres, M. G. (2014) Brain Na⁺,K⁺-ATPase activity in aging and disease, *Int. J. Biomed. Sci.*, **10**, 85–102.
37. Harris, J. J., and Attwell, D. (2012) The energetics of CNS white matter, *J. Neurosci.*, **32**, 356–371, doi: 10.1523/jneurosci.3430-11.2012.
38. Domercq, M., Sánchez-Gómez, M. V., Sherwin, C., Etzebarria, E., Fern, R., and Matute, C. (2007) System xc⁻ and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes, *J. Immunol.*, **178**, 6549–6556, doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6549.
39. Micu, I., Jiang, Q., Coderre, E., Ridsdale, A., Zhang, L., et al. (2006) NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia, *Nature*, **439**, 988–992, doi: 10.1038/nature04474.
40. Wang, Y., Liu, G., Hong, D., Chen, F., Ji, X., and Cao, G. (2016) White matter injury in ischemic stroke, *Prog. Neurobiol.*, **141**, 45–60, doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.04.005.
41. Matute, C., Domercq, M., Pérez-Samartín, A., and Ransom, B. R. (2013) Protecting white matter from stroke injury, *Stroke*, **44**, 1204–1211, doi: 10.1161/strokeaha.112.658328.

42. Pappas, B. A., Davidson, C. M., Bennett, S. A., de la Torre, J. C., Fortin, T., and Tenniswood, M. P. (1997) Chronic ischemia: memory impairment and neural pathology in the rat, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **826**, 498-501, doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48512.x.
43. Sozmen, E. G., Kolekar, A., Havton, L. A., and Carmichael, S. T. (2009) A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates, *J. Neurosci. Methods*, **180**, 261-272, doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.03.017.
44. Rossi, D. J., Brady, J. D., and Mohr, C. (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia, *Nat. Neurosci.*, **10**, 1377-1386, doi: 10.1038/nn2004.
45. Nedergaard, M., and Dirnagl, U. (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia, *Glia*, **50**, 281-286, doi: 10.1002/glia.20205.
46. Sekerdag, E., Solaroglu, I., and Gursoy-Ozdemir, Y. (2018) Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options, *Curr. Neuropharmacol.*, **16**, 1396-1415, doi: 10.2174/1570159x16666180302115544.

MELATONIN IMPROVES REDUCED ACTIVITIES OF MEMBRANE ATPases AND PRESERVES ULTRASTRUCTURE OF GRAY AND WHITE MATTER IN THE RAT BRAIN ISCHEMIA/REPERFUSION MODEL

Meltem Tuncer^{1*}, Bilge Pehlivanoglu¹, Selçuk H. Sürücü², and Turgay Isbir³

¹ Department of Physiology, Hacettepe University Faculty of Medicine, 06100 Ankara, Turkey; e-mail: metuncer@hacettepe.edu.tr; tuncermeltem@gmail.com

² Department of Anatomy, Koç University School of Medicine, 34450 Istanbul, Turkey

³ Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Yeditepe University, 34755 Istanbul, Turkey

Ischemia/reperfusion (I/R) is among the most frequent neurological problems and early intervention to limit the damage is crucial in decreasing mortality and morbidity. Based on reports regarding beneficial effects of melatonin, we investigated its impact on Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase and Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase activities and ultrastructure of gray and white matter in the rat forebrain I/R model. Adult Wistar-albino rats (*n* = 78) were randomized into control, ischemia (I), ischemia/reperfusion (I/R), low (I/R + melatonin 400 µg/kg), moderate (I/R + melatonin 1200 µg/kg), and high (I/R + melatonin 2400 µg/kg) dose melatonin. Two-vessel occlusion combined with hypotension (15 min) induced ischemia and reperfusion (75 min) achieved by blood reinfusion were performed. Activities of the membrane-bound enzyme, brain malondialdehyde levels, and brain matter ultrastructure were examined in frontoparietal cortices. Melatonin lowered production of malondialdehyde in a dose-dependently. The enzyme activities attenuated under I and I/R, improved with melatonin treatment. I and I/R severely disturbed gray and white matter morphology. Melatonin, in all applied doses, decreased ultrastructural damages in both gray and white matter. Favorable effects of melatonin can be attributed to its antioxidant properties suggesting that it could be a promising neuroprotective agent against I/R injury being effective both for gray and white matter due to favorable biological properties.

Keywords: malondialdehyde, melatonin, Na⁺-K⁺/Mg²⁺ ATPase, Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase, reperfusion injury