

© САЛМИНА А.Б., ФУРСОВ А.А., МИХУТКИНА С.В., МАЛИНОВСКАЯ Н.А, МОРГУН А.В., ЗЫКОВА Л.Д., МУСАЕВА О.Ф., ФУРСОВ М.А., ЛАЛЕТИН Д.И., ЮДИН Г.В., ТРУФАНОВА Л.В., ШНАЙДЕР Н.А.

РАЗВИТИЕ АПОПТОЗА И ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ АДФ-РИБОЗИЛЦИКЛАЗЫ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.Б. Салмина, А.А.Фурсов, С.В. Михуткина, Н.А.Малиновская, А.В.Моргун, Л.Д. Зыкова,
О.Ф.Мусаева, М.А.Фурсов, Д.И.Лалетин, Г.В.Юдин, Л.В.Труфанова, Н.А. Шнайдер

Красноярская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. И.П.Артюхов

Резюме. Цель исследования – изучить особенности развития апоптоза и изменения активности АДФ-рибозилциклазы в клетках головного мозга в раннем постишемическом периоде. Осуществлено моделирование острого ишемического поражения центральной нервной системы путем перевязки правой сонной артерии у животных (крысы) экспериментальных (продолжительность ишемического периода 24 и 48 часов, соответственно) и контрольной групп ($n=25$). В тонких срезах ткани мозга осуществлена детекция апоптоза клеток методом TUNEL. В гомогенатах, приготовленных из ткани различных регионов головного мозга, определена активность АДФ-рибозилциклазы флуориметрическим методом. Получены данные, свидетельствующие о значительном возрастании активности фермента в нейронах лобной и затылочной долей головного мозга в зоне ишемии в течение первых 24 часов раннего постишемического периода, с последующим снижением ферментативной активности к 48 часу постишемического периода. Обнаружено снижение ферментативной активности АДФ-рибозилциклазы /CD38 в непораженном полушарии головного мозга у животных, перенесших ишемию реципрокного полушария, к 48 часу постишемического периода. Выявлены разнонаправленные изменения выраженности процесса апоптоза нейронов в различных регионах мозга в динамике постишемического периода. Выводы: Постулируется патогенетическая роль нарушения активности CD38/АДФ-рибозилциклазы в развитии апоптоза нейронов, индуцированного ишемическим повреждением головного мозга.

Ключевые слова: ишемия головного мозга, CD38/АДФ-рибозилциклаза, апоптоз, метаболизм НАД⁺.

Изучение механизмов повреждения нейронов при ишемическом поражении центральной нервной системы представляет собой актуальную проблему биологии и

медицины. Несмотря на значительное количество исследований, посвященных анализу развития клеточных и молекулярных механизмов нарушения жизнеспособности и функциональной активности нейронов, современная медицина все еще далека от создания высокоэффективных технологий коррекции когнитивной и моторной дисфункции, индуцированной острым ишемическим поражением у больных с цереброваскулярной патологией. Вместе с тем, накапливаются данные экспериментальных и клинических исследований, свидетельствующие о ключевой роли нарушения функционирования внутриклеточных сигнальных систем нейронов в развитии ишемического поражения [3, 11, 12].

К числу факторов, определяющих чувствительность клеток к действию индукторов апоптоза (в том числе ишемии), относится метаболизм никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и состояние внутриклеточного гомеостаза кальция [14]. НАД функционирует не только в качестве кофермента, но и субстрата для ряда НАД-конвертирующих ферментов. Метаболизм НАД в клетках нейрональной природы является объектом контроля и регуляции, коль скоро состояние пула внутриклеточного НАД влияет на метаболическую активность, репликацию и репарацию ДНК, устойчивость к окислительному стрессу, электровозбудимость нейронов. Уровень НАД в нейронах определяется активностью НАД-синтезирующих ферментов, НАД-регенерирующих метаболических путей, а также НАД-конвертирующих ферментов: 1) АДФ-рибозилтрансфераз, продуцирующих АДФ-рибозу, необходимую для посттрансляционной модификации интегринов, белков цитоскелета, нейрогранина, основного белка миелина, шаперонов, кальциевых АТФаз, ГТФ-связывающих белков и других молекул [8, 10]; 2) поли(АДФ)-рибозилполимеразы, функционирующей в качестве сенсора повреждения ДНК и регулирующей активность гистонов, ферментов репарации ДНК, топоизомераз, некоторых транскрипционных факторов, ДНК-зависимых киназ, ламина В и других белков [16]; 3) АДФ-рибозилциклазы/НАД-гликогидролазы/CD38, представляющей собой компонент клеточных сигнальных систем, сопряженных с рецепторами ряда нейротрансмиттеров (брадикининовые, адренергические, пуринаергические, гистаминовые, мускариновые ацетилхолиновые и другие), катализирующей образования циклической АДФ-рибозы (цАДФР) и адениндинуклеотидфосфата никотиновой кислоты, выполняющих функцию мобилизаторов кальция из внутриклеточных депо, а также модуляторов активности калиевых ионных каналов М-типа [2, 6, 13].

В клетках центральной нервной системы (нейроны, астроциты) АДФ-рибозилциклаза экспрессируется в различных клеточных компартментах (ядро, цитозоль, митохондрии), а также на плазматической мембране. АДФ-рибозилциклаза является продуцентом циклической АДФ-рибозы, выполняющей функцию вторичного посредника за счет взаимодействия с рианодиновыми рецепторами II и III типов, приводящего к высвобождению кальция из внутриклеточных депо в цитоплазму. Существуют доказательства связывания цАДФР со специфическим белком – FKBP12.6, локализованным с рианодиновыми рецепторами [8].

В настоящее время описана патогенетическая роль нарушения экспрессии или активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 в развитии ряда заболеваний, в частности, сахарного диабета, вирусных инфекций, онкогематологических заболеваний, цирроза печени [5, 7, 9]. Противоречивыми остаются данные об изменении активности фермента в электровозбудимых тканях при ишемии и реперфузии. В частности, в некоторых условиях регистрируется снижение продукции цАДФР при ишемии кардиомиоцитов [4], в то время как в других условиях определяется увеличение пула цАДФР при ишемии [18].

Важным механизмом развития нейроповреждения и когнитивного дефицита после ишемического поражения центральной нервной системы является запрограммированная гибель клеток нейрональной природы. Апоптоз клеток нейрональной природы характеризуется тем, что он начинается, как правило, с разрушения синаптических ансамблей, сопровождается нарушением ионного гомеостаза нейронов и дизрегуляторными событиями, связанными с нарушением рецепции нейротрансмиттеров и нейрон-глиальных взаимодействий.

Цель исследования: изучить особенности развития апоптоза и изменения активности АДФ-рибозилциклазы в клетках головного мозга при ишемическом повреждении и в раннем постишемическом периоде.

Материалы и методы

Моделирование острой ишемии головного мозга *in vivo* осуществлялось на белых беспородных крысах-самцах, массой 220-240 г., содержащихся в стандартных условиях вивария, с соблюдением правил гуманного обращения с животными.

Группы животных: 1) контрольная 1 (n=5): введение ингаляционного анестетика (фторотан) для исключения влияния общей анестезии на характеристики оцениваемых биохимических и иммуногистохимических параметров; 2) экспериментальная 1 (n=10): моделирование острой ишемии осуществлялось после проведения общей анестезии

(фторотан ингаляционно) путем перевязки правой сонной артерии с последующей оценкой всех тестируемых параметров через 24 часа после операции; 3) экспериментальная 2 (n=10): моделирование острой ишемии осуществлялось после проведения общей анестезии (фторотан ингаляционно) путем перевязки правой сонной артерии с последующей оценкой всех тестируемых параметров через 48 часов после операции. У животных всех тестируемых групп оценивался неврологический статус по стандартной шкале NSS для уточнения степени нарушения моторных функций в раннем постишемическом периоде. Через 24 и 48 часов с момента индукции острой ишемии головного мозга животные умерщвлялись, и осуществлялся забор образцов ткани головного мозга (лобная и затылочная области ишемизированного и контрлатерального («интактного») полушарий) с последующим приготовлением тонких замороженных срезов и гомогенизации образцов ткани.

Оценка ферментативной активности АДФ-рибозилциклазы нейронов осуществлялась флуориметрическим методом с использованием флуорогенного субстрата – никотинамидгуанидинуклеотида (НГД) согласно стандартному протоколу. Гомогенизация образцов ткани осуществлялась при 4°C, в полученном гомогенате определялась концентрация белка по стандартному протоколу (MicroLowry test, Sigma, USA) и активность фермента путем инкубации 100 мкл гомогената ткани с реакционной смесью, содержащей 100 мкм НГД в 20 mM трис-HCl (pH 7,4) в течение 20 минут при 37°C. Регистрация флуоресценции супернатанта осуществлялась на 0 и 20 минутах инкубации на спектрофлуориметре CM2203 (Solar, Belarus) при длине волны возбуждения 300 нм и длине волны испускания 410 нм. Активность фермента вычислялась по разнице амплитуды флуоресценции на 20 и 0 минутах инкубации, отнесенной к мг белка ткани в минуту.

Для регистрации апоптоза нейронов головного мозга использовался метод TUNEL (Apoptag Direct Detection kit, Immunotech, France) согласно протоколу производителя. В частности, срезы ткани головного мозга фиксировались в 4% растворе параформальдегида в течение 20 минут, отмывались фосфатным буферным раствором (pH 7,4), после чего инкубировались с компонентами реакционной смеси, включая TdT и меченые FITC нуклеотиды. Для детекции ядерного материала срезы докрашивались йодидом пропидия. Участки специфической межнуклеосомной фрагментации ДНК, соответствующие местам включения меченых нуклеотидов в цепочку ДНК, регистрировались при микроскопии среза (люминесцентный микроскоп “Nikon”), результаты архивировались и анализировались с помощью приставки “Nikon Coolpix 4500”. Количество апоптотических клеток выражалось на 100 клеток в образце при анализе не менее 10 полей зрения.

Статистический анализ полученных результатов включал методы статистического описания и проверки статистических гипотез. В пределах каждой выборки определяли среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение, ошибку среднего. При условии соответствия нормальному закону распределения оценку достоверности различий осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента и Т-теста.

Результаты и обсуждение

Моделирование острой ишемии путем перевязки сонной артерии позволяет оценить особенности изменения метаболизма в ткани головного мозга, причем как в пораженном полушарии, изначально кровоснабжаемом преимущественно за счет бассейна этой артерии, так и контрлатерально, с учетом допущения вероятности развития реципрокных патологических процессов в нем при ишемии противоположного региона мозга. Анализ неврологического статуса экспериментальных животных по стандартной шкале NSS подтвердил эффективность используемой модели для достижения эффекта острой ишемии полушария головного мозга и последующего развития моторной дисфункции.

При оценке активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 в лобной и затылочной областях контрольных животных, которым для исключения вероятности влияния общего анестетика на активность тестируемого фермента была осуществлена аналогичная экспериментальной группе анестезия (фторотан ингаляционно), мы обнаружили, что суммарная активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 достоверно не отличается в указанных областях мозга и составляет 0,118 ед/мг ткани/мин и 0,115 ед/мг ткани/мин для лобной и затылочной областей, соответственно.

Мы обнаружили, что в ткани головного мозга в зоне ишемии регистрируются динамические изменения активности АДФ-рибозилциклазы/CD38, при этом наблюдаются однонаправленные изменения ферментативной активности в лобной и затылочной областях пораженного полушария. Так, к 24 часу острой ишемии у животных было зарегистрировано достоверное увеличение активности АДФ-рибозилциклазы в обеих зонах пораженного полушария ($P < 0,05$ по сравнению с контролем), тогда как к 48 часу периода ишемии было выявлено уменьшение активности фермента до исходного уровня (рис. 1).

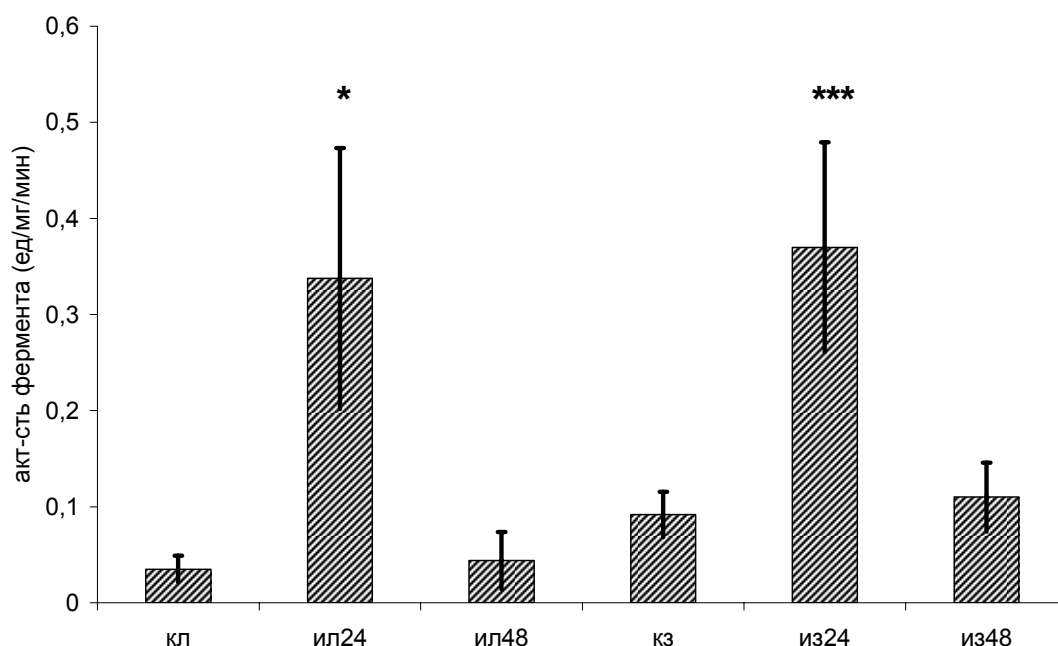


Рис. 1. Активность АДФ-рибозилциклазы/CD38 в ткани головного мозга крыс при ишемии (по оси ординат – активность фермента в ед/мг белка/мин). Обозначения: Кл – контроль (лобная область), ил24 – ишемия (лобная область, 24 ч.), ил48 – ишемия (лобная область, 48 часов), кз – контроль (затылочная область), из24 – ишемия (затылочная область, 24 часа). Из48 – ишемия (затылочная область, 48 часов).

Вместе с тем, интересным представляется тот факт, что у части животных (40%) в ишемизированном полушарии головного мозга к 24 часу периода ишемии как в лобной, так и в затылочной областях отмечалось возрастание лаг-периода активации фермента, регистрируемое по запаздыванию инициации ферментативной реакции, оцениваемой по накоплению флуоресцирующего продукта. Это позволяет предположить, что увеличенная активность фермента, регистрируемая в пораженном полушарии головного мозга к 24 часу периода ишемии, может быть ассоциирована с конформационными изменениями в молекуле фермента и/или биодоступностью субстрата реакции.

В то же время к 48 часу период ишемии у животных в ишемизированном полушарии в 50% случаях регистрировалось полное отсутствие активности фермента. Обнаружение этого факта позволяет сделать предположение о необратимой инактивации или снижении экспрессии АДФ-рибозилциклазы в клетках головного мозга на 2 сутки после перенесенного цереброваскулярного поражения.

Необходимо отметить, что в контрлатеральном полушарии, не испытывавшем состояние острой ишемии, мы зарегистрировали достоверные изменения ферментативной активности,

свидетельствующие об ее прогрессивном снижении на протяжении всего анализируемого периода. При этом в отличие от пораженного полушария, мы не зарегистрировали увеличения активности фермента ни в одном из тестируемых временных промежутков.

Таким образом, результаты определения активности АДФ-рибозилциклазы в ткани головного мозга при остром ишемическом поражении свидетельствуют о том, что к 24 часу развития ишемического повреждения продукция циклической АДФ-рибозы в клетках головного мозга существенно возрастает. Одним из наиболее вероятных механизмов увеличения активности АДФ-рибозилциклазы в раннем ишемическом периоде является увеличение количества НАД в цитозоле в результате его высвобождения из митохондриального матрикса при нарастающей митохондриальной дисфункции и открытии МРТ-мегаканалов в мембране митохондрий, как это было описано ранее в кардиомиоцитах [15].

Наши данные соответствуют существующим представлениям о функционировании CD38 в качестве редокс-сенсора, который фактически сопрягает изменения клеточного редокс-потенциала (в том числе при гипоксии) и механизм высвобождения кальция из внутриклеточных депо [1, 17]. Вероятно, неконтролируемое возрастание концентрации кальция в цитозоле клеток, в том числе обусловленное нарушением кальций-депонирующей функции митохондрий и эндоплазматического ретикулума при гипоксии, может стать причиной необратимого повреждения клетки.

Обнаруженное нами уменьшение активности АДФ-рибозилциклазы к 48 часу развития ишемии может свидетельствовать как о нарушении его экспрессии в клетках центральной нервной системы, так и о снижении количества субстрата, например, вследствие гиперактивации альтернативного НАД-утилизирующего процесса, катализируемого поли(АДФ)-рибозилолимеразой вследствие активации процессов репарации поврежденной ДНК [16].

Таким образом, динамические изменения активности НАД-конвертирующего фермента – АДФ-рибозилциклазы/CD38 – характеризуют и обуславливают изменения электровозбудимости и жизнеспособности клеток центральной нервной системы при ишемическом поражении. Полученные нами данные подтверждают возможность разработки нейропротективной стратегии, базирующейся на направленной модуляции активности или экспрессии АДФ-рибозилциклазы/CD38 в клетках головного мозга.

Развитие запрограммированной клеточной гибели нейронов представляет собой сложный контролируемый процесс, инициируемый физиологическими и патологическими стимулами. В ситуации острой ишемии ткани головного мозга апоптоз регистрируется, как правило, в перифокальной зоне и отсроченно, тогда как клетки в эпицентре ишемического поражения погибают преимущественно путем некроза в первые часы после перенесенного цереброваскулярного повреждения.

При оценке апоптоза в лобной и затылочной областях головного мозга животных контрольной группы мы зарегистрировали наличие характерной для апоптоза межнуклеосомной фрагментации ДНК в $2,65 \pm 1,25\%$ и $0,84 \pm 0,20\%$, соответственно.

Развитие ишемического повреждения головного мозга сопровождалось разнонаправленными изменениями выраженности процесса апоптоза нейронов. Так, к 24 часу развития ишемии количество апоптотических клеток во фронтальной области достоверно сократилось до $0,78 \pm 0,44\%$, тогда как к 48 часу этот регион мозга характеризовался значительным увеличением количества клеток в состоянии апоптоза - $9,67 \pm 1,44\%$ (рис. 2). Уменьшение количества апоптотических клеток в начальном периоде ишемии может свидетельствовать о торможении процесса апоптоза и превалировании некроза в результате действия повреждающего фактора высокой интенсивности.

Напротив, в затылочной области ишемизированного полушария мы зарегистрировали нарастание относительного количества апоптотических клеток к 24 часу. В контрлатеральном («интактном») полушарии количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза, достоверно не менялось на протяжении всего периода наблюдения (табл. 1).

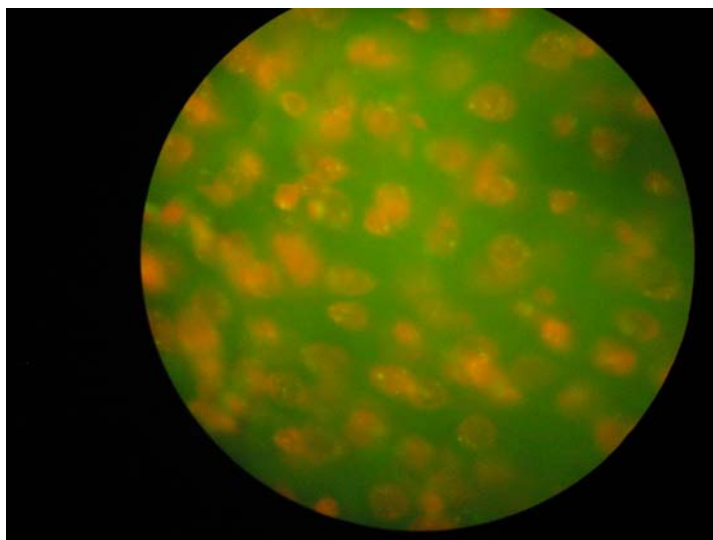


Рис. 2. TUNEL⁺ клетки в лобной доле ишемизированного полушария головного мозга крысы (48 час ишемии) (зеленое свечение соответствует локализации участков встраивания FITC-меченых нуклеотидов в фрагментированную ДНК) (x 900).

Обращает на себя внимание факт обратной зависимости между активностью АДФ-рибозилциклазы/CD38 и выраженностью процесса апоптотической гибели нейронов во фронтальной области головного мозга в динамике ишемии: достоверное уменьшение количества клеток в состоянии апоптоза (вероятно, вследствие торможения апоптоза и превалирования некроза) соответствует значительному увеличению активности фермента к 24 часу наблюдения, тогда как снижение активности циклазы к 48 часу ассоциируется с существенным увеличением количества клеток в состоянии апоптоза. Таким образом, на этом этапе можно сформулировать в качестве рабочей гипотезу об участии АДФ-рибозилциклазы в регуляции чувствительности клеток нейрональной природы к действию апоптогенных стимулов.

Таблица 1.

Количество апоптотических клеток в ишемизированном и контрлатеральном полушариях головного мозга крыс в динамике развития ишемии

Группа животных и регион мозга	Количество апоптотических клеток, %
Контроль	
- лобная доля	2,65±1,25
- затылочная доля	0,84±0,20
Ишемия, 24 часа	
- лобная доля	0,78±0,44**
- затылочная доля	6,08±3,27*
Ишемия, 48 часов	
- лобная доля	9,67±1,44***
- затылочная доля	3,33±1,41
Контрлатеральное полушарие, 24 часа	
- лобная доля	1,55±1,19
- затылочная доля	0,61±0,27
Контрлатеральное полушарие, 48 часов	
- лобная доля	3,33±2,83
- затылочная доля	3,15±1,62*

*Примечание: *P<0,05; **P<0,02; ***P<0,001 по сравнению с контролем.*

Весьма интересным представляется тот факт, что максимальной выраженности процесс апоптоза достигает в лобной доле ишемизированного полушария к 48 часу развития ишемии, тогда как в затылочной доле увеличение количества апоптотических клеток регистрируется в первые сутки после острой ишемии. Уменьшение в последующие 24 часа

количества апоптотических клеток в затылочной области может быть обусловлено отсутствием отсроченной прогрессии апоптоза и эффективной элиминацией апоптотических телец. В то же время, замедленная динамика развития апоптоза в лобной области головного мозга экспериментальных животных, вероятно, отражает особенности кровоснабжения этого региона, играющие роль при реализации используемой модели ишемии, либо асинхронный и отсроченный характер вступления клеток в процесс реализации программы апоптоза.

Таким образом, в динамике постишемического периода головного мозга происходят однонаправленные изменения ферментативной активности АДФ-рибозилциклазы/CD38 во фронтальной и затылочной областях пораженного полушария, при этом увеличение активности фермента наблюдается к 24 часу с начала ишемии, что, вероятно, ассоциирована с конформационными изменениями в молекуле фермента и/или биодоступностью субстрата реакции. Нами установлено, что развитие ишемического повреждения головного мозга сопровождается разнонаправленными изменениями выраженности процесса апоптоза нейронов в лобной и затылочной областях пораженного полушария, что соответствует динамическим изменениям активности АДФ-рибозилциклазы.

PROGRESSION OF APOPTOSIS AND ALTERATIONS IN ADP-RIBOSYL CYCLASE ACTIVITY IN ISCHEMIC DAMAGE OF BRAIN

A.B. Salmina, A.A. Fursov, S.V. Mikhutkina, N.A. Malinovskaya, A.V. Morgun, L.D. Zykova, O.F. Mussaeva, M.A. Fursov, D.I. Laletin, G.V. Yudin, L.V. Trufanova, N.A. Schnayder

Krasnoyarsk state medical academy

Objective: to study progression of apoptosis and alterations in brain ADP-ribosyl cyclase activity during early postischemic period. *Material & Methods:* modeling of acute ischemic damage of brain was performed with a method of right carotid artery clamping in rats of experimental (duration of postischemic period was 24 and 48 hr) and control groups (n=25). In thin brain slices, apoptosis has been detected with TUNEL method. Activity of ADP-ribosyl cyclase has been measured fluorimetrically in brain tissue homogenates. *Results:* We found significant increase of the enzyme activity in neurons of frontal and occipital regions of brain in a zone of ischemia during 24 hr of early postischemic period followed by the activity's fall at 48 hr. Also, inhibition of ADP-ribosyl cyclase activity in intact hemisphere was revealed at 48 hr after ischemia. We were able to detect changes in apoptosis progression in various brain regions throughout the postischemic period. *Conclusions:* Pathogenetic role of alterations of ADP-ribosyl cyclase activity in initiation and progression of neuronal apoptosis induced by ischemia is postulated.

Литература

1. Aksoy P., White T., Thompson M. et al. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38 // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2006. – doi:10.1016/j.bbrc.2006.05.042
2. Bertheliev V., Tixier J-M., Muller-Steffner H. et al. Human CD38 is an authentic NAD(P)+ glycohydrolase // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 330. – P. 1383-1390.
3. Cargill R.S., Thibault L.E. Acute alterations in $[Ca^{2+}]_i$ in NG108-15 cells subjected to high strain rate deformation and chemical hypoxia: an in vitro model for neural trauma // *J. Neurotrauma.* – 1996. – Vol. 13. – P. 395-407.
4. Ge Z-D., Li P-L., Chen Y-F. et al. Myocardial ischemia and reperfusion reduce the levels of cyclic ADP-ribose in rat myocardium // *Bas. Res. Cardiol.* – 2002. – Vol. 97. – P. 312-319.
5. Guse A.H. Cyclic ADP-ribose // *J.Mol.Med.* – 2000. – Vol. 78. – P. 26-35.
6. Higashida H., Robbins J., Egorova A. et al. Nicotinamide-adenine dinucleotide regulates muscarinic receptor-coupled K^+ (M) channels in rodent NG108-15 cells // *J. Physiol.* – 1995. – Vol. 482. – P. 317-323.
7. Higashida H. Hashii M., Yokoyama S. et al. Cyclic ADP-ribose as a second messenger revisited from a new aspect of signal transduction from receptors to ADP-ribosyl cyclase // *Pharmacol. & Therapeutics.* – 2001. – Vol. 90. – P. 283-296.
8. Jorcke D. Ziegler M., Herrero-Yraola A. et al. Enzymic, cysteine-specific ADP-ribosylation in bovine liver mitochondria // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 332. – P. 189-193.
9. Kato A., Yamamoto Y., Fujimura M. et al. CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, $[Ca^{2+}]_i$, and insulin secretion // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 1869-1872.
10. Magni G., Amici A., Emanuelli M. et al. Enzymology of NAD⁺ homeostasis in man // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2004. – Vol. 61. – P. 19-34.
11. Mattson M.P., Keller J.N., Begley J.G. et al. Evidence for synaptic apoptosis // *Exp. Neurol.* – 1998. – Vol. 153. – N. 1. – P. 35-48.
12. Meloni B.P., Majda B.T., Knuckey N.W. Evaluation of preconditioning treatments to protect near-pure cortical neuronal cultures from in vitro ischemia induced acute and delayed neuronal death // *Brain Res.* – 2002. – Vol. 928. – P. 69-75.
13. Nata K. Takamura T., Karasawa T. Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): organization, nucleotide sequence and alternative splicing // *Gene.* – 1997. – Vol. 186. – P. 285-292.

14. Ran Z-H., Rayet B., Rommelaere J. et al. Parvovirus H1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis // *Virus Res.* – 1999. – Vol. 65. – P. 161-174.
15. Sun L., Adebajo O.A., Kova A. et al. A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca^{2+} signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase a putative intracellular NAD⁺ sensor // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16. – P. 302-314.
16. Virag L., Szabo C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – Vol. 54. – N 3. – P. 375-430.
17. Wilson H.L., M. Dipp, J.T. Thomas ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as redox sensors // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – N 14. – P. 1180-1188.
18. Xie G.H., Rah S.Y., Yi K.S. et al. Increase of intracellular Ca^{2+} during ischemia/reperfusion injury of heart is mediated by cyclic ADP-ribose // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2003. – Vol. 307. – N 3. – P. 713-718.

