

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Таныгина Елена Сергеевна

ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ ПРИ
КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ

Специальность 03.01.04. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор Попова Т.Н.

Воронеж 2015

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	8
ВВЕДЕНИЕ	11
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Патогенез сердечно-сосудистой патологии	17
1.1.1. Инфаркт миокарда	17
1.1.2. Метаболизм миокарда при ишемической болезни сердца	19
1.1.3. Катехоламины и сердечно-сосудистые патологии	21
1.1.4. Моделирование коронарной недостаточности	23
1.1.5. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний	25
1.1.6. Сердечно-сосудистые заболевания, ассоциированные с развитием ревматоидного артрита	29
1.1.7. Роль свободнорадикальных процессов в патогенезе ревматоидного артрита	39
1.2. Механизм образования и роль свободных радикалов	44
1.2.1. Механизм генерации активных форм кислорода и их биологическая роль	47
1.3. Общая характеристика антиоксидантной системы	49
1.3.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы	52
1.3.1.1. Супероксиддисмутаза и каталаза	52
1.3.1.2. Роль системы глутатиона в процессах антиоксидантной защиты	55
1.3.1.3. Характеристика NADPH – генерирующих ферментов	59
1.3.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы	62
1.3.2.1. Жирорастворимые антиоксиданты	62
1.3.2.2. Водорастворимые антиоксиданты	64
1.4. Производные гуанидина и сфера их применения	66

1.4.1. Кардиопротекторное действие синтетических производных гуанидина	68
1.4.2. Влияние некоторых производных гуанидина на свободнорадикальные процессы у человека и животных	71
1.4.3. Биологические эффекты синтетических производных гуанидина	72
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	79
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	79
2.1. Объект исследования	79
2.2. Методы исследования	79
2.2.1. Создание модели кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, у крыс	79
2.2.2. Моделирование кардиоваскулярного патологического состояния индуцированием ревматоидного артрита у крыс	81
2.2.3. Получение тканевого гомогената	82
2.2.4. Оценка оксидативного статуса	82
2.2.4.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции	82
2.2.4.2. Определение содержания диеновых конъюгатов	84
2.2.4.3. Оценка окислительной модификации белков	85
2.2.4.4. Определение степени фрагментации ДНК	86
2.2.4.5. Электрофорез ДНК	87
2.2.5. Определение активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови	88
2.2.6. Определение активности креатинкиназы–МВ в сыворотке крови	90
2.2.7. Определение содержания ревматоидного фактора	91
2.2.8. Определение скорости оседания эритроцитов	91
2.2.9. Визуальный метод оценки степени воспаления	92
2.2.10. Определение активности ферментов	92

2.2.10.1. Определение активности ферментов сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями NAD и NADP	92
2.2.10.1.1. Определение активности глутатионредуктазы	93
2.2.10.1.2. Определение активности глутатионпероксидазы	93
2.2.10.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	93
2.2.10.1.4. Определение активности NADP - зависимой изоцитратдегидрогеназы	94
2.2.10.2. Определение активности глутатионтрансферазы	94
2.2.10.3. Определение активности аконитатгидратазы	95
2.2.10.4. Определение активности супероксиддисмутазы	95
2.2.10.5. Определение активности каталазы	96
2.2.11. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы	97
2.2.11.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона	97
2.2.11.2. Определение содержания цитрата	98
2.2.12. Определение содержания белка	99
2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных	100
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ 3,5-ДИКАРБОМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА И 2,4-ДИМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ КАДИОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ВВЕДЕНИЕМ АДРЕНАЛИНА	101
3.1. Поиск бигуанидиновых производных с целевой биологической активностью	101
3.2. Оценка кардиопротекторного действия 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида при кардиоваскулярной патологии, индуцируемой введением	103

адреналина

- 3.3. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на свободнорадикальные процессы в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина 106
- 3.3.1. Интенсивность свободнорадикальных процессов в тканях крыс при введении 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на фоне кардиоваскулярных нарушений, вызванных введением адреналина 106
- 3.3.2. Оценка степени фрагментации ДНК в кардиомиоцитах крыс при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина, и действии 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида 116
- 3.4. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина 118
- 3.5. Влияние протекторов на активность глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях крыс при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина 124
- 3.6. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность NADPH-продуцирующих ферментов в тканях крыс при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина 135
- 3.7. Влияние протекторов на активность аконитазы и содержание цитрата в тканях крыс при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина 142
- ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И** 148

АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРИ ДЕЙСТВИИ 3,5-ДИКАРБОМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА И 2,4-ДИМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

- 4.1. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на маркерные показатели развития кардиоваскулярной патологии при экспериментальном ревматоидном артрите 148
- 4.2. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на оксидативный статус в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита 154
- 4.2.1. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на интенсивность свободнорадикальных процессов в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, ассоциированной с развитием экспериментального ревматоидного артрита 154
- 4.2.2. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на фрагментацию ДНК при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита 159
- 4.3. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярных нарушениях, возникающих на фоне ревматоидного артрита 161
- 4.4. Влияние бигуанидиновых производных на активность глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях крыс при кардиоваскулярных нарушениях, развивающихся на фоне

ревматоидного артрита

4.5. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность некоторых NADPH-продуцирующих ферментов в тканях крыс при кардиоваскулярной патологии, развивающейся при ревматоидном артрите	176
4.6. Влияние протекторов на активность аконитазы и содержание цитрата в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита	182
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	186
ВЫВОДЫ	193
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	196
ПРИЛОЖЕНИЕ	237

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – аконитатгидратаза
- АД – артериальное давление
- АМЦВ или Anti-MCV - антитела к модифицированному цитруллинированному виментину
- АО – антиоксиданты
- АОЗ - антиоксидантная защита
- АОС - антиоксидантная система
- АсАТ – аспаратаминотрансфераза
- АФК - активные формы кислорода
- АЦЦП - антитела к циклическому цитруллинированному пептиду
- БХЛ – биохемилюминисценция
- Г6Ф - глюкозо – 6 – фосфат
- Г6ФДГ - глюкозо – 6 – фосфатдегидрогеназа
- ГК – глюкокортикоиды
- ГП – глутатионпероксидаза
- ГР – глутатионредуктаза
- ГТ – глутатионтрансфераза
- ДК – диеновые конъюгаты
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИАП-1 - ингибитор активатора плазминогена-1
- ИБС - ишемическая болезнь сердца
- ИДГ – изоцитратдегидрогеназа
- ИЛ – интерлейкины
- ИМ – инфаркт миокарда
- ИФН- γ - интерферон γ
- КК-МВ – креатинкиназа – МВ
- КН – кардиоваскулярные нарушения
- ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

МФ – метформин

ОИМ - острый инфаркт миокарда

ОМБ – окислительная модификация белков

ОС – окислительный стресс

ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ - пероксидное окисление липидов

ПФП - пентозофосфатный путь

РА – ревматоидный артрит

РФ – ревматоидный фактор

СД – сахарный диабет

СЖК - свободные жирные кислоты

СН – сердечная недостаточность

СО - свободнорадикальное окисление

СОД - супероксиддисмутаза

СОЭ - скорость оседания эритроцитов

СР – свободные радикалы

СРБ - С-реактивный белок

СРП - свободнорадикальные процессы

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТАЕ-буфер – трис-ацетат-ЭДТА буфер

ТЕ-буфер – трис-ЭДТА буфер

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФНО- α - фактор некроза опухоли α

ФФ – фенформин

ХСН - хроническая сердечная недостаточность

ЦОГ 2 - циклооксигеназа 2

ЦТК - цикл трикарбоновых кислот

ЭКГ – электрокардиограмма

ЭРА – экспериментальный ревматоидный артрит

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

ADP – аденозиндифосфорная кислота

AMPK - АМФ-зависимая протеин киназа

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

cAMP - циклический аденозинмонофосфат

cGMP - циклический гуанозинмонофосфат

Cys – цистеин

FAD – флавинадениндинуклеотид

FMN– флавинмононуклеотид

Glu – глутаминовая кислота

GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный

HLA-DR4 - human leucocyte antigen D-related 4-positive individuals

NAD – ИДГ - NAD – зависимая изоцитратдегидрогеназа

NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

NADP – ИДГ - NADP – зависимая изоцитратдегидрогеназа

NADP – никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

$O_2^{\cdot -}$ - супероксидный радикал

PASS – prediction of activity spectra for substances

PGI2 - ЦОГ 2-зависимый синтез простаглицина

TxA2 - ЦОГ 1-зависимый синтез тромбосана

2,4-ДМФБ - 2,4-диметоксифенилбигуанид

2,4-ДНФГ - 2,4-динитрофенилгидразин

3,5-ДКМФБ - 3,5-дикарбометоксифенилбигуанид

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Болезни сердечно-сосудистой системы, являясь ведущей причиной смертности в мире, уносят ежегодно жизни свыше 16 млн. человек и приводят к большим экономическим потерям. В настоящее время сердечно-сосудистые патологии и связанные с ними снижение трудоспособности и высокая инвалидизация населения являются одной из основных проблем здравоохранения. Важнейшим патогенетическим фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) являются ишемические повреждения миокарда. Удельный вес ишемической болезни сердца (ИБС) среди причин смерти от кардиоваскулярной патологии достигает 88% [2]. Кроме того, к числу заболеваний, связанных с высоким риском развития сердечно-сосудистых нарушений, относят ревматоидный артрит (РА) – распространенное во всем мире аутоиммунное заболевание. Основной причиной смертности больных РА являются кардиоваскулярные нарушения (КН), на долю которых приходится около 40% всех летальных исходов при данном заболевании [192]. Известно, что ключевым звеном патогенеза при развитии болезней, связанных с ишемией, в частности инфаркта миокарда, миокардита и других сердечно-сосудистых заболеваний, является окислительный стресс [70]. Интенсификация свободнорадикальных процессов (СРП) вызывает ряд структурно-функциональных повреждений биомембран, нуклеиновых кислот и белков, то есть важнейших компонентов клетки и организма в целом. Повреждающему эффекту свободных радикалов (СР) противодействует антиоксидантная система организма, компонентами которой являются ферментативные и неферментативные антиоксиданты, способные снижать скорость протекания свободнорадикального окисления (СО) биомолекул, обезвреживать СР за счет обмена своего H^+ (в большинстве случаев) на O_2 свободных радикалов [3, 16, 172, 291].

С целью фармакологической коррекции сдвигов метаболизма, происходящих при кардиоваскулярной патологии, постоянно ведется поиск

соединений, способных усилить антиоксидантный потенциал организма. В настоящее время известно, что некоторые гуанидиновые производные могут оказывать существенное влияние на окислительный гомеостаз, обладают антиоксидантной активностью, гипогликемическими, антисептическими, кардиопротекторными и другими свойствами [154, 288, 326]. Так, гуанидиновое производное – метформин, наряду с хорошо изученным антигипергликемическим эффектом обладает рядом кардиопротекторных свойств, способствует также увеличению микроциркуляции в различных органах и тканях, включая печень и скелетные мышцы, снижению скорости развития атеросклероза и тромбообразования [10, 12]. Результаты исследования показали, что применение метформина уменьшало степень сосудистых осложнений на 40%. В связи с распространенностью и тяжестью ССЗ актуальной задачей биомедицины остаются поиск и оценка возможности применения бигуанидиновых производных с кардиопротекторным и антиоксидантным потенциалом в технологии разработки новых лекарственных препаратов, способных оказывать позитивный эффект при развитии сердечно-сосудистой патологии.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы было исследование воздействия бигуанидиновых производных – 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида (3,5-ДКМФБ) и 2,4-диметоксифенилбигуанида (2,4-ДМФБ), на свободнорадикальный гомеостаз при сердечно-сосудистой патологии в эксперименте на животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Поиск бигуанидиновых производных с целевой биологической активностью.
2. Исследование влияния синтетических гуанидиновых производных на активность маркерных ферментов повреждения кардиомиоцитов при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА, в сыворотке крови крыс.

3. Оценка воздействия 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на интенсивность процессов СО и степень фрагментации ДНК в тканях крыс при кардиоваскулярной патологии, вызванной введением адреналина и развитием РА.
4. Изучение влияния 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы при сердечно-сосудистой патологии у крыс, индуцированной введением адреналина и развивающейся при РА.
5. Оценка воздействия 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на активность глутатионового звена антиоксидантной системы (АОС) - глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП), глутатионтрансферазы (ГТ) и содержание восстановленного глутатиона (GSH), на фоне развития кардиоваскулярных нарушений, индуцированных введением адреналина и развитием РА.
6. Исследование воздействия 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на активности NADPH-генерирующих ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и NADP-изоцитратдегидрогеназы (NADP – ИДГ), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА.
7. Оценка воздействия 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на активность аконитатгидратазы (АГ), являющейся критической мишенью действия активных форм кислорода (АФК), и содержание цитрата в сердце и сыворотке крови крыс при индукции патологии.

Научная новизна. Впервые осуществлено комплексное исследование воздействия бигуанидиновых производных - 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, на интенсивность СО биомолекул, активность ферментативных (СОД, каталаза, ГП, ГР, ГТ) и содержание неферментативных (GSH, цитрат) компонентов АОС, активность ряда ферментов окислительного метаболизма (Г6ФДГ, NADP – ИДГ, АГ) при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развивающейся на фоне РА, в эксперименте на животных. Установлено, что введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ при КН

приводит к снижению интенсивности СРП и степени мобилизации ферментов АОС в сердце и сыворотке крови крыс. Исследовано воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на активность ферментов, поставляющих NADPH, для функционирования глутатионовой АОС. Предложена гипотетическая схема участия бигуанидиновых производных - 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, в регуляции свободнорадикального гомеостаза при сердечно-сосудистой патологии. Проведенные исследования способствуют развитию фундаментальных представлений о механизмах регуляции образования АФК при патологиях, сопряженных с оксидативным стрессом, под действием бигуанидиновых производных.

Практическая значимость. Результаты настоящей работы могут служить основой разработки новых способов профилактики и лечения сердечно-сосудистых патологических состояний. Данные, полученные в ходе исследования, углубляют фундаментальные представления о путях реализации протекторного действия бигуанидиновых производных - 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, обладающих антиоксидантным и кардиопротекторным потенциалом. Результаты исследования способствуют решению проблемы по выяснению сдвигов метаболизма при сердечно-сосудистых заболеваниях и поиску наилучших направлений их коррекции. Данные о позитивном воздействии бигуанидиновых производных на свободнорадикальный гомеостаз в тканях млекопитающих свидетельствуют о возможности применения 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в антиоксидантной терапии при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Результаты, полученные в ходе работы, могут быть применены при разработке антиоксидантных препаратов для профилактики и лечения сердечно-сосудистых нарушений, а также могут быть использованы как материалы доклинического исследования с целью дальнейшего клинического исследования перспективных лекарственных препаратов на основе производных гуанидина.

Материалы работы применяются при подготовке учебных программ дисциплин «Свободнорадикальные процессы в биосистемах», спецкурсов

«Патобиохимия», «Медицинская энзимология», «Физико-химические основы патологических процессов», «Молекулярные механизмы адаптации к стрессовым факторам», преподаваемых на биолого-почвенном факультете Воронежского государственного университета. Кроме того, они используются при проведении практикумов, выполнении выпускных квалификационных работ и магистерских диссертаций студентами Воронежского государственного университета.

Апробация работы. Основные результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, представлены на XXI съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010), на IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биомедицинская инженерия и биотехнология» (Курск, 2011), на XVIII межгородской научной конференции молодых учёных «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2012), на Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева (Чебоксары, 2012), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 70-летию профессора А.А. Чумакова (Ярославль, 2012), на Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Биологические науки» (Уфа, 2010), на международной научно-практической конференции «Наука XXI века: теория, практика и перспективы» (Уфа, 2015), на II международной научно-практической конференции «Наука и общество в условиях глобализации» (Уфа, 2015), на международной научно-практической конференции «Естественно-научные исследования и народное хозяйство» (Воронеж, 2015), а также на II международной научно-практической конференции «Наука и образование: инновации, интеграция и развитие» (Уфа, 2015).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 13 публикациях, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Доказано протекторное действие бигуанидиновых производных - 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина и развивающейся на фоне РА, у экспериментальных животных. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ приводит к улучшению маркерных показателей при данных патологических состояниях и способствуют торможению процессов СО, усиливающихся при развитии патологии.
2. Воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ животным с сердечно-сосудистой патологией, индуцированной введением адреналина и развитием РА, сопровождается снижением степени нагрузки на АОС и реверсией многих показателей антиоксидантной защиты в направлении нормы.
3. Введение бигуанидиновых производных способствует изменению в сторону контроля активности ряда ферментов окислительного метаболизма, оказывающих лимитирующее действие на интенсивность СО биосубстратов.
4. На основе результатов исследований предложена гипотетическая схема, отражающая воздействие бигуанидиновых производных на регуляцию свободнорадикального гомеостаза при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 253 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (4 главы), заключения, выводов, списка литературы (389 источников). Иллюстративный материал включает 8 таблиц, 3 схемы и 37 рисунков, а также 16 рисунков в Приложении.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патогенез сердечно-сосудистой патологии

1.1.1. Инфаркт миокарда

Инфаркт миокарда — это очаговая ишемия и некроз мышцы сердца, возникающие вследствие прекращения притока крови по одной из ветвей коронарных артерий или в результате поступления ее в количестве, недостаточном для покрытия энергетических потребностей. Самой частой причиной повреждения стенки коронарных артерий является атеросклероз.

В большинстве случаев инфаркт миокарда развивается вследствие кальцификации и изъязвления атеросклеротической бляшки с последующей закупоркой сосуда тромбом. Закупорка же одной из ветвей венечной артерии зачастую не сопровождается мобилизацией коллатеральных сосудов, так как атеросклерозом в той или иной степени поражены и другие сосуды сердца.

Наиболее ранними морфологическими проявлениями инфаркта миокарда являются: изменение строения митохондрий, после чего следует набухание или пикноз ядер, затем пропадает поперечная исчерченность мышечных волокон. Клетки миокарда утрачивают гликоген и калий, в них возрастает количество лизосом. Стиль не соответствует требованиям.

Морфологически наиболее рано можно отметить нарушение структуры митохондрий, затем происходит набухание или пикноз ядер, исчезает поперечная исчерченность мышечных волокон. Кардиомиоциты теряют гликоген и калий, в них увеличивается число лизосом.

Развитие инфаркта протекает в зоне, кровоснабжение в которой происходило через поврежденный сосуд. Главным последствием инфаркта является локальный коагуляционный некроз, лизис миоцитов, отек миокарда. Выделяют несколько областей в очаге инфаркта. В центральной, в основном субэндокардиальной зоне в кардиомиоцитах доминируют необратимые

нарушения (перерастянутые миофибриллы, комкообразный ядерный хроматин, митохондрии с аморфными уплотнениями матрикса и дефекты плазматической мембраны). В промежуточной области визуализируются некротизированные мышечные клетки с характерными чертами кальциевой нагрузки (пересокращение миофибрилл, контрактуры, отложения фосфата кальция в митохондриях), аморфные уплотнения матрикса, комкообразный хроматин, липидные капли. Во внешней зоне инфаркта в кардиомиоцитах доминирует аккумуляция липидных капель. В ней не визуализируется некротических изменений. Соотношение между размерами различных зон играет важную роль для прогнозирования течения болезни и выбора методики коррекции заболевания. Некротизированные кардиомиоциты в дальнейшем охватываются нейтрофильными гранулоцитами, которые затем заменяются макрофагоцитами, лимфоцитами и плазмócитами. В последующем происходит замещение рассасывающихся клеток миокарда на фибробласты, вследствие чего формируется соединительнотканый рубец.

Область некроза в миокарде отрицательно влияет на деятельность сердца в целом, что является причиной нарушения ритма и снижения его насосной функции. Степень и характер повреждений зависят от локализации и распространенности инфаркта.

Инфаркту миокарда может сопутствовать острая или хроническая недостаточность сердца, при этом, чем обширнее зона инфаркта, тем отчетливее проявляются изменения гемодинамики: повышение артериального давления крови в направлении притока ее к сердцу и снижение минутного объема крови. Одним из главных последствий инфаркта миокарда является кардиогенный шок, во время которого наблюдается снижение сердечного выброса при значительном увеличении общего периферического сопротивления по причине возрастания активности симпатoadренальной и ренин-ангиотензиновой систем. Наблюдаемые изменения микроциркуляции в тканях приводят к гипоксии, ацидозу,

нарушению деятельности головного мозга и других органов, а в дальнейшем и гибели.

Очень часто острый инфаркт миокарда у человека сопровождается повышением функции симпатoadреналовой системы и выбросом в кровь больших доз катехоламинов. Это, в свою очередь, вызывает повышение функции сердца, уровня в крови свободных жирных кислот, что ведет к снижению транспорта глюкозы в кардиомиоциты и интенсивности гликолиза в них, повышению расходования кислорода, усугублению метаболических нарушений и, как следствие, утяжелению течения инфаркта. В этих случаях защита сердца от действия катехоламинов (например, применением β -адреноблокаторов) дает благоприятный результат.

Резорбция из некротизированных участков миокарда в кровь содержимого поврежденных клеток вызывает появление в крови таких внутриклеточных ферментов, как креатинфосфокиназа, аспаратаминотрансфераза, сердечные изоферменты лактатдегидрогеназы, а также миоглобина, что может быть использовано в диагностических целях. Резорбция клеточных белков сопровождается также лейкоцитозом, лихорадкой, повышением скорости оседания эритроцитов (СОЭ) [100].

1.1.2. Метаболизм миокарда при ишемической болезни сердца

Безусловно, в нормальных условиях между поставкой кислорода к клеткам миокарда и потребностью в нем существует определенное равновесие, способствующее протеканию нормального метаболизма и, следовательно, функционированию кардиомиоцитов. Свободные жирные кислоты (СЖК), обеспечивающие при окислении от 60 до 80% синтеза АТФ, а также глюкоза (20-40% синтеза АТФ), в обычных условиях являются главными поставщиками для генерации энергии в клетках миокарда.

Коронарный атеросклероз способствует развитию дисбаланса между поставкой кислорода к клеткам миокарда и потребностью в нем, вследствие

чего происходит изменение перфузии миокарда и его ишемия. Недостаток кислорода вызывает нарушение метаболизма клеток миокарда. Недостаточное количество кислорода распределяется между окислением глюкозы и СЖК, при этом, соответственно, снижается активность гликолиза и β -окисления СЖК. В условиях нехватки кислорода глюкоза распадается до пирувата, который, не подвергаясь окислительному декарбоксилированию, превращается в лактат в процессе анаэробного гликолиза, вследствие чего развивается внутриклеточное закисление среды. СЖК при этом обеспечивают остаточный аэробный синтез АТФ, вследствие чего наблюдается смещение равновесия от окисления глюкозы к β -окислению СЖК. Как известно, для протекания данного процесса необходимо большее количество кислорода, а в условиях недостатка кислорода он становится метаболически невыгодным. Избыток СЖК и ацетил-КоА тормозит функционирование пируватдегидрогеназного комплекса и приводит к дальнейшему разобщению процессов гликолиза и окислительного декарбоксилирования, и как следствие активации СО. Вследствие накопления СЖК – основного субстрата СО в цитоплазме происходит разрушение мембраны кардиомиоцитов и снижение их функции [2, 12, 47, 238].

В основе развития электрофизиологической и функциональной дисфункции миокарда лежит пероксидация, локальное воспаление, нарушение ионного равновесия, клеточный ацидоз, а также уменьшение синтеза АТФ. Вследствие изменения перфузии и нарушения метаболизма миокарда проявляются клинические признаки развития заболевания.

В связи с вышесказанным средства, обеспечивающие коррекцию метаболизма миокарда, должны быть основополагающим компонентом при лечении ИБС. Существует два основных направления метаболической терапии болезней миокарда – оптимизация процессов образования и расхода энергии, а также нормализация баланса между скоростью свободнорадикального окисления и активностью антиоксидантной системы.

1.1.3. Катехоламины и сердечно-сосудистые патологии

Высокий уровень катехоламинов может вызывать миокардиальные некрозы и аритмии, что особенно важно, поскольку около 50% смертей пациентов с сердечной недостаточностью связывают с возникновением тахиаритмий [54]. Катехоламины обладают прямым действием на фактор роста кардиомиоцитов, стимулируя процесс гипертрофии, и являются триггером оксидантного стресса в программном апоптозе [168].

Увеличение уровня циркулирующих катехоламинов прямо коррелирует с тяжестью заболевания и обратно – с вероятностью выживания пациентов с сердечной недостаточностью [54]. Уровень катехоламинов в плазме крови значительно повышен непосредственно после воздействия стрессового фактора у большинства пациентов со стресс-индуцированной кардиомиопатией (синдром тако-цубо) в остром периоде и превышает таковой у больных острым инфарктом миокарда или с сердечной недостаточностью, а по сравнению с нормой концентрация катехоламинов повышена более чем в 34 раза [290, 367].

Длительно продолжающаяся гиперактивация симпатoadренальной системы оказывает разрушающее действие на состояние сердечно-сосудистой системы вследствие:

- Высокой констрикции вен и артериол, что сопровождается повышением периферического сопротивления (постнагрузки), усилением венозного притока (преднагрузки) и снижением перфузии тканей;
- Повышения объема циркулирующей крови из-за высокой активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и выраженной задержки натрия и воды в организме (увеличенный объем циркулирующей крови значительно повышает нагрузку на миокард);
- Увеличения потребности миокарда в кислороде по причине избыточного содержания катехоламинов и повышенной нагрузки на миокард;

- Развития значительных изменений сердечного ритма (желудочковой тахикардии, мерцательной аритмии, частой политропнойжелудочковой экстрасистолии, и даже фатальных аритмий – трепетания и фибрилляции желудочков);
- Развития гибернации части кардиомиоцитов;
- Непосредственного кардиотоксического эффекта (выраженная дистрофия миокарда, возможны даже некротические повреждения);
- Снижения плотности β -адренорецепторов в цитоплазматической мембране кардиомиоцитов в связи с их интернализацией по средствам эндоцитоза в цитозольные везикулы;
- Увеличения агрегации тромбоцитов (в связи с активацией α -адренорецепторов) и агрегацией микроагрегатов тромбоцитов и микротромбов в микроциркуляторном русле, что снижает кровоснабжение тканей, в том числе и самого миокарда;
- Избыточной кальцификации кардиомиоцитов вследствие активации медленных кальциевых каналов и дальнейшим перенасыщением кальцием митохондрий. В итоге резко снижается рефосфорилирование аденозиндифосфорной кислоты (ADP) и происходит истощение запасов креатинфосфата и аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Избыточной кальцификация кардиомиоцитов активирует фосфолипазы и протеазы, которые повреждают мембрану кардиомиоцитов и индуцируют их гибель.

Чрезмерная кальцификация кардиомиоцитов опосредует кардиотоксическое действие избытка катехоламинов.

Экспериментально установлено, что гистотоксические дозы катехоламинов угнетают сократительную способность кардиомиоцитов, вызывают аритмию и остановку сердца. При этом наблюдается отек, кровоизлияния в легочной ткани и сердечной мышце, гемоциркуляторные нарушения миокарда, а также значительные сдвиги парциального давления CO_2 , O_2 и pH крови, нарастание ацидоза [133]. Также было доказано, что введение адреналина крысам приводит к

гиперполяризации мембран, увеличению сократительной активности, увеличению содержания внутриклеточного кальция, контрактурам миофибрилл, разобщению окислительного фосфорилирования. Перечисленные выше процессы представляют собой одну из форм метаболического и гипоксического стрессов, которые, как известно, приводят к конформационным изменениям внутриклеточного белка, а при длительном воздействии и к его денатурации [24]. Введение адреналина гидрохлорида мышам приводило к возникновению катехоламиновых микронекрозов, что сопровождалось развитием желудочковых аритмий и блокад проведения у большинства подопытных животных [108, 283].

Известно также, что одним из патогенетических вариантов развития инфаркта миокарда является усиление секреции катехоламинов и гормонов коры надпочечных желез, которое и без атеросклеротических поражений может вызвать несоответствие между потребностью миокарда в кислороде и возможностью притока крови с поражением сердечной мышцы. Кроме того, имеются данные о том, что при действии катехоламинов сосуды, даже, незначительно пораженные склерозом, могут отвечать спазмом тогда, когда нормальные сосуды расширяются [100].

1.1.4. Моделирование коронарной недостаточности

В экспериментальном изучении патологии сердца в течение десятилетий были использованы многочисленные, часто весьма оригинальные методы моделирования нарушений кровоснабжения, метаболизма и функции сердца.

Определение коронарной недостаточности, в частности ее клинических проявлений — ИБС и инфаркта миокарда как очагового процесса, возникающего в результате ишемии, соответственно лимитирует и методические подходы, ограничивает их моделированием ишемии. Метаболические некрозы, иммунные, токсические, воспалительные

повреждения миокарда и общая гипоксия не классифицируются как проявления коронарной недостаточности и рассматриваются как некоронарогенные формы патологии. Если, однако, главным патогенетическим фактором метаболических, иммунных или воспалительных процессов в организме становится ишемия, то очаговый некроз должен рассматриваться как инфаркт миокарда. Моделирование ишемии миокарда относится к числу удовлетворительно разрешенных проблем. В лучших моделях инфаркта воспроизводятся важнейшие, весьма близкие к клиническим, его проявления. Однако воспроизведение в эксперименте всей сложности взаимодействия этиологических и патогенетических механизмов ишемии и инфаркта миокарда остается недоступным для современного исследователя прежде всего из-за видовых различий человека и экспериментальных животных. Кроме того, специфика болезней человека определяется условиями его жизни: социальная и внешняя среда, труд, вертикальное положение тела, значительная продолжительность жизни, вредные привычки, денатурализация питания и др. По этим причинам идеальная биологическая модель ишемии и инфаркта миокарда, вероятно, никогда не будет создана. Однако значительные успехи в технике клинических исследований патогенеза ишемии и инфаркта миокарда во многом приближают их возможности к условиям экспериментальных, и вместе с тем — моделирование отдельных элементов патогенеза более предпочтительно для аналитических целей. Идеальная модель была бы, конечно, необходима для изучения этиологии болезни, действия и эффективности лечебных мероприятий и лекарственных препаратов. В разработанных к настоящему времени моделях воспроизводятся важнейшие элементы патогенеза ишемии и инфаркта миокарда, в частности, очаговый некроз, нарушения кардиодинамики, кровообращения, системные нарушения метаболизма и функций органов, регуляции кровообращения и дыхания и др. Для моделирования элементов патогенеза коронарной недостаточности используются также гипоксия и аноксия [59].

В настоящее время в экспериментальных исследованиях все чаще используется методика моделирования острого поражения миокарда, известная под названием экспериментальный адреналиновый миокардит (катехоламиновая миокардиодистрофия) [28, 51, 114]. Во многих работах она упоминается как модель катехоламинового (метаболического) инфаркта миокарда [101], ишемическое повреждение миокарда [87], острое гипоксическое поражение сердца [51], острый адреналиновый некроз миокарда [133], экспериментальное адреналиновое повреждение миокарда [130] и т.д. Однако во всех вышеуказанных случаях экспериментальная патология развивается по одному патогенетическому механизму.

1.1.5. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний

В настоящее время участие процессов пероксидного окисления липидов в сердечно-сосудистой патологии не оставляет сомнений. По данным ряда авторов [6, 23, 26, 77, 141], степень и характер тканевых повреждений, нарушений биохимических процессов зависят от выраженности нарушений свободнорадикального окисления.

Увеличение интенсивности свободнорадикального окисления также может развиваться при изменениях окислительного метаболизма в кардиомиоците или вследствие несогласованной работы антиоксидантной системы. Раньше всего нарушаются при этом функции специфических мембранных насосов, таких как Na^+ , K^+ -АТРаза, Ca^{2+} -АТРаза, и постепенно возрастает проницаемость мембраны, затем происходит разрушение фосфолипидов в ней и возникновение дефектов. Разрушение целостности мембраны способствует изменению потоков ионов натрия, калия, хлора и воды, что является причиной набухания клетки, а также приводит к значительному притоку ионов кальция, что вызывает развитие токсического действия этого катиона. Может возрастать число выявляемых α - и β -

адренорецепторов и высвобождение катехоламинов из нервных окончаний, что способствует усугублению первоначального повреждения [100].

Основной причиной нарушений метаболизма миокарда при кардиоваскулярных заболеваниях, связанных с увеличением активности перекисного окисления липидов, является гипоксия [128].

В условиях ишемии происходит снижение содержания кислорода, что, однако, приводит к усилению образования цитотоксичных супероксидных анион-радикалов и других АФК [44, 69, 70]. Нейтрофилы, активированные продуктами фосфолиполиза и протеолиза, активно инфильтруют ишемизированный миокард, и инициируют «респираторный взрыв», что приводит к гиперпродукции АФК и последующему усилению ишемического повреждения [44]. Следует отметить значение липидов в энергетическом обеспечении миокарда. Основным субстратом перекисного окисления липидов служат свободные жирные кислоты, которые, в свою очередь, играют главную роль в энергетическом обмене миокарда. Следует отметить, что СЖК, обеспечивающие на 75 – 80% потребности сердечной мышцы в энергии, могут быть метаболизированы только при достаточном обеспечении миокарда кислородом. Это лежит в основе высокой чувствительности сердца к гипоксии. Исходя из вышесказанного, можно сделать заключение, что гипоксия и повышение энергетических затрат миокарда стимулируют липолиз, сопряженный с увеличенной мобилизацией жирных кислот, и повышение активности симпатoadреналовой системы. Возрастание уровня неиспользованных СЖК интенсифицирует, в свою очередь, СО. Данное звено патогенетических механизмов является точкой приложения антиоксидантной терапии [89].

Однако в ряде экспериментальных исследований было отмечено, что в ишемизированной ткани наблюдается резкое необратимое ингибирование активности антиоксидантных ферментов СОД и ГП, что тормозит своевременное уничтожение цитотоксичных продуктов, накапливающихся в

условиях ишемии [44, 70]. Таким образом, активация свободнорадикального окисления в зоне ишемии усиливает некроз ишемизированных клеток [44].

Кроме того продукты пероксидного окисления липидов усиливают агрегацию тромбоцитов, ишемию миокарда. При развитии инфаркта миокарда эти процессы наиболее выражены в зоне ишемии и некроза. Активация липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты при значительном увеличении активности фермента 5-липоксигеназы, приводит к образованию лейкотриенов, оказывающих коронарораспастическое действие, усугубляя течение ИБС [90].

Следовательно, ослабление интенсивности свободнорадикальных процессов способно приводить к уменьшению последствий ишемического повреждения [44].

В рамках изучения факторов дестабилизации ИБС было проведено исследование процессов СО и их влияния на функциональное состояние эндотелия и гемореологические параметры [32]. В ходе исследования у пациентов с острым коронарным синдромом (нестабильная стенокардия и инфаркт миокарда без патологического зубца Q), была выявлена активация процессов СО, степень выраженности которой коррелировала с тяжестью ИБС. Нарушение равновесия между активностью СРП и функциональным состоянием АОС приводило к прогрессированию эндотелиальной дисфункции, проявляющейся увеличением дисбаланса между эндотелиальными вазоконстрикторами и вазодилататорами. Результаты исследования свидетельствуют о том, что у больных с острым коронарным синдромом при активации процессов СО изменялся липидный состав мембран клеточных элементов, вследствие чего повышалась агрегационная активность тромбоцитов, усиливалось тромбообразование. Изменение липидного состава мембран клеточных элементов является одним из патогенетических факторов обострения ИБС [32].

Особый интерес представляет определение взаимосвязей между активностью свободнорадикальных процессов и тяжестью течения острого

инфаркта миокарда (ОИМ). У больных с острым инфарктом миокарда была выявлена наивысшая степень активности показателей пероксидного окисления липидов (ПОЛ), причем при крупноочаговом инфаркте эти изменения проявляли себя в большей мере, чем при мелкоочаговом. Экспериментально установлено, что интенсивность оксидативного стресса при остром инфаркте миокарда находится в прямой зависимости от степени сердечной недостаточности в остром периоде заболевания.

Изменение физико-химических характеристик мембран эритроцитов, повышение их жесткости, неизбежно связано с увеличением вязкости крови у больных инфарктом миокарда, возрастанием нагрузки на уже поврежденный миокард и расширением зоны некроза и ишемии [132].

Степень дисбаланса механизмов антиоксидантной защиты находится в прямой зависимости от тяжести сердечной недостаточности при ОИМ [25, 29, 42, 70], о чем свидетельствует выраженное ингибирование и нарушение сопряженности антиоксидантных ферментов - СОД и каталазы - в эритроцитах у пациентов с 3-4 классом ОИМ [49, 50]. Повышение относительной микровязкости липидного бислоя, увеличение текучести зон белок-липидных контактов, структурные перестройки мембранных белков, а также рост уровня внеэритроцитарного гемоглобина в плазме крови наиболее выражено у пациентов с тяжелым течением заболевания, что указывает на наличие взаимосвязи между степенью сердечной недостаточности в остром периоде инфаркта миокарда (ИМ) и выраженностью нарушения архитектоники эритроцитарных мембран.

При этом проведение тромболитической терапии и восстановление коронарного кровотока сохраняет проявления окислительного стресса, что документируется высоким уровнем показателей хемилюминесценции, наличием эндогенной интоксикации, сохраняющейся структурными нарушениями мембран эритроцитов [49, 50]. Стоит отметить, что данный аспект особенно значим для больных преклонного возраста, у которых основной причиной патогенетических механизмов развития ИБС и ее

осложнений является именно активация свободнорадикального окисления, обусловленная старением. В связи с этим лечение метаболическими препаратами у данной категории граждан необходимо совмещать с лекарственными средствами, обладающими антиоксидантными свойствами [72].

Целесообразно включение антиоксидантов (АО) в комплексную коррекцию ИБС в случаях повышенного уровня показателей ПОЛ и сниженной антиоксидантной защиты (АОЗ). Практикующий врач может в качестве ориентира использовать следующие критерии:

- отсутствие эффекта от применения препаратов традиционного лечения;
- развитие ИБС по неблагоприятному варианту (переход стенокардии в более тяжелую форму и дестабилизация стенокардии);
- наличие осложнений (сердечная недостаточность, нарушения ритма);
- совмещение ИБС с гипертонической болезнью, обструктивными заболеваниями легких, сахарным диабетом, хроническими заболеваниями печени.

1.1.6. Кардиоваскулярные заболевания, ассоциированные с развитием ревматоидного артрита

Как известно, ССЗ являются основной причиной смертности во всем мире [117]. К числу заболеваний, связанных с высоким риском развития ССЗ, относят РА – распространенное во всем мире ревматическое заболевание, которому подвержены все этнические группы. Ревматоидный артрит является наиболее часто встречающимся системным аутоиммунным заболеванием, относящимся к важным медицинским и социальным проблемам в связи с его развитием в трудоспособном возрасте, быстро формирующейся инвалидизацией и уменьшением продолжительности жизни

больных. Распространенность его составляет 0,5-1 % (до 5 % у пожилых), причем заболевание чаще развивается у женщин, чем у мужчин (в 3-5 раз). Указанные отличия могут быть связаны с разнонаправленным действием мужских и женских половых гормонов на аутоиммунный процесс: ингибирующим эффектом тестостерона и активирующим – эстрогенов [9, 56, 152, 213, 336].

Ревматоидный артрит — системное хроническое воспалительное заболевание соединительной ткани с прогрессирующим поражением преимущественно периферических (синовиальных) суставов по типу симметричного эрозивно-деструктивного полиартрита с частыми внесуставными проявлениями [177]. При ревматоидном артрите выделяют два типа патологических нарушений в организме: собственно изменения суставов и изменения внутренних органов.

Изменения суставов проявляются в развитии так называемого эрозивного артрита: происходят воспалительные изменения в синовиальной оболочке, суставном хряще, на поверхности которого появляются изъязвления, эрозии, в дальнейшем развиваются фиброзные нарушения капсулы сустава, которые способствуют деформации сустава, анкилозированию, резкому снижению подвижности; мышцы, приводящие в движение пораженный сустав, подвергаются атрофии. Поражению подвергаются в основном мелкие суставы кисти, стопы, а затем в патологический процесс вовлекаются более крупные суставы: лучезапястный, голеностопный, локтевой, коленный [177].

Распространенность системных и внесуставных проявлений ревматоидного артрита, по данным ряда исследований, составляет от 8 до 12% и связана с ростом заболеваемости и увеличением смертности [161, 232, 293, 362].

Этиология РА остается неизвестной. Изучается роль широкого спектра экзогенных, в том числе инфекционных (вирус Эпштейна-Барр, парвовирус В19, ретровирусы, антигены и стрессовые белки бактерий) и

неинфекционных (курение, угольная пыль, некоторые компоненты минеральных масел, различные химические соединения, лекарственные вещества), а также эндогенных (цитруллиновые белки и пептиды) факторов. Имеют значение также неблагоприятные условия работы: пребывание в холодном помещении с повышенной влажностью, сочетающееся с тяжелой физической работой. Предполагается, что экзогенные факторы принимают опосредованное участие в развитии РА на фоне генетической предрасположенности. В последние годы активно изучается роль генетических факторов в развитии РА, риск развития которого ассоциирован с носительством антигена главного комплекса гистосовместимости класса II HLA-DR4 (human leucocyte antigen D-related 4-positive individuals) и DR1, который включает более 22 аллелей. При изучении индивидуальных аллелей было идентифицировано два наиболее тесно ассоциированных с РА: DRB1*0401 и DRB1*0404, носительство которых выявляют у 50–61 % и 27–37 % пациентов с РА соответственно [177].

Известно, что в организме пациентов с ревматоидным артритом продуцируется особый белок — ревматоидный фактор (РФ; антитела к Fc-фрагменту IgG). При ревматоидном артрите и других заболеваниях иммунитет воспринимает собственные клетки как чужие и образует антитела — РФ. Белки этого типа, связываясь с другими протеинами плазмы крови (иммунные комплексы), накапливаются в синовиальной оболочке сустава и способствуют ее воспалению. Помимо этого, данные комплексы способны накапливаться в стенке мелких сосудов внутренних органов (почки, сердце, печень, легкие), вызывая их последующее повреждение [177].

С целью диагностики РА оценивают клиническую и рентгенологическую картины, наличие ревматоидного фактора, антител к модифицированному цитруллинированному виментину (АМЦВ, или Anti-MCV) и циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) в сыворотке крови, результаты клинического анализа крови (в частности, значение имеет выраженность анемии, повышение СОЭ), биохимического анализа крови

(повышается уровень церулоплазмينا, С-реактивного белка (СРБ) и других белков острой фазы воспаления), некоторые параметры, отражающие изменения синовиальной жидкости и др. Некоторые из этих тестов не являются высокоспецифичными, однако могут определяться с целью оценки активности воспалительного процесса и эффективности терапии, проведения дифференциальной диагностики [167].

Повышенный риск развития ССЗ при ревматоидном артрите связан с хроническим воспалительным процессом, который характерен для этого заболевания, хотя роль воспаления в патогенезе заболеваний подобного рода была признана сравнительно недавно [336]. Так, данный неблагоприятный прогноз ассоциируется с повышением маркеров воспаления, в том числе СРБ, СОЭ, РФ [171].

Поражения сердечно-сосудистой системы, в настоящий момент имеющие наибольшее значение среди внесуставных проявлений РА, включают воспалительные заболевания сердца и его оболочек (перикардит, миокардит, эндокардит), миокардиодистрофию, амилоидоз, васкулит, коронарный артериит, поражение клапанного аппарата сердца, а также интенсивное развитие атеросклероза и его осложнений, а именно: хронической сердечной недостаточности (ХСН) и ИБС [249, 293, 365].

Показано, что пациенты с РА чаще (от 30% до 60%) страдают ССЗ по сравнению с общей популяцией [317, 322], особенно инфарктом миокарда (ИМ) [147, 171, 314]. Так, у пациентов с РА риск развития ИБС и ИМ повышен в 1,4–4 раза (в частности, в случае продолжительности заболевания более 10 лет – в 3 раза и более), мозгового инсульта – в 1,7–2,7 раза, ХСН – в 1,5–2,6 раза по сравнению с общей популяцией и с больными, страдающими заболеванием с доказанно высоким кардиоваскулярным риском (сахарный диабет – СД) [107, 202, 338].

Именно кардиоваскулярные патологии являются ведущей причиной смертности больных ревматоидным артритом, на них приходится около 40% всех летальных исходов в этой группе [192]. При РА наблюдается

увеличение уровня кардиоваскулярной смертности на 60% [220, 375]. Ревматические болезни уменьшают продолжительность жизни ревматиков вследствие активации раннего атеротромбоза, артериальной гипертензии и опосредованных ими васкулярных нарушений [204, 232, 293, 377]. Так, главной причиной сокращения продолжительности жизни при РА являются такие кардиоваскулярные осложнения, ассоциированные с атеросклеротическим повреждением сосудов, как инфаркт миокарда, застойная сердечная недостаточность, мозговой инсульт, внезапная сердечная смерть [107, 202, 249, 380]. Повышение сердечно-сосудистого риска и смертности выявлено не только у больных, продолжительно страдающих РА, но и в начальный период заболевания, особенно у женщин, серопозитивных по РФ [284]. Классифицировано несколько взаимосвязанных механизмов, способствующих возрастанию риска кардиоваскулярных осложнений при РА. К их числу можно отнести: накопление классических кардиоваскулярных факторов риска, хроническое воспаление (единые воспалительные/аутоиммунные механизмы, лежащие в основе патогенеза РА и атеросклероза), побочное действие терапии РА; нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикоиды, некоторые основные противовоспалительные препараты, – а также недостаточное внимание к коррекции кардиоваскулярных осложнений со стороны врачей-ревматологов и пациентов [88, 244, 305].

В настоящее время известно, что ключевую роль в развитии РА играет выработка цитокинов с провоспалительным, разрушающим эффектом, таких как фактор некроза опухоли α (ФНО- α), интерлейкины (ИЛ) 1 и 6, интерферон γ (ИФН- γ) и др. Имеется большое количество литературных данных [163, 173, 201, 234, 302, 318, 328, 334, 372, 376], разъясняющих развитие ХСН и кардиомиопатии с участием цитокинов, и, в частности, ФНО- α . Многие научные исследования говорят о том, что сывороточный уровень ФНО- α тесно коррелирует с тяжестью протекания СН. Цитокины проявляют свое действие чаще всего в области образования через

высокоспецифичные клеточные рецепторы в виде развития гипертрофии кардиомиоцитов и разрушения их мембран, изменения эндотелий-зависимой дилатации артериол, активации апоптоза клеток миокарда и чрезмерного развития внеклеточного коллагенового матрикса [206, 334]. На основе своих научных изысканий W.S. Bradham и соавт. делают вывод о том, что увеличение содержания ФНО- α может являться причиной модификации размеров кардиомиоцитов и их жизнеспособности, что осуществляется через ремоделирование миокарда левого желудочка и его дилатацию с последующей дисфункцией путем активации рецепторов к ФНО- α и запуска клеточных и молекулярных механизмов [376]. Н.Р. Gunasinghe и соавт. установили, что индукция рецепторов ФНО- α может стимулировать активацию протеолитических ферментов, в частности металлопротеиназ, что также содействует ремоделированию левого желудочка [234]. Сывороточный уровень ФНО- α увеличивается у больных с ХСН и тесно взаимосвязан с тяжестью протекания заболевания [234]. ФНО- α синтезируется «поврежденным» сердцем (возможно, увеличение взаимосвязано со «стрессом» мышц), что может способствовать прогрессированию ХСН. Известно, что ФНО- α оказывает отрицательное инотропное действие и может стимулировать патоморфологические нарушения в миокарде, включая интерстициальный фиброз и апоптоз кардиомиоцитов [173].

Следует отметить, что продолжительное влияние ФНО- α на миокард способствует, по мнению ряда ученых, к ремоделированию сердца, прогрессированию диастолической и систолической дисфункции левого желудочка и тем самым дает толчок к появлению и прогрессированию ХСН [18].

С другой точки зрения, общие иммуновоспалительные механизмы патогенеза РА и атеросклероза разъясняют иную модель поражения сердечно-сосудистой системы — атеротромбоз [88, 153, 204, 262, 305]. Установлено, что при ревматоидном артрите имеет место завышенная

экспрессия молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), и эндотелина, способствующего вазоконстрикции [204, 296]. Происходящая активация Т-лимфоцитов как при атеросклерозе, так и при РА, способствует увеличению уровня экспрессии рецепторов к ИЛ-2 [346]. Активация макрофагов и тучных клеток с выходом коллагеназ в область атеросклеротических бляшек способствует их дестабилизации [329]. Увеличенное содержание цитокинов в крови стимулирует целый ряд проатерогенных нарушений, таких как гиперкоагуляция, инсулинорезистентность, перекисное окисление липидов, дислипидемия, эндотелиальная дисфункция [305]. В конечном итоге данных изменений разбалансированные уровни цитокинов способствуют увеличению риска развития атеросклероза даже во время протекания бессимптомной фазы болезни. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что, влияя на патогенетические механизмы РА, можно предотвратить развитие кардиоваскулярных осложнений данной болезни.

Редким клиническим проявлением РА является перикардит, при чем всегда у молодых лихорадящих пациентов с повышенным титром РФ, высоким уровнем СОЭ, анемией и ревматоидными узелками. Перикардит обычно адгезивный (50%) или выпотной (31-56%).

Миокардит диагностируется у 20% больных. Значительного воздействия на работу сердца и течение заболевания в целом он не оказывает. Крайне редко проявляется диффузный тяжелый миокардит с развитием сердечной недостаточности.

Также у пациентов с РА (в 3-5% случаев) имеют место клинически бессимптомные нарушения проводимости (обычно небольшое замедление внутрижелудочковой проводимости и умеренное удлинение интервала PQ на электрокардиограмме (ЭКГ)). Их причиной могут служить: ревматоидные узелки зоны, артериит мелких сосудов, интерстициальное воспаление, области фиброза.

Гранулематозное поражение клапанов может способствовать развитию пороков сердца с относительно невысокими клиническими

проявлениями. Чаще всего поражается митральный клапан и формируется умеренно выраженная митральная недостаточность, реже – митральный стеноз. Из аортальных пороков по частоте встречаемости на первом месте находится умеренно выраженная аортальная недостаточность, реже встречается аортальный стеноз.

У 15-20% пациентов с РА при гистологическом исследовании наблюдается артериит коронарных артерий и почти никогда не проявляется клинически, электрокардиографическими признаками коронарной недостаточности. У больных с РА результатом сопутствующего атеросклероза почти всегда оказываются инфаркт миокарда и стенокардия.

Некоторые из препаратов, применяемые в качестве базисной противовоспалительной терапии, воздействуют на риск формирования сердечно-сосудистых катастроф. Так, V.P. van Halm и соавт. заметили достоверное падение риска сердечно-сосудистых катастроф на фоне применения метотрексата по сравнению с больными, которые не принимали базисные противовоспалительные препараты [381]. H.K. Choi и соавт. в своем исследовании показали уменьшение сердечно-сосудистой смертности при продолжительном приеме метотрексата [279].

S. Suissa и соавт. в своей работе указали на снижение риска развития инфаркта миокарда на фоне применения базисных противовоспалительных препаратов [160], однако D.H. Solomon и соавт. отметили возрастание риска сердечно-сосудистых катастроф у больных, которые в качестве основного лечения принимали циклоспорин, азатиоприн, лефлуномид [230]. Известно, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов и ингибиторов циклооксигеназы 2 (ЦОГ 2) повышает риск развития ИМ [266, 339, 342]. Предполагают, что они способны понижать ЦОГ2-зависимый синтез простагландина (PGI₂) клетками сосудистого эндотелия, но не воздействуют на ЦОГ 1-зависимый синтез тромбоксана (TxA₂) тромбоцитами, что потенциально может способствовать нарушению баланса

PGI2/ТхА2, а значит к активации, агрегации и адгезии тромбоцитов и повышению риска тромбообразования [360].

Глюкокортикоиды (ГК) за счет увеличения содержания атерогенных липопротеидов также могут повысить риск образования сердечно-сосудистых осложнений [179, 235]. Однако М. Voergs и соавт. в своем научном эксперименте доказали, что ГК могут содействовать нормализации липидных нарушений, связанных с высокой воспалительной активностью РА [237]. D.H. Solomon и соавт. И S. Suissa и соавт. в своих научных изысканиях отмечают снижение риска кардиоваскулярных катастроф при продолжительном применении ГК [160, 230]. В эксперименте QUEST-RA продолжительный прием ГК был независимо взаимосвязан со снижением риска поражения сердечно-сосудистой системы, хотя это не согласуется с литературными данными относительно того, что длительное применение ГК стимулирует развитие артериальной гипертензии, миокардиодистрофии, аритмии, стероидного диабета. Существуют сведения о том, что применение ГК может приводить к гипергликемии [217, 343].

Основным признаком кардиоваскулярной патологии при развитии ревматоидного артрита является артериальная гипертензия. Артериальная гипертензия у пациентов с РА обычно стимулирует течение осложненного атеросклероза и изменение левых отделов сердца [4, 86, 94, 142]. Артериальная гипертензия – главный фактор риска развития кардиоваскулярных осложнений в общей популяции [4, 5, 35, 94, 138, 142]. Частота развития артериальной гипертензии при ревматоидном артрите коррелирует от 18 до 70,5% [91, 92, 93, 138]. Присутствие артериальной гипертензии у больных РА, особенно при тяжелых формах заболевания, существенно ремоделирует левые отделы сердца [5, 94]. Наличие тесной взаимосвязи артериальной гипертензии с тяжестью протекания болезни, активностью воспалительного процесса и серопозитивностью по РФ свидетельствует о корреляции хронического воспаления с повышением артериального давления (АД) [4, 5, 35, 94, 96, 142].

У пациентов с ранним РА наблюдалось увеличение содержания инсулина в плазме крови натощак и повышение частоты инсулинорезистентности [227]. М.С. Wasko и соавт. [193] доказали, что при РА частота развития инсулинорезистентности выше, а СД – примерно равна популяционной. В то же время, по данным D.H. Solomon и соавт. [340], встречаемость СД среди пациентов с РА (n=48 718) и в группе сравнения без ревматических заболеваний (n=442 033) составила 8,6 и 5,8 случая на 1000 пациентов соответственно, при этом относительный риск развития СД при РА был повышен в 1,5 раза. По результатам других экспериментов [171, 351], частота СД у больных с РА достигала 15–19%, что выше, чем в популяции среднего возраста (4–8%) [216]. Курение усугубляет течение РА, а также способствует повышению риска ИБС и ИМ в 3,5 раза [250, 350].

Большинство позитивных по РФ и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду пациентов ранним РА с высокой активностью болезни имеют высокий и очень высокий сердечно-сосудистый риск, что связано с высокой частотой традиционных факторов риска, субклинических и клинических признаков заболеваний кардиоваскулярной системы. Уменьшение риска развития кардиоваскулярных осложнений у пациентов ранним РА возможно только в том случае, если терапия будет направлена на удовлетворение двух целей. Кроме квалифицированного наблюдения за развитием РА необходим ответственный контроль сопутствующих патологических состояний. Кроме того, необходимо проведение дальнейших исследований, учитывающих влияние изменения образа жизни, базисных противовоспалительных препаратов, кардиопрепаратов (статинов, антигипертензивной терапии, сахароснижающих препаратов, антитромбоцитарной терапии и т. д.), генно-инженерных биологических препаратов, хирургических методов терапии ИБС на риск развития кардиоваскулярных осложнений у пациентов РА.

Липидный профиль при РА характеризуется подавлением уровня общего холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в периоды

воспаления, с пропорционально большим снижением липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), формируя неблагоприятное отношение общего холестерина к ЛПВП. Уровень липидов имеет парадоксальные отношения с риском ишемической болезни сердца при РА, так как более низкие уровни липидов связаны с более тяжелым системным воспалением, которое в свою очередь связано с повышенным риском ИБС [257]. Воспаление при развитии РА также изменяет структуру и функции липопротеинов [371]; отмечается изменение спектра апопротеинов ЛПВП, что приводит к появлению у данных частиц провоспалительных и проатерогенных эффектов и, как предполагается, делает их активными участниками ответа на воспалительную реакцию в организме [322]. Идентификация таких провоспалительных ЛПВП у пациентов с РА может способствовать выяснению возможного риска развития атеросклероза и дать новое направление для терапевтического вмешательства [205].

Пациенты с РА, чаще всего, имеют меньшую массу мышц и низкий индекс массы тела, который может возникнуть в результате неконтролируемого воспаления, ограничения физической активности, или сочетания обоих факторов. Сочетание низкой мышечной массы и высокой жировой массы является распространенным у пациентов с РА, и может быть даже более проблематичным с точки зрения развития заболеваний сердца [147]. Висцеральное ожирение при РА связано с резистентностью к инсулину, гипертензией, метаболическим синдромом, и большей степенью воспалительной нагрузки [147].

1.1.7. Роль свободнорадикальных процессов в патогенезе ревматоидного артрита

Существует достаточно большой массив данных, указывающих на то, что РА, также как и ряд других заболеваний, сопровождается развитием окислительного стресса. Как известно, одним из первичных звеньев системы

иммуногенеза, участвующих в развитии воспалительного процесса, в том числе и при РА, являются гранулоцито-макрофагальные клетки. При контакте данных клеток цельной крови с внешним сигналом инициируется процесс генерации АФК, отражающий особенности кислородного метаболизма клеток иммунной системы [56, 157, 231, 310]. Образовавшиеся в процессе иммунного ответа АФК непосредственно оказывают патогенное влияние на биомолекулы клеток, в частности, инициируют ПОЛ. Результатом интенсификации свободнорадикальных процессов биомолекул являются морфо-функциональные нарушения клеточных структур, деградация коллагена, повреждение соединительной ткани [225, 331, 333].

РА – воспалительное заболевание, характеризующееся хроническим воспалением синовиальных суставов, ассоциированным с пролиферацией синовиальных клеток и инфильтрацией активированными иммунновоспалительными клетками, включающими Т-клетки памяти, макрофаги и плазматические клетки, приводящие к прогрессирующей деструкции хряща и кости [225, 268]. Предполагается, что развитие этого воспалительного процесса опосредовано рядом цитокинов, таких как ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-23 и ИФН- γ [267]. Как известно, некоторые цитокины, в том числе ФНО- α и ИЛ-1 β , являются инициаторами NF- κ B-активаторного каскада [294] и находятся под его транскрипционным контролем, формируя петлю положительной обратной связи. ФНО- α принимает участие в фосфорилировании ингибитора киназы каппа, позволяющем димерам NF- κ B мигрировать в ядро и связываться с промоторами провоспалительных генов [286] и стимулировать активацию NADPH-оксидазы. Повышенная продукция цитокинов, обусловленная NF- κ B, может усиливать экспрессию молекул сосудистой адгезии, которые привлекают лейкоциты к суставу, так же как и матричные металлопротеиназы, способствующие деградации экстраклеточного матрикса.

Ряд проведенных исследований свидетельствуют о повышении активности прооксидантных ферментов наряду со снижением уровня антиоксидантов в сыворотке и синовиальной жидкости при РА. В результате работ с использованием синовиальной жидкости и тканей при РА было обнаружено окислительное повреждение гиалуроновой кислоты [299], образование продуктов ПОЛ [258], окисление ЛПНП [203] и возрастание уровня окисленных карбонильных групп белков [320]. Было выявлено существенное повышение уровня малонового диальдегида – вторичного продукта ПОЛ, в эритроцитах больных РА [357]. Также имеются свидетельства окислительного повреждения хряща, экстраклеточного коллагена и ДНК. ДНК лимфоцитов периферической крови пациентов с РА содержит значительно повышенный уровень промутагенного 8-оксогидродеоксигуанозина [300]. Образование NO также повышено в синовиальной ткани [316]. Jikimoto et al. [370] выявили корреляцию между активностью болезни и развитием окислительного стресса у пациентов с РА, в то время как по данным других исследований существенной зависимости обнаружено не было [233]. Предполагается наиболее строгая корреляция между повреждением ДНК и индексом, отражающим отношение между уровнями про- и антиоксидантов [233].

Эпидемиологические исследования показали, что РА чаще проявляется у предварительно здоровых лиц с низким уровнем циркулирующих антиоксидантов [156], что подразумевает патогенетическую роль окислительного стресса в развитии данного заболевания. Так, у пациентов с РА было обнаружено более низкое содержание таких антиоксидантов, как витамины Е и С, β -каротин, селен и цинк, в сыворотке крови по сравнению с контролем [155, 348], но эти взаимосвязи могут быть и результатом развития заболевания и его лечения [146].

Как показано, целый ряд факторов может быть вовлечен в генерацию АФК в суставах пациентов с РА. Внутрисуставное давление при данной патологии намного выше [240], что может индуцировать повторяющееся

повреждение сустава по пути ишемии/ реперфузии. Действительно, уровни pO_2 в синовиальной жидкости часто ниже обнаруживаемых в венозной крови [225]. Поврежденная ткань может высвобождать ионы железа и меди, являющиеся катализаторами свободнорадикальных реакций. Также было показано, что нейтрофилы из синовиальной жидкости при РА, но не при других видах артритов, находятся в активированном состоянии и внутриклеточно продуцируют АФК, вероятно, как результат активной обработки материала, поглощенного по пути эндоцитоза [239].

Представляется, что факторы окружающей среды, тоже участвующие в индукции и прогрессировании болезни, также могут быть вовлечены в генерацию свободных радикалов. Недавние исследования свидетельствуют, что курение является сильным фактором риска развития заболевания у носителей HLA-DR4 [250]. Курение – широко известный источник АФК. Сигаретный дым содержит несколько органических соединений, среди которых – хиноны, источник радикалов семихинона, способных генерировать $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 [210].

Считается, что свободные радикалы являются медиаторами повреждения ткани при РА в сочетании с провоспалительными цитокинами. Их роль в деградациии хряща и кости не является неожиданной. Известно, что белки хрящевой ткани могут подвергаться фрагментированию под действием $O_2^{\bullet-}$, а СОД сильно ингибирует этот процесс. АФК способствуют деградациии синовиальной жидкости и деполимеризации гиалуроновой кислоты, что ведет к потере вязкости хряща, инактивации анти-протеиназ и индукции резорбции кости [265]. $O_2^{\bullet-}$ продуцируется остеокластами во время резорбции кости на границе остеокласт-кость [224]. Эти эффекты многократно усиливаются в присутствии цитокинов, таких как ИЛ-1 β [301].

Исследования, проведенные методом ДНК-комет, продемонстрировали повреждение ДНК у пациентов с РА [233]. АФК-индуцированные генотоксические эффекты были также связаны с мутациями гена-супрессора опухоли p53, наблюдаемыми в фибробластоподобных синовиоцитах при РА,

что может объяснить, по крайней мере, частично, трансформированный фенотип этих клеток и их неполноценный апоптоз [337].

В дополнение к АФК, также было исследовано действие активных форм азота при РА. Последние способны участвовать в активировании NF- κ B, так же как и образовании пероксинитрита, нарушающего редокс-баланс глутатиона [165, 166].

Некоторые исследования, проведенные на модельных животных с РА, также указывают на роль свободных радикалов в патогенезе данного заболевания. Введение витамина Е и СОД оказывало защитный эффект [225, 383]. У мышей, генетически дефектных по СОД3, повышалась как тяжесть коллаген-индуцированного артрита, так и продукция провоспалительных цитокинов [150, 374].

Хотя в литературе имеется ряд данных относительно участия свободных радикалов и реактивных молекул в развитии повреждения клеток при РА, в то же время конкретные механизмы возникновения и патогенеза данного заболевания, многие аспекты, касающиеся особенностей свободнорадикального гомеостаза в этих условиях, остаются до конца не выясненными. Кроме того, имеющиеся результаты исследования активности АОС организма при этой патологии носят противоречивый характер. Так, в ряде работ имеются указания на разнонаправленные изменения активности антиоксидантных ферментов - СОД, ГП, каталазы в крови больных, страдающих РА [355, 357, 382].

Имеются сведения о повышении активности СОД, ГП в эритроцитах, ГТ в плазме крови и существенном снижении уровня восстановленного глутатиона и аскорбиновой кислоты в эритроцитах, содержания витамина Е и активности каталазы в плазме крови пациентов с РА по сравнению с контролем, что свидетельствует о нарушении функционирования АОС [357, 382].

1.2. Механизм образования и роль свободных радикалов

Основная масса молекулярного O_2 (93 – 95%) тратится на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов. Меньшая его часть (2-5 %) переходит в АФК и затем частично расходуется для окислительной модификации макромолекул [65]. Свободные радикалы – это чрезмерно реакционноспособные окислители, выполняющие важнейшие функции в процессах метаболизма клеток в условиях нормы, а при генерации в избыточных концентрациях – являющиеся факторами разрушения основных структур клеток и в конечном итоге их гибели [119, 120].

В настоящее время принято классифицировать радикалы образующиеся в нашем организме на природные и чужеродные [22]. Основными источниками чужеродных радикалов могут быть ксенобиотики, а также разнообразные соединения: кислород, вода, и другие соединения эндогенного происхождения, подвергшиеся воздействию ультрафиолетового облучения, ионизирующего излучения, интенсивного светового воздействия лазера [31].

Природные радикалы классифицируют на первичные и вторичные. К первичным радикалам можно отнести $O_2^{\cdot-}$, NO^{\cdot} , убихинон (Q^{\cdot}) – транспортер электронов в дыхательной цепи. Из первичного радикала – $O_2^{\cdot-}$ – в результате его метаболических превращений могут генерироваться СР: H_2O_2 , гидроперекиси липидов, гипохлорит [20]. При взаимодействии первичных радикалов, а также различных веществ с металлами переменной валентности (прежде всего Fe^{2+}) происходит образование вторичных радикалов – OH^{\cdot} и липидных радикалов (L^{\cdot} , LO^{\cdot} , LOO^{\cdot}), обладающих явным разрушающим эффектом по отношению к клеточным компонентам [122].

СР образуются в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий в монаминооксидазной реакции, протекающей на внешней митохондриальной мембране [1, 122]. От уровня интенсивности дыхания зависит степень генерации АФК. Кроме полного четырехэлектронного восстановления

молекулы O_2 до воды в дыхательной цепи митохондрий в аэробных клетках всегда происходит и неполное – одно, двух и трехэлектронное восстановление с образованием различных АФК. Это $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и наиболее активный OH^{\cdot} . В ЭТЦ генерация АФК наблюдается при функционировании практически всех дыхательных комплексов, которые могут осуществлять одноэлектронный транспорт. Предполагают, что главным участком ЭТЦ, на котором происходит одноэлектронное восстановление кислорода с образованием $O_2^{\cdot-}$, является III комплекс [140, 191].

Еще одним источником АФК, является окислительное дезаминирование биогенных аминов с образованием H_2O_2 под влиянием моноаминоксидазы, локализованной на внешней мембране митохондрий. Это обеспечивает значительный вклад в повышение резистентности концентрационного градиента АФК между матриксом митохондрий и цитозолем в клетке.

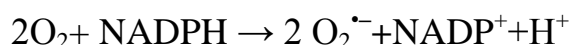
Достаточно интенсивная генерация СР, в частности $O_2^{\cdot-}$, происходит в реакциях микросомального окисления с участием цитохрома Р-450 [181].

Цитохром Р-450 - это группа оксигеназ, которая способствуют оксигенированию в мембранах эндоплазматического ретикулума продуктов метаболизма и ксенобиотиков. Промежуточным продуктом этих реакций является $O_2^{\cdot-}$. Генерация $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 осуществляется при самопроизвольном окислении гемоглобина, восстановленных цитохромом b_5 гидрохинонов, ферредоксинов, адреналина [131].

Известно, что АФК могут генерироваться не только внутриклеточно, но и внеклеточно при содействии лейкоцитов [79, 110]. Полиморфноядерные лейкоциты содержат несколько систем генерации СР и являются основными клетками, продуцирующими АФК при воспалении [80]. К ним относятся, кроме мембраносвязанной NADPH-оксидазы, эозинофильная пероксидаза, миелопероксидаза нейтрофилов и NO-синтетаза.

Фагоциты и макрофаги уничтожают поврежденные, старые или иммунологически несовместимые клетки, а также способствуют разрушению

злокачественных клеток и клеток, пораженных вирусами [175]. Остеокласты для разрушения кости используют АФК. Во всех этих случаях клетки – защитники быстро поглощают большое количество O_2 и затем при помощи расположенной в плазматической мембране NADPH – оксидазы используют его для образования АФК, что сопровождается «дыхательным взрывом»:



В последнее время обнаружены регуляторные функции АФК. Они стимулируют накопление в клетке вторичных посредников – циклонуклеотидов: циклического аденозинмонофосфата (сАМР) и циклического гуанозинмонофосфата (сGMP), при этом последний образуется в результате активации OH^{\bullet} гиалоплазматической гуанилатциклазы [255, 358]. АФК способствуют аккумуляции ионов Ca^{2+} в цитозоле и индукции фосфорилирования белков посредством активации протеинкиназ и протеинтирозинкиназ и ингибирования протеинфосфатаз; активируют белок Ras, играющий важную роль в передаче сигнала в ядро клетки.

Аккумулятивный при инвазии вирусов и бактерий пероксид водорода, индуцирует транскрипционный фактор NF- κ B, что сопровождается стимуляцией ряда цитокинов и иммунных рецепторов, ассоциированных с иммунным и воспалительным ответами, а также к активации белков острой фазы и адгезии. NO^{\bullet} выполняет роль нейромедиатора и принимает участие в регуляции скорости кровотока [109]. Образование АФК приводит к обновлению липидных и белковых компонентов мембран, синтезу ряда биологически активных веществ (простогландинов, тромбоксанов, лейкотриенов), предупреждает злокачественную трансформацию клеток.

В ряде исследований показано, что избыточная генерация АФК является важнейшим патогенетическим фактором развития многих патологических состояний. Негативное действие СР связано, прежде всего, с их влиянием на структурное состояние и функции биологических мембран. Это приводит к увеличению вязкости мембран и к частичной утрате

барьерных функций. Наблюдается также изменение под действием СР функциональных свойств ряда ферментов, углеводов и белков[139].

1.2.1. Механизм генерации активных форм кислорода и их биологическая роль

Наибольшее количество кислорода расходуется в митохондриальной системе, дающей энергию клеткам в форме АТФ. В организме существуют энзимы, катализирующие прямые реакции между своими субстратами и O_2 . К числу таких энзимов можно отнести флавопротеидные оксидазы. Оксидация ксантина, гипоксантина, L- и D-аминокислот происходит коротким путем. Атомы водорода от данных веществ с помощью флавиновых коферментов перемещаются на молекулярный кислород, избегая систему цитохромов и цитохромоксидазы. Конечным продуктом оксидации в этих случаях является пероксид водорода, а не вода [20, 65]. Образующаяся H_2O_2 может распадаться под действием каталазы или расходоваться в реакциях, катализируемых пероксидазой. Пероксид водорода образуется в реакциях, протекающих с участием флавиновых железопротеидов, медьсодержащих оксидаз, ферментов, имеющих в составе молибден (ксантиндегидрогеназа, ксантиноксидаза, альдегидоксидаза). Моноамино-, диамино-, глицин-, гликольоксидазы перемещают водород на молекулярный кислород с образованием H_2O_2 , используя флавопротеиды. Оксигенированию в мембранах эндоплазматической сети гепатоцитов подвергаются различные продукты метаболизма, чужеродные вещества. Промежуточным продуктом данных реакций является супероксидный радикал $O_2^{\cdot-}$, который генерируется в процессе реакций, катализируемых диоксигеназами (чаще катализируют разрыв двойной связи в ароматическом кольце). Формирование $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 происходит при самопроизвольном окислении гемоглобина, ферредоксинов, тетрагидроптеридинов, восстановленных цитохромом b_5 гидрохинонов, адреналина. Формирование активных форм кислорода катализируют ионы

железа. АФК постоянно продуцируются при взаимодействии O_2 с флавиномононуклеотидом (FMN) или флавинадениндинуклеотидом (FAD) - флавиновыми коферментами [22, 45, 174].

$O_2^{\cdot-}$ генерируется в митохондриальной дыхательной цепи в QH_2 -цитохром-с-редуктазном комплексе, а также в нейтрофильных лейкоцитах и макрофагах, в которых активные формы кислорода используются для уничтожения фагоцитированных микроорганизмов. Известно, что в митохондриях в ЭТЦ возможно неполное восстановление кислорода: в случае присоединения только двух электронов синтезируется перекись водорода, одного – супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$). Супероксид продуцируется и в других электронно-транспортных клеточных системах [16, 21].

Следовательно, представленные выше данные говорят о том, что генерация АФК может осуществляться: в процессе перемещения электронов в митохондриальной дыхательной цепи; в реакциях, которые катализируются оксидазами, в том числе в свободнорадикальных процессах, происходящих в фагоцитах; в реакциях микросомального окисления при обезвреживании ксенобиотиков с участием цитохрома Р-450; в реакциях самопроизвольного (неферментативного) оксигенирования соединений; в биологических системах с присутствием ионов металлов с переменной валентностью и, прежде всего, железа (свободных атомов) [70, 116, 212].

Свободные радикалы могут индуцировать пероксидное окисление полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), играющее существенную роль во многих реакциях обмена, формировании структуры клетки и, в частности, мембран. Синтезированные перекиси липидов лучше растворяются в воде, чем ПНЖК, из которых они генерируются, и поэтому легче вымываются из мембран, содействуя самообновлению мембранных компартментов [17, 57, 99].

Известно, что интенсификация свободнорадикальных процессов, перекисного окисления ПНЖК происходит при развитии стресса, то есть

практически во всех патологически острых состояниях, обострениях хронических болезней и др. Аккумуляция АФК, перекисей в больших объёмах способствует множеству негативных изменений:

- Нарушениям жидкокристаллической структуры липопротеидов мембран;
- Структурно-функциональным изменениям ферментных систем дыхания;
- Уменьшению прочности биологических мембран: набуханию и разрушению митохондрий, разрушению мембран;
- окислению сульфгидрильных групп энзимов;
- снижению биосинтеза макроэргических соединений (АТФ);
- разрушению мембран эритроцитов, снижению уровня процессов дыхания, развитию гемолиза;
- дезорганизации транспортных механизмов переноса ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и др.), различных метаболитов между цитозолем, митохондриями и рибосомами;
- снижению процессов биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, других соединений;
- повреждению (разрывом) лизосом с выходом гидролитических ферментов;
- аккумуляции (в результате изменения окислительно-восстановительных процессов) продуктов промежуточного обмена, в том числе молочной кислоты, окси-, кетокислот, и развитию ацидоза; инактивации глутатиона, липоевой кислоты и др [13, 172, 211, 221].

1.3. Общая характеристика антиоксидантной системы

Разрушающему действию СР противодействует система противooksидательной защиты, главным звеном которой являются антиоксиданты – соединения, способные тормозить, снижать интенсивность

СО, нейтрализовывать СР путем обмена своего атома водорода (в большинстве случаев) на кислород свободных радикалов.

Как известно, главными дышащими органеллами клетки являются митохондрии, содержащие большое количество активных ферментов и коферментов в дыхательной цепи и являющиеся потенциальными источниками СР [83].

Главный антиоксидант митохондрий - коэнзим Q10, или убихинон, который находится практически во всех тканях организма. Общеизвестным фактом является то, что коэнзим Q10 является транспортером электронов в дыхательной цепи, в то же время обеспечивает протекцию липидов биологических мембран и липопротеидов крови от воздействия пероксидного окисления, а также защищает дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и белки от окислительной модификации.

По происхождению антиоксиданты можно разделить на 2 группы: природного (биоантиоксиданты) и синтетического [14, 27, 33, 124]. В состав данных соединений входит подвижный атом водорода и поэтому они легко взаимодействуют со свободными радикалами, а также катализаторами свободнорадикального окисления и, прежде всего, с ионами металлов переменной валентности. Подвижность атома водорода обусловлена непрочной связью с атомами углерода (С-Н) или серы (S-H). В результате взаимодействия образуются малоактивные радикалы самого антиоксиданта, которые не способны к продолжению цепи, гидроперекиси расщепляются без диссоциации на активные радикалы (под действием серосодержащих веществ), синтезируются комплексоны с металлами переменной валентности. Ряд антиоксидантов не обрывает, а снижает скорость продолжения цепи, т. е. характеризуется пролонгирующим действием. Несмотря на малую активность радикалов антиоксидантов, их аккумуляция в клетках нежелательна. Антиоксиданты могут уничтожать свободные радикалы еще до развития эффекта разрушения биомолекул [41, 52, 55]. Жирорастворимые биоантиоксиданты (токоферолы, фосфолипиды, каротиноиды, витамин А,

витамины группы К, убихинон, стероидные гормоны) проявляют свои протекторные свойства в биологических мембранах, водорастворимые (аскорбиновая, никотиновая, лимонная кислоты, серосодержащие соединения – гомоцистеин, цистеин, церулоплазмин, липоевая кислота, бензойная, фенольные соединения – флавоноиды, полифенолы, лактоферрин, альбумин, трансферрин, мочева кислота, мочевины) – в цитозоле клеток, межклеточной жидкости, лимфе, плазме крови. Защита от разрушающего воздействия СР происходит на всех уровнях организации: от клеточных мембран до организма в целом [3, 127, 221].

В процессе эволюции в клетках для защиты от АФК образовались специализированные энзиматические системы антиоксидантов, которые инактивируют реакции СО как на стадии формирования СР, так и на стадии образования пероксидов и различаются высокой специфичностью действия, клеточной и органной локализацией. Их функциональная активность зависит от наличия металлов, чаще всего железа, которое обычно встречается в составе гема, а также от наличия меди, цинка и марганца [37].

Различают три линии защиты от АФК:

1. ферментативные антиоксиданты: СОД, каталаза, пероксидазы, ГР (глутатионредуктаза) и ГП;
2. макромолекулярные неферментативные компоненты: трансферрин и другие белки сыворотки, церулоплазмин, гаптоглобины;
3. низкомолекулярные компоненты: витамины А, Е, К, убихинон, аскорбиновая кислота, женские половые гормоны, тироксин, билирубин, стероидные гормоны.

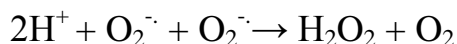
Особенно важным аспектом эффективности энзиматического звена АОС является сбалансированность активности СОД, каталазы и пероксидазы. Снижение активности одного из энзимов антиоксидантной системы может способствовать к избыточной аккумуляции АФК и разрушению клеток.

1.3.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы

1.3.1.1. Супероксиддисмутаза и каталаза

Говоря об особенностях функционирования ферментного звена АОС, следует заметить, что реакции дисмутации $O_2^{\bullet -}$ радикала и разложения H_2O_2 экзотермичны, а катализирующие данные реакции СОД и каталаза не нуждаются в кофакторах, что делает их активность, не зависящей от работы других клеточных структур.

СОД (КФ 1.15.1.1) – один из основных ферментов АОС. Супероксиддисмутаза (металлоферменты) катализируют реакцию:



Механизм функционирования СОД включает последовательное восстановление и окисление ионов металла переменной валентности в активном центре фермента. Обнаружено несколько изоферментов СОД, отличающихся строением активного центра, среди которых наибольшей активностью обладает Cu-, Zn-СОД. Несколько позднее были обнаружены марганец – СОД и железо – СОД.

У эукариотов Cu-, Zn-содержащая СОД обнаружена практически во всех аэробных клетках. Она локализована в основном в цитоплазме эритроцитов, в межмембранном пространстве митохондрий, в цитоплазме и ядре нервных клеток. Энзим чувствителен к цианиду, является металлопротеидом, в состав которого входят две субъединицы, каждая из которых связывает 1 атом Cu и 1 атом Zn, и имеет внутри цепи дисульфидный мостик, одну сульфгидрильную группу и ацетилированную концевую аминогруппу [385].

Для каталитической активности фермента нужны ионы меди [387]. Ионы цинка прямо не участвуют в реакции дисмутации и выполняют структурную роль, обеспечивая конформацию белка, необходимую для работы активного центра фермента [208].

Mn-SOD находится в митохондриях печени и миокарда эукариот, вблизи анионных каналов. Оба фермента состоят из двух субъединиц, имеют близкий аминокислотный состав [246, 388]. Железо-содержащая СОД обнаружена только у прокариот.

Описанные выше изоферменты супероксиддисмутазы являются внутриклеточными ферментами, в межклеточной жидкости они распадаются в течение 5-10 минут. Существует также экстрацеллюлярная высокомолекулярная форма супероксиддисмутазы (120 000 Д), хорошо соединяющая гепаринсульфатом гликокаликса эндотелиоцитов. Она представляет собой гликопротеид, состоящий из двух димеров, соединенных дисульфидным мостиком. Каждая из 4 – х субъединиц имеет молекулярную массу около 30 кДа, содержит ионы меди и цинка. Все субъединицы фермента имеют одинаковую аминокислотную последовательность [364]. Субъединицы экстрацеллюлярной и цитоплазматической Cu-, Zn-SOD отличаются аминокислотным составом, антигенными свойствами [285], генным локусом, кодирующим аминокислотную последовательность апофермента. Высокий уровень экстрацеллюлярной СОД обнаружен в легких, сердце, почках, плаценте. Ингибируется цианидом, инактивируется H_2O_2 . Ионы железа блокируют секрецию фермента. Экстрацеллюлярной СОД отводят роль основного регулятора биоактивности NO [236].

У человека общее количество Cu-, Zn-SOD может достигать до 3900 мг. Высокий уровень Cu-, Zn-SOD и Mn-SOD обнаружен в печени, в эритроцитах, что позволяет использовать кровь в качестве источника выделения фермента. Содержание этих изоформ в органах и тканях менее варьирует по сравнению с экстрацеллюлярной Cu-, Zn-SOD, которая уступает им в количественном отношении [264].

Супероксиддисмутаза увеличивает скорость дисмутации $O_2^{\cdot-}$ радикала. Однако, несмотря на высокую специфичность фермента, при определенных условиях Cu-SOD может взаимодействовать с H_2O_2 и играть роль прооксиданта.

Образующийся в процессе дисмутации $O_2^{\cdot-}$ пероксид водорода, восстанавливается до воды в основном каталазой и ГП.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) - гемсодержащий фермент с молекулярной массой около 240000 Д, разлагающий H_2O_2 без присутствия акцепторов кислорода, а донором электронов является сам H_2O_2 [82]. Каталаза состоит из 4-х одинаковых субъединиц, и содержит четыре гемовых группы на одну молекулу энзима. Находится главным образом в пероксисомах, частично - в микросомах и в меньшей мере - в цитозоле. Предполагают, что данный энзим не имеет высокого сродства к H_2O_2 и в цитозоле не может эффективно обезвреживать H_2O_2 вследствие низких концентраций. В пероксисомах, где концентрация H_2O_2 высока, каталаза активно разрушает его.

Каталаза широко распространена в бактериях, грибах, тканях растений, животных, млекопитающих. Известно, что каталаза содержится во всех органах и тканях организма, но свою наивысшую активность она реализует в печени. В эритроцитах фермент находится в комплексе с никотинамидадениндинуклеотидфосфатом восстановленным (NADPH). При этом динуклеотид, не являясь основой для проявления каталитической активности, предохраняет энзим от инактивации. Каталаза способна длительное время сохранять высокую активность. Она практически не нуждается в энергии активации, а скорость реакции разложения H_2O_2 определяется лишь скоростью диффузии субстрата к его активному центру.

Разложение H_2O_2 каталазой происходит в два этапа: Fe^{3+} -каталаза + 2 $H_2O_2 \rightarrow$ окисленная каталаза + $H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}$ -каталаза + H_2O_2 + O_2 . В окисленном состоянии каталаза функционирует как пероксидаза. В пероксидазной реакции субстратами могут быть этанол, метанол, формиат, формальдегид и другие доноры водорода.

Активности каталазы и СОД коррелируют между собой, что может быть взаимосвязано с переключением потока электронов с одной цепи транспорта на другую. В этих условиях СОД и каталаза работают как

составляющие одной системы утилизации кислорода, расположенные в разных участках клетки.

Недавно были созданы модифицированные препараты СОД и каталазы, связанные с иммуноглобулинами, сывороточным альбумином, высокомолекулярными спиртами, в частности, полиэтиленгликолями, что улучшает стабильность ферментов и продолжительность их циркуляции в крови [76]. Подобные связанные формы энзима используются в исследованиях эндотоксикоза, ожогов кожи, региональной ишемии, инфаркта миокарда, а также при стрессовых и воспалительных повреждениях тканей.

1.3.1.2. Роль системы глутатиона в процессах антиоксидантной защиты

Одной из главных систем обезвреживания СР являются восстановленный глутатион и комплекс ферментов – ГП, ГТ и ГР.

Глутатион восстановленный – тиол, присутствующий во многих микробных, растительных и во всех животных клетках [218]. Является трипептидом (гамма-глутамил-цистеинилглицин), биосинтез и катаболизм которого осуществляется так называемым глутамильным циклом.

Синтез данного тиола происходит в печени, откуда он транспортируется в другие органы и ткани. GSH, может проявлять свою антиоксидантную активность несколькими способами: химически реагировать с $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} ; напрямую разрушать СР; стабилизировать структурно-функциональное состояние мембран [67].

GSH является коферментом ряда энзимов, активность которых связана с изменениями редокс-потенциала глутатиона. Активность ГП и скорость утилизации H_2O_2 напрямую пропорциональна концентрации GSH в клетке. Конъюгирование ксенобиотиков и удаление пероксидов липидов клеточных мембран, осуществляемое ГТ, происходит только при участии GSH [53].

GSH необходим для поддержания реакций аскорбат-глутатионового цикла, ассоциированного с нейтрализацией H_2O_2 . Здесь его основная функция, как восстанавливающего соединения, состоит в рециклировании аскорбиновой кислоты от окисленной до восстановленной формы с помощью фермента дегидроаскорбатредуктазы. Основной же фонд GSH поддерживается глутатионредуктазой, выступающей в качестве неотъемлемого компонента этого цикла [129].

Благодаря наличию SH-группы в молекуле, восстановленный глутатион способен участвовать в различных процессах [309]. Окисляясь по SH-группе, он принимает участие в разнообразных метаболических превращениях. GSH (рис. 1) во многих реакциях является донором атомов водорода, при этом из двух молекул с образованием дисульфидной связи синтезируется димер, который является окисленной формой глутатиона (GSSG).

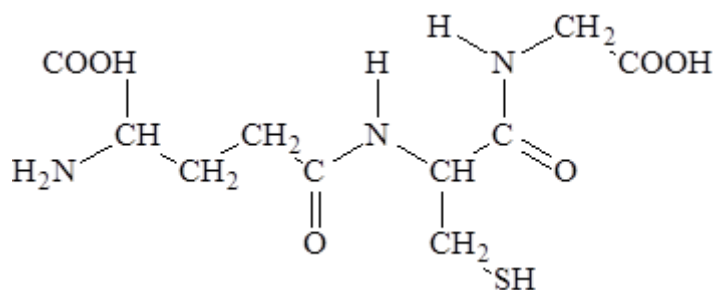


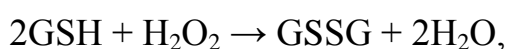
Рис. 1. Структурная формула восстановленного глутатиона

Кроме того, существуют ферменты, активность которых подвержена редокс-регуляции: оксигенация или восстановление по дисульфидной связи воздействует на их активность. Как правило, прямо или косвенно, восстановление таких ферментов осуществляется GSH.

GSSG – низкомолекулярный тиол, обнаруживаемый во всех видах клеток и внеклеточном пространстве. В норме содержание GSSG в тканях и плазме крови млекопитающих поддерживается на уровнях, во много раз более низких, чем для GSH.

У анаэробных микроорганизмов – прокариот и некоторых эукариот, глутатион, как правило, отсутствует, но присутствует почти у всех аэробов.

ГП (КФ.1.11.1.9) гомотетрамер с молекулярной массой 74–75 кД, каждая субъединица состоит из 171–201 аминокислотных остатков. ГП является Se-содержащим ферментом, что в значительной мере определяет антиоксидантные свойства. Примерно 70% ее находится в цитоплазме и около 30% - в митохондриях всех клеток млекопитающих [176]. Инактивация глутатионпероксидазой H_2O_2 и органических гидроперекисей происходит в следующих реакциях:



ГП катализирует реакцию восстановления гидроперекиси с помощью глутатиона. Фермент обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к гидроперекисям, но абсолютно специфичен к глутатиону. Сродство ГП к H_2O_2 выше, чем у каталазы. В связи с этим, глутатионпероксидаза более эффективно работает при низких концентрациях H_2O_2 [66], в то же время при высоких концентрациях субстрата, ключевая роль принадлежит каталазе.

Стресс через α -адренергические рецепторы, сАМР и протеинкиназу индуцирует активность ГП. ГП играет активную роль в протекции лизосомальных мембран от ПОЛ [349].

В клетках млекопитающих существует семейство мультифункциональных белков – глутатионтрансфераз (КФ 2.5.1.18), использующих глутатион для конъюгации с гидрофобными соединениями и восстановления органических перекисей [228]. Реакции с участием ГТ разнообразны. ГТ вступают в ряд реакций, характерных для других ферментов: 1) восстанавливают органические гидропероксиды, как селеновая ГП; 2) восстанавливают некоторые дисульфиды, как тиолтрансферазы; 3) осуществляют изомеризацию или образуют сложные тиоэфиры, как группа ферментов, использующих GSH в качестве кофермента. ГТ выделены из

многих источников. Глутатионтрансферазная активность обнаруживается в различных тканях животных многих видов и человека [243]. Эти ферменты локализованы в основном в цитозоле клеток. Все ГТ - гомо- или гетеродимеры с молекулярной массой 43-57 кДа. В каждой субъединице есть по одному независимому активному центру; в гетеродимерах субъединицы сохраняют свои каталитические свойства, характерные для каждой из них. В активном центре различают G- и H- субцентры. Первый субцентр связывает GSH в вытянутой конформации, что свойственно и другим ферментам метаболизма GSH. В этом субцентре находятся гистидин, аргинин и SH-группа. Субцентр H содержит глицин и связывает гидрофобный субстрат. Главная функция ГТ в печени - защита клеток от ксенобиотиков и продуктов перекисного окисления липидов за счет их восстановления при участии глутатиона.

ГР (КФ. 1.8.1.7) — локализованный в цитозоле NADPH – зависимый фермент, который вместе с ГП имеет наибольшее значение для поддержания в организме определенного уровня GSH [332]. ГР поддерживает уровень активного глутатиона путем восстановления его дисульфидной формы с помощью NADPH как донора водорода:



Известно, что ГР-реакция необратима, исходя из данных о восстановительном потенциале равновесия – $\text{GSSG} = 2\text{GSH}$ [324]. Ранее установлено, что тиоловые группы в молекуле фермента обеспечивают акт взаимодействия с GSSG через формирования смешанного дисульфида: фермент-SH + GSSG = фермент-SS-G + GSH [145]. Путем кристаллографических исследований установлено, что передача электронов осуществляется от NADPH к GSSG через флавин и редокс-активный мостик, присутствующие в молекуле фермента. Так как донором электронов служит NADPH, образование GSH в отсутствие восстановительных эквивалентов активизирует трансмембранную ЭТЦ, которая использует цитоплазматические доноры электронов [311].

В каталитической схеме человеческой ГР остаток Cys-58 принимает участие в обмене тиолов и взаимодействии с GSSG. Гистидин 467, связанный с глутаматным остатком (Glu-472), выполняет 2 функции. В структуре ГР важная роль принадлежит изоаллоксановому кольцу молекулы FAD [190]. FAD экваториально присоединяет протон к N5, что приводит к формированию энергетического барьера для образования восстановленной формы FAD.

ГР это флавопротеид с молекулярной массой 102–250 кДа, который состоит из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит четыре структурных домена. На одном конце каждой из них расположен FAD, на другом – NAD(P)H – связывающие участки. Субъединицы связаны между собой S–S-связью, являющейся центром симметрии молекулы ГР. Наиболее высокая активность энзима найдена в эритроцитах, почках, тонком кишечнике [200].

ГР высокоспецифична к глутатиону. С низкой скоростью может катализировать реакции восстановления ряда других соединений, содержащих дисульфидную связь.

GSH, ГП, ГТ, ГР и NADPH образуют глутатионовую антиоксидантную систему, в которой ГР и NADPH необходимы для восстановления GSSH и, следовательно, рециклирования GSH. Эта система особенно важна при окислительном стрессе, т. е. при накоплении АФК, который вызывается гипербарическим кислородом, ионизирующим излучением и многими ксенобиотиками – пероксидантами.

1.3.1.3. Характеристика NADPH – генерирующих ферментов

Функционирование глутатионредуктазной - глутатионпероксидазной системы (ГР/ГП) поддерживается с помощью NADPH. Одними из основных поставщиков NADPH для данной системы в сердце крыс являются – Г6ФДГ и NADP – ИДГ.

Изоцитратдегидрогеназа (ИДГ) - фермент, который имеет две формы коферментной специфичности: NAD – зависимая изоцитратдегидрогеназа (NAD – ИДГ КФ 1.1.1.41) и NADP – ИДГ (КФ 1.1.1.42). Катализирует окислительное декарбоксилирование D,L — трео-Ds-изоцитрата в 2-оксоглутарат.

Известно, что NAD – ИДГ – фермент цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), локализован в митохондриях и является одним из пунктов контроля функционирования ЦТК [282]. Физиологической ролью цитоплазматической NADP – ИДГ является генерирование NADPH, который используется в различных биосинтетических реакциях [182]. Продукт реакции – 2 – оксоглутарат, поставляет углеродные скелеты для синтеза ряда аминокислот. Таким образом, реакция, катализируемая NADP – ИДГ является пунктом пересечения путей углеродного и азотного метаболизма.

Известно, что клетки млекопитающих содержат три класса изоферментов ИДГ: митохондриальные NAD⁺- и NADP -зависимые ИДГ и цитоплазматическую NADP⁺- зависимую ИДГ.

NAD – ИДГ – олигомерный фермент, который состоит из восьми субъединиц. Присоединение изоцитрата к первой субъединице приводит к изменению конформации других субъединиц, увеличивая скорость присоединения субстрата. Фермент аллостерически активируется ADP и Ca²⁺, которые присоединяются к ферменту в разных аллостерических центрах. В присутствии ADP происходит изменение конформации всех субъединиц, что приводит к значительно более быстрому связыванию изоцитрата. Таким образом, при концентрации изоцитрата, которая характерна для митохондриального матрикса, незначительные изменения концентрации ADP могут вызвать существенное изменение скорости катализируемой реакции. Увеличение активности ИДГ снижает концентрацию цитрата, что, в свою очередь, уменьшает ингибирование цитратсинтазы продуктом реакции. При повышении концентрации

никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADH) активность фермента снижается.

NADP – ИДГ присутствует во многих тканях, при этом, наибольшее ее содержание отмечается в сердце, печени и скелетной мускулатуре [345]. В основном NADP-ИДГ находится в цитоплазме клетки (около 90 %) и лишь небольшое количество присутствует в митохондриях.

Г6ФДГ (КФ 1.1.1.49) – фермент, катализирующий первую реакцию пентозофосфатного пути (ПФП), которая представляет собой NADP⁺ - зависимое окисление глюкозо – 6 – фосфата (Г6Ф). Фермент специфически использует в качестве акцептора электронов NADP⁺. Он осуществляет дегидрирование Г6Ф и восстановление кофермента никотинамидадениндинуклеотидфосфата окисленного (NADP) с образованием 6-фосфоглюконо-β-лактона и одной молекулы восстановленного кофермента – NADPH [71]. Эта реакция является обратимой. Равновесие суммарной реакции сильно смещено в сторону образования NADPH, который при восстановленном биосинтезе выступает в роли донора электронов. Физиологическая роль дегидрогеназ ПФП заключается в восстановлении NADP⁺ до NADPH, восстановительные эквиваленты которого расходуются в биосинтетических процессах, окислительно – восстановительных реакциях [384].

При недостаточности Г6ФДГ прием некоторых лекарственных средств ведет к массивному внутрисосудистому разрушению эритроцитов (гемолитические кризы), что сопряжено с дефицитом в них GSH и дестабилизацией мембран.

Для животных клеток Г6ФДГ является цитозольным ферментом и присутствует во всех тканях. Он обнаружен также в пероксисомах и митохондриях печени крыс.

1.3.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы

Помимо антиоксидантных ферментов, защиту клеток от окислительных повреждений осуществляет также ряд природных соединений, которые подразделяются на группы гидрофильных и липофильных антиоксидантов. К гидрофильным относятся GSH и некоторые другие SH – содержащие соединения, мочева кислота, аскорбат, билирубин и др. К наиболее распространенными липофильными антиоксидантами можно отнести: каротиноиды, токоферол, убихинон и флавоноиды [7].

1.3.2.1. Жирорастворимые антиоксиданты

Витамины E (α -токоферол), A (ретинол) находятся и обезвреживают свободные радикалы в жировом слое клеточных мембран. Биологически более активным из токоферолов является α -токоферол. Токоферол стабилизирует мембранные структуры, в которых происходят процессы свободнорадикального окисления, препятствует синтезу липоперекисей, разрушает цепь свободнорадикального окисления путем уничтожения свободных радикалов в момент их образования. Молекулы витамина E находятся во внутренних мембранах митохондрий [222, 361]. Они предохраняют их, а также лизосомы от разрушающего влияния перекисей, способствуют поддержанию функциональной целостности внешней цитоплазматической мембраны клеток и являются основным фактором устойчивости эритроцитов к гемолитическим ядам. Витамин E эффективно прекращает цепные свободнорадикальные реакции в процессе перекисления ненасыщенных жирных кислот в мембранах, останавливает атерогенные изменения ЛПНП. Аскорбиновая кислота *in vitro* регенерирует окисленную форму токоферола. Наличие данного свойства (взаимодействия между этими витаминами) *in vivo* достоверно не подтверждено. α -Токоферол уменьшает необходимость в глутатионпероксидазе с помощью снижения аутоокисления

липидов мембран. Необходимо отметить прямую зависимость между витамином E и тканевым дыханием и обратную связь со степенью окисления липидов [15, 38].

Витамин A необходим для синтеза серосодержащих биомолекул, и обезвреживания эндогенных соединений и ксенобиотиков. Выступая в качестве антиоксиданта он предотвращает преобразование сульфгидрильных групп в дисульфидные. Может принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях за счет наличия двойных связей в молекуле, которые увеличивают скорость окисления других веществ. Антиоксидантная способность витамина A обусловлена его участием в стабилизации функционально-структурных свойств мембран и в обмене тиоловых соединений. Окисленные промежуточные продукты β -каротина и витамина A могут оказывать прооксидантное действие. При повышенном уровне кислорода β -каротин может проявлять прооксидантную активность. Каротин тратится на обезвреживание окислированных липопротеидов низкой плотности, а также взаимодействует с синглетным кислородом [116, 219, 253].

Витамины C, E, β -каротин входят в состав антиоксидантной витаминной группы и их попадание в организм уменьшает риск развития рака, катаракты, сердечно-сосудистых нарушений [335].

Из всех каротиноидов β -каротин обладает максимальной биохимической активностью. β -каротин является ингибитором свободнорадикального окисления, в том числе протекающего с участием синглетного кислорода. Он, кроме выраженного антиоксидантного действия, участвует в процессах деления иммунокомпетентных клеток, синтезе иммуноглобулинов и др. [36].

Убихинон (коэнзим Q) необходимый участник окислительных процессов. Он локализован преимущественно в мембранах митохондрий. Активно участвует в транспорте электронов по дыхательной цепи на участке между флавиновыми ферментами и цитохромами [27].

Наличие липидофильности стероидных гормонов обеспечивает их мембранотропные свойства. Эстрогены - стероидные гормоны, обладающие антиоксидантным действием. В случаях, когда содержание эстрогенов снижается, активность свободнорадикального окисления увеличивается, и наоборот. Эстрогены участвуют в регуляции микросомального окисления, поддерживая активность монооксигеназной системы. При заболеваниях, которые сопровождаются дисбалансом между интенсивностью свободнорадикальных процессов и активностью АОС, эстрогены предупреждают нарушения микросомального окисления, противодействуют повреждению биомембран [104, 118].

1.3.2.2. Водорастворимые антиоксиданты

Витамин С, один из самых важных водорастворимых антиоксидантов, в организме человека не синтезируется, а поступает с пищевыми продуктами, в т.ч. в виде окисленной формы – дегидроаскорбиновой кислоты. Как важный компонент биологической антиоксидантной системы данное соединение взаимосвязано с глутатионом и токоферолом. Аскорбиновая кислота участвует в микросомальном окислении эндогенных и чужеродных соединений, стимулирует активность цитохромного звена, процессы гидроксилирования (выполняет функции восстановителя). От наличия аскорбиновой кислоты зависит фагоцитарная активность нейтрофилов и макрофагов, их антимикробные свойства, активность цитохрома Р-450. Основную протекторную функцию в качестве антиоксиданта витамин С выполняет при токсическом воздействии различных веществ. Аскорбиновая кислота является кофактором для ряда монооксигеназ, участвуя, таким образом, в процессах гидроксилирования пролина, катаболизма тирозина [48, 335].

В тканях всех животных и человека содержится глутатион (гамма-глутамилцистеининглицин) – самое распространенное тиоловое соединение в

клетках. В состав глутатиона входит нетипичная гамма-связь между Glu (глутаминовой кислотой) и Cys (цистеином). Восстановителем является тиольная группа цистеинового остатка.



Восстановленный глутатион – основной антиоксидант эритроцитов, который служит коферментом при восстановлении метгемоглобина в функционально активный гемоглобин. Восстановленный глутатион и глутатионпероксидаза трансформируют липоперекиси в менее токсичные оксикислоты и этим предотвращают повреждение биоструктур. Увеличение уровня глутатиона осуществляется за счет аминокислот, в состав которых входит сера [66, 189].

Существенную роль в функционировании АОС играют биомолекулы, содержащие сульфгидрильные группы. К ним относятся аминокислоты — цистеин, метионин, цистин, входящие в состав белков, активных центров ферментов, ряда гормонов (инсулин, окситоцин). Кроме того, они являются предшественниками глутатиона и коэнзима А [123, 207].

Липоевая кислота работает как окислительно-восстановительная система: она может существовать как в окисленной, так и в восстановленной форме, реализуя, таким образом, свои коферментные функции [123].

Церулоплазмин – транспортная форма меди, является универсальным внеклеточным «гасителем» свободных радикалов. Он обладает супероксиддисмутазной активностью: способен восстанавливать в крови супероксидные радикалы до кислорода и воды, тем самым предотвращая липидные структуры мембран от повреждения. Одной из важнейших функций церулоплазмينا является детоксикация свободных радикалов, генерируемых макрофагами и нейтрофилами во время фагоцитоза, а также при усилении свободнорадикального окисления в очагах воспаления. Церулоплазмин обеспечивает транспорт меди из печени к органам и тканям, где она необходима для выполнения каталитических функций такими ферментами как цитохром-С-редуктаза и супероксиддисмутаза [113].

К внеклеточным антиокислительным системам относят трансферрин (железотранспортный белок), лактоферрин (железосвязывающий белок), ферретин. Находясь в составе указанных протеинов, железо не участвует в катализе свободнорадикального повреждения [68]. В нейтрализации свободных радикалов, связывании ионов меди может участвовать альбумин, молекула которого содержит одну сульфгидрильную группу. К водорастворимым антиоксидантам относится мочеви́на – конечный продукт пуринового обмена. Мочевая кислота, находящаяся во внутренних средах организма может обезвреживать свободные радикалы [75, 95].

В зависимости от генотипа, а также от поступления в организм индукторов окислительного стресса зависят особенности функционирования антиоксидантной системы в различных органах и тканях. Продолжительная, а также часто повторяющаяся, интенсификация свободнорадикального окисления приводит к истощению антиоксидантной системы. Антиоксидантные комплексы восстанавливают (пополняют) пул основных антиоксидантных соединений в организме, которые интенсивно тратятся при патологических состояниях [11, 103, 124].

1.4. Производные гуанидина и сфера их применения

Гуанидин $((\text{H}_2\text{N})_2\text{C}=\text{NH})$ – бесцветное кристаллическое вещество, обладающее едким вкусом и щелочной реакцией. Расплавляется на воздухе вследствие поглощения влаги. Получен впервые Штрекером в 1861 году при окислении гуанина смесью бертолетовой соли и соляной кислоты. Гуанидин – это амидоимид угольной кислоты [111, 359].

Гуанидин сильное однокислотное основание, сравнимое по силе ($pK_a 13,5$) с NaOH и KOH. При протонировании (75,3 кДж/моль) дает катион гуанидиния, в котором положительный заряд равномерно распределен между тремя атомами азота. Длина связи C—N в катионе 0,132 нм. Гуанидин в воде гидролизуеться до мочевины (50% за 20 сут при 29 °C) [30].

Сам по себе гуанидин токсичное соединение, однако, гуанидиновые производные включают широкий спектр веществ, обладающих различными химическими, физическими и физиологическими эффектами и в связи с этим их изучение представляет большой интерес. Производные гуанидина высоко эффективны и менее токсичны для человека. Они широко распространены в природе и находят применение в качестве физиологически активных веществ: лекарств, антисептиков. К ним относятся, например: аминокислота аргинин, фолиевая кислота, многочисленные белки и нуклеиновые кислоты. Гуанидины служат активным началом многих лекарственных веществ и антибиотиков. Соли гуанидина, применяют в промышленности [164, 180].

Некоторые производные гуанидина, такие как бифункциональные нуклеофилы, могут участвовать в различных реакциях гетероциклизации. К таким гетероциклическим соединениям относятся, например: аллильные гуанидины, бигуанидины и другие. Аллильные гуанидины снижают содержание сахара в крови; гуанидиновые соли ацетилсалициловой кислоты (аспирин) обладают жаропонижающими, противовоспалительными свойствами, способны предотвращать коагуляцию тромбоцитов [229, 368].

В 20-х годах XX столетия появились первые искусственно синтезированные бигуаниды (Синталин А и Синталин В), однако они не нашли широкого применения из-за высокой гепатотоксичности. Только в 1956–1957 гг. были предложены современные препараты – бигуаниды: фенформин (фенэтилбигуанид), метформин (N,N-диметилбигуанид) и буформин (L-бутилбигуанид). Бигуаниды – широко применяемый класс лекарственных препаратов, полный спектр действия которых до настоящего дня остается неизвестным. В России из группы бигуанидов применяется только метформин (МФ). МФ хорошо переносится, практически не метаболизируется в организме и экскретируется почками в неизменном виде [241].

1.4.1. Кардиопротекторное действие синтетических производных гуанидина

Наряду с хорошо известным антигипергликемическим действием гуанидиновые производные, в частности МФ (рис. 2), обладают целым рядом кардиопротективных эффектов. Результаты исследования показали, что применение МФ позволило уменьшить риск сосудистых осложнений на 40% [245].

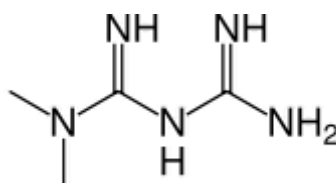


Рис. 2. Структурная формула метформина

Существуют сведения о гемодинамических эффектах МФ, подчеркивающие существенную роль препарата в профилактике и торможении прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний. Установлено, что МФ оказывает благоприятное влияние на систему гемостаза и реологию крови, способен не только тормозить агрегацию тромбоцитов, но и значительно уменьшать риск образования тромбов. Продемонстрировано, что МФ оказывает влияние на структуру фибрина и снижает агрегацию тромбоцитов – факторы, играющие важную роль в тромбозе артерий [38, 112, 126].

Из литературных данных известно, что применение препарата метформина улучшает процессы фибринолиза, что связано с уменьшением содержания ингибитора активатора плазминогена-1 (ИАП-1), инактивирующего тканевый активатор плазминогена [194]. Помимо этого, метформин обладает и непрямым механизмом уменьшения содержания ИАП-1 [248, 289]. Адипоциты висцеральной жировой ткани синтезируют значительно больше ИАП-1, чем адипоциты подкожно-жировой клетчатки, а

применение метформина способствует снижению массы висцерального жира [84].

Имеются данные исследований, что *in vitro* метформин обладает антиатеросклеротическим свойством, влияя на ранние стадии развития атеросклероза, снижая адгезию моноцитов, их трансформацию и способность захватывать липиды [180, 185, 248]. Метформин подавляет включение липидов в сосудистую стенку и пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов. Кроме того, метформин обладает вазопротективным действием, которое проявляется в нормализации цикла сокращения/расслабления артериол, снижении проницаемости сосудистой стенки и торможении процессов неоангиогенеза, регенерации функции пейсмекерных клеток, контролирующей циклическую вазодвигательную активность [185, 252]. Применение метформина увеличивает транспорт глюкозы в эндотелий и гладкие мышцы сосудов, а также в миокард. Кроме того, метформин имеет антиоксидантную активность, обусловленную торможением клеточных окислительных реакций, в том числе и окислительного гликозилирования белков [248, 274].

Производные бигуанида (рис. 3) способны проявлять кардиопротекторные действия через ингибирование процессов свободнорадикального окисления – одного из ключевых патогенетических факторов развития сердечно-сосудистой патологии. Так, метформин способен ингибировать 1 комплекс ЭТЦ митохондрии и связанную с ним генерацию АФК в ЭТЦ [297]. Кроме того, метформин способен ингибировать NADPH-оксидазу, работа которой сопряжена с образованием супероксидного анион-радикала [272].

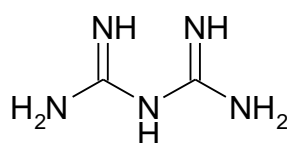


Рис. 3. Структурная формула бигуанида

Также имеются данные, что метформин способен проявлять свою кардиопротекторную активность через активирование АМР-зависимой протеин киназы (АМРК). АМРК – гетеротримерный белок, который работает как внутриклеточный энергетический сенсор [223]. АМРК активируется различными стрессорными воздействиями, такими как отсутствие глюкозы, физическая работа, гипоксия, оксидативный стресс и ишемия, которые как усиливают потребность в энергии, так и нарушают её продукцию. Всё это приводит к увеличению соотношения АМР/АТР, к которому и чувствительна АМРК. Активированная АМРК повышает активность катаболических путей, приводящих к выработке энергии, таких как гликолиз и β -окисление жирных кислот, и тормозит процессы, в которых АТР расходуется путём фосфорилирования ряда ключевых ферментов путей метаболизма глюкозы, жирных кислот, синтеза белка [386].

Особенно важна роль АМРК в тканях с высокими энергетическими потребностями, таких как нервные ткани и сердечная мускулатура. Известно, что АМРК активируется при ишемии, так как производство АТР путём окислительного фосфорилирования снижается из-за недостатка кислорода и питательных веществ. Однако пролонгированный гликолиз может быть невыгоден из-за накопления вредных продуктов, таких как молочная кислота и протоны, которые устранены механизмами, поглощающими энергию [259].

Значение работы АМРК в течение повреждения, вызванного ишемией-реперфузией, достаточно широко известно. При использовании генонокаутированных мышей с низким уровнем фосфорилирования α -АМРК наблюдалась высокая апоптотическая смертность клеток при ишемии сердца, что подтверждает протекторную роль АМРК при повреждениях ишемии-реперфузии [373].

На модели изолированного крысиного сердца показано, что введение метформина вначале реперфузии значительно уменьшает снижение сердечной функции, поражённой ишемией [273]. Метформин способен активировать АМРК за счёт двух эффектов: приводит к увеличению уровня

цитозольного AMP в сердце и является промотором взаимодействия AMPK и LKB1 – одной из киназ, активирующих AMPK [148, 389].

1.4.2. Влияние некоторых производных гуанидина на свободнорадикальные процессы у человека и животных

Известно, что на фоне хронической гипергликемии повышается уровень СР. В настоящее время окислительному стрессу (ОС) отводится ключевая роль не только в развитии сосудистых осложнений СД, но и многих других патологических состояний, в частности, сердечно-сосудистых. Основной точкой приложения ОС является сосудистый эндотелий. В результате его воздействия снижается эндотелий-зависимая вазодилатация, значительно возрастает активность протромботических и пролиферативных факторов с развитием гемостаза, тромбозов, пролиферации гладкомышечных клеток. Формирования атеромы начинается с активации свободными радикалами экспрессии молекул адгезии на поверхности эндотелиальных клеток. Возрастает интенсивность пероксидного окисления липидов с образованием пенистых клеток. В настоящее время снижение эндотелий-зависимой вазодилатации связывают с нарушением продукции СР – оксида азота (NO), который принимает участие в регуляции тонуса сосудов, влияет на их проницаемость и является антипролиферативным фактором. Недостаточная продукция NO способствует повышению тонуса сосудов, проницаемости для белков и липидов, ускорению пролиферации гладкомышечных клеток. В результате ускоряется процесс атерогенеза в крупных сосудах и повреждаются самые мелкие сосуды [104, 120, 226, 289].

Установлено, что МФ оказывает тормозящее действие на ОС. Доказано, что МФ обладает антиоксидантной активностью и способен к подавлению клеточных окислительных реакций, в том числе и окислительного гликозилирования белков [162, 291, 347].

Согласно научным данным препарат может либо непосредственно перехватывать СР, либо опосредованно уменьшать их содержание за счет торможения внутриклеточного формирования $O_2^{\cdot-}$, основным источником которого является окисление NADPH-оксидазой [341].

МФ может частично ослаблять развитие ОС путем торможения формирования гликозилированных белков. В дополнение к уменьшению количества связанных с гликозилированными белками окислителей, МФ ослабляет гликозилирование антиоксидантных ферментов, например, СОД. У крыс с СД применение МФ также тормозит ПОЛ плазмы крови [112, 136, 347].

Защитное действие МФ против ОС может объясняться торможением клеточных окислительных реакций. Антиоксидантная активность МФ может в значительной степени объяснять улучшение процессов микроциркуляции, в частности, ослабление адгезии лейкоцитов и проницаемости венул при геморрагическом шоке [121, 137, 315].

Итак, положительные эффекты МФ можно подразделить на:

- 1) опосредованные сахароснижающие: снижение уровня гликемии, инсулинемии и инсулинорезистентности;
- 2) сосудистые: улучшение фибринолиза, гемореологических показателей, увеличение кровотока, торможение интенсивности развития атеросклероза и тромбообразования. Нормализация углеводного обмена обеспечивает снижение глюкозотоксичности, в результате чего уменьшается уровень гликированных белков и интенсивность ОС [248, 252, 353].

1.4.3. Биологические эффекты синтетических производных гуанидина

Соли полигуанидина являются поверхностно-активными веществами. Препараты гуанидинового ряда очень часто используются в составе антисептиков для обработки кожных покровов (хлоргексидин, октенидин). Препараты на основе производных гуанидина на сегодняшний день

считаются наиболее перспективными для обработки поверхностей, проведения текущей уборки как малотоксичные соединения с пролонгированным действием (при условии благоприятной эпидемиологической обстановки). Хлоргексидин (рис. 4), катионный бис-бигуанид, является биоцидом с низкой токсичностью для млекопитающих и широким спектром антибактериальной активности. Механизм его действия связан с разрушением мембран, вызывающим концентрационно-зависимое ингибирование роста и гибель клеток [197].

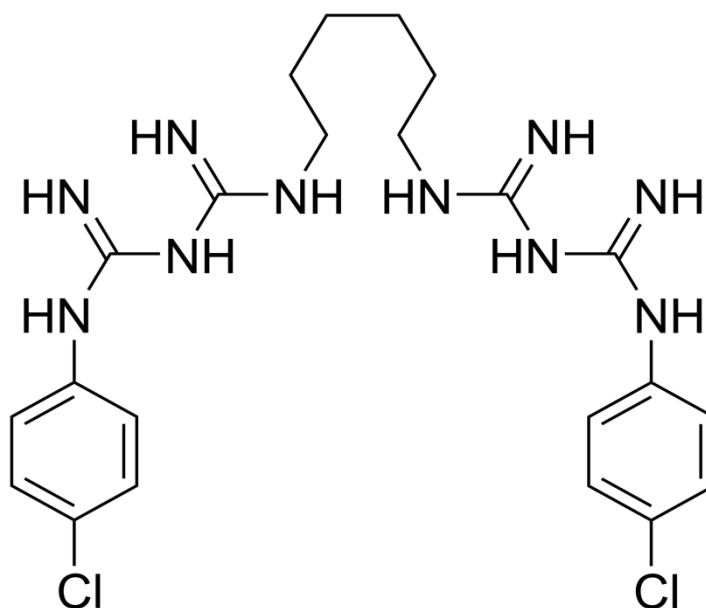


Рис. 4. Структурная формула хлоргексидина

В последние годы большой интерес исследователей вызывает новый класс полимеров – полимерные биоциды, которые являются более эффективными и менее опасными для человека по сравнению с низкомолекулярными биоцидными веществами, традиционно применяемыми в различных отраслях народного хозяйства.

Среди широкого спектра полимерных биоцидов выделяют группу соединений, содержащих в своем составе гуанидиновую группировку – эти соединения легкодоступны, высокоэффективны, обладают широким спектром бактерицидного действия и при этом являются малотоксичными

веществами, не проникают через кожу и не накапливаются в организме. Наибольшее значение приобрели четыре из них: ацетат-1-додецил-гуанидина (додин) – для борьбы с грибковыми поражениями сельскохозяйственных культур, а также в качестве эффективного антисептика; 1,17-бис-(гуанидино)-9-аза-гептадекан (гуазатин) – пестицид, входит в качестве заменителя ртутно-органических веществ в коммерческие составы протрав для семян; дигуанидины с центральными длинноцепочечными метиленовыми группировками (синтеллины) – обладают не только бактерицидными и фунгицидными свойствами, но и высокой активностью в подавлении трипаносом; и полигексаметиленгуанидин (метацид) – антисептическое средство, используемое при хранении архивных материалов (бумага, кино- и фотопленка) [159].

Производные гуанидина, в частности агматины и хордатины, имеются и среди специфических веществ, с помощью которых растения защищаются от атаки микроорганизмов. Отсюда можно заключить, что биоцидный эффект гуанидиновых соединений физиологичен, и что в живом организме имеются ферментные системы, способные вызывать деградацию этих соединений.

Для объяснения увеличения МФ чувствительности периферических тканей к инсулину предложено два механизма: ингибирование электронного переноса в транспортной цепи комплекса I дыхательной цепи и активация АМРК [151, 185, 307].

МФ в последнее время привлекает внимание своим эффектом по отношению к митохондриям. Он мягко ингибирует комплекс I (NADH-убихинон-редуктаза), а также эффективно ингибирует индуцированную комплексом I генерацию АФК у изолированных митохондрий, этот эффект связан с блокированием обратного потока электронов [292, 297].

Основной точкой приложения действия МФ являются митохондрии. МФ инактивирует глюконеогенез и вызывает экспрессию транспортеров глюкозы с последующим улучшением утилизации глюкозы, посредством подавления

клеточного дыхания [356]. В изолированных гепатоцитах крыс МФ уменьшает внутриклеточное содержание АТФ, подавляет активность пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы и активирует конверсию пирувата в аланин. МФ способен подавлять глюконеогенез из таких предшественников глюкозы, как лактат, пируват, глицерол и некоторых аминокислот, а также противостоять глюконеогенетическому действию глюкагона. В первую очередь это происходит по причине снижения поступления перечисленных субстратов глюконеогенеза в гепатоциты и инактивирования его ключевых ферментов – пируваткарбоксилазы, фруктозо–1,6–бифосфатазы и глюкозо–6–фосфатазы. Данное соединение, способствуя повышению степени кровообращения в печени и усиливая процесс превращения глюкозы в гликоген, увеличивает синтез гликогена в печени [247, 251, 363].

Значительный интерес привлекает АМР-активируемая протеин-киназа в клеточных сигнальных процессах. Она активируется с возрастанием соотношения АМР:АТФ, что делает ее весьма чувствительной к изменению клеточного метаболического статуса [344]. АМРК может активироваться рядом фармакологических препаратов, включая бигуаниды: МФ; его более потентный аналог фенформин (ФФ) и другие производные гуанидина. ФФ активирует АМПК путем ингибирования комплекса I в митохондриальной дыхательной цепи, что приводит к изменению внутриклеточного уровня АМР и, следовательно, соотношения АМР:АТФ. В отдельном исследовании найдено, что ФФ и МФ ингибируют протеолиз белков миокарда [275, 277, 278, 308].

Наряду с этим МФ влияет и на жировой обмен. Лечение бигуанидами оказывает позитивное влияние на метаболизм липидов плазмы в связи с гиполипидемическим и антиатерогенным эффектом [149].

Ряд бигуанидов находит применение в качестве противомикробных и противопаразитарных средств, в частности, при лечении малярии.

Для профилактики малярии применяются прогуанил (рис. 5) и хлорпрогуанил, представляющие собой пролекарства и действующие за счет образующихся в организме активных метаболитов. Активный метаболит прогуанила действует на тканевые формы всех типов малярийного плазмодия, обладает медленной шизонтоцидной активностью. Кроме того, проявляет споронтоцидное действие, в результате которого нарушается цикл развития плазмодиев в теле комара [242].

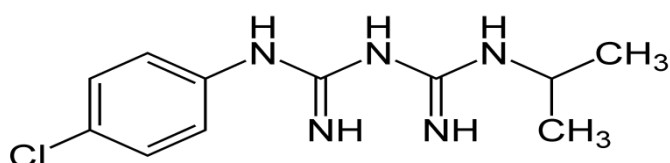


Рис. 5. Структурная формула прогуанила

Исследовался синергетический потенциал ряда бигуанидов в сочетании с противомаларийными препаратами. Все исследуемые бигуаниды (фенформин, прогуанил, хлорпрогуанил, синталин) показали значительный синергетический эффект. Сами бигуаниды имеют весьма малую антималярийную активность. Существуют доказательства, что прогуанил, например, проявляет свой антималярийный синергетический эффект путем сенсibilизации паразита к митохондриальному деполяризующему действию противомаларийных препаратов [196].

Механизм их действия связан с влиянием на митохондрии млекопитающих. Положительно заряженные бигуаниды накапливаются в митохондриях под воздействием их мембранного потенциала. Предполагают, что это накопление влияет на потерю нормальных функций митохондрий через воздействие на ионный гомеостаз. Хотя митохондрии малярийных паразитов слабо изучены, они имеют ряд сходств с митохондриями млекопитающих. Поддержание трансмембранного потенциала является важным фактором их жизнеспособности [183, 184, 195, 280].

В последнее время установлена возможность использования производных бигуанидов или фармацевтически приемлемых солей этих соединений, наиболее полезной формой, которых является метформин, для производства медицинских препаратов с заживляющим действием.

Заживление ран или подобных повреждений на тканях различного типа как правило зависит от пролиферации новых тканей – эпителиальной, эндотелиальной и соединительной. Таким образом, этот процесс включает ряд скоординированных клеточных и молекулярных событий. Он может быть приостановлен или изменен метаболическими нарушениями, которые сопровождают определенные продолжительные заболевания, такие как венозная недостаточность, воспалительные заболевания артерий, диабеты и даже некоторые методы лечения.

Известно, что одним из осложнений диабета является появление кожных болезней, таких как язвы (или даже язвенный некротический ангиодерматит) или перфорирующий дерматоз, который обычными лекарственными средствами не удается ни контролировать, ни лечить.

Фармацевтические составы, основанные на бигуанидах, также уже известны. Однако они применяются только для лечения некоторых форм диабета, и главным образом II инсулиннезависимого типа, в качестве антигипергликемических средств, которые способствуют возвращению к гликемическому равновесию. Метформин – это производное бигуанида, наиболее часто используемое в таком типе лечения. Он считается хорошо переносимым медицинским препаратом.

Метформин обладает выраженными заживляющими свойствами, то есть стимулирующим действием по отношению к сложному физиологическому явлению, характеризующемуся, среди прочего, повышенным клеточным ростом в зоне ранения. Эта преходящая пролиферация возникает в ответ на утрату целостности кожи и обеспечивает восстановление глубоко залегающих тканей и воссоздание эпидермиса в области ран.

Учитывая трудности, с которыми сталкиваются при контроле качества природных заживляющих продуктов и количество трудоемких этапов, необходимых для выделения этих соединений, производные бигуанида, синтез которых является простым, полным и быстрым, оказываются очень выгодным действующим веществом.

Еще в прошлом веке с помощью некоторых фармакологических средств, в частности антидиабетических бигуанидов, удалось снизить у мышей и крыс частоту спонтанных и индуцированных химическими канцерогенами или радиацией новообразований. В ряде экспериментов показано, что антидиабетический бигуанид МФ увеличивал продолжительность жизни и тормозил развитие рака молочной железы у трансгенных мышей HER-2/neu. Применение МФ в клинике снижает риск развития злокачественных новообразований у пациентов, страдающих сахарным диабетом 2 типа [198, 271, 304].

Весьма интересным результатом исследования оказалось значительное снижение МФ дыхательной активности клеток карциномы человека, что выражается в снижении потребления ими кислорода. Возможный механизм действия связан с увеличением потребности в ионах Ca^{2+} , стимулирующих открытие митохондриальных пор [144, 276].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектом исследования являлись самцы лабораторных крыс-альбиносов (*Rattus norvegicus*) (m=150-200 г.), находящиеся на стандартном режиме вивария.

Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отраженных в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (УК РФ ст. 245).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Создание модели кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, у крыс

Моделирование кардиоваскулярного патологического состояния осуществляли путем подкожного введения адреналина. В настоящее время в экспериментальных исследованиях все чаще используется методика моделирования острого поражения миокарда, известная под названием экспериментальный адреналиновый миокардит (катехоламиновая миокардиодистрофия) [28, 51, 114]. Во многих работах она упоминается как модель катехоламинового (метаболического) инфаркта миокарда [101]. Кроме того в некоторых работах для описания данной модели используются следующие термины: «ишемическое повреждение миокарда» [87], «острое гипоксическое поражение сердца» [51], «острый адреналиновый некроз

миокарда» [133], «экспериментальное адреналиновое повреждение миокарда» [130]. Однако во всех вышеуказанных случаях экспериментальная патология развивается по одному патогенетическому механизму.

Для моделирования патологического состояния гормон вводили здоровым животным в дозе 0,15 мл на 100 г массы тела в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl. Инъекцию осуществляли однократно. Развитие КН, индуцированных введением адреналина, контролировали путем определения уровня активности маркерных ферментов в сыворотке крови подопытных животных (креатинкиназы-МБ (КК-МВ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ)).

В качестве протекторов использовали синтетические производные гуанидина 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, которые вводили двукратно (в дозах 12,5 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг в 1 мл 0,9% NaCl). Животных забивали на следующий день эксперимента.

В ходе эксперимента животные были разделены на десять экспериментальных групп: в 1-ю группу (n = 19) входили животные, находящиеся в стандартных условиях вивария (контроль); во 2-ю группу (n = 15) входили животные с КН, индуцированными введением адреналина; в 3-й группе (n = 18) животным с патологией внутрибрюшинно вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 12,5 мг на 1 кг веса животного, в виде раствора в 1 мл 0,9% раствора NaCl, дважды – один раз через 15 мин, а затем через 4 часа после инъекции катехоламином; самцам крыс 4-й группы (n = 18) таким же способом вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг на кг; самцам крыс 5-й группы (n = 20) по вышеуказанному порядку вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг на 1 кг веса животного; самцам крыс 6-й группы (n = 20) по аналогичному способу вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг на кг веса животного; самцам крыс 7-й группы (n = 18) по вышеотмеченному порядку вводили 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг на кг; самцам крыс 8-й группы (n = 19) аналогичным способом по аналогичному порядку вводили 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг на 1 кг веса животного; самцам крыс 9-й группы (n = 20) таким же способом вводили 2,4-

ДМФБ в дозе 50 мг на кг веса животного; самцам крыс 10-й группы (n = 18) по представленной выше схеме вводили 2,4-ДМФБ в дозе 75 мг на кг. Спустя 24 часа после инъекции адреналина у наркотизированных самцов крыс забирали кровь и извлекали сердце.

2.2.2. Моделирование кардиоваскулярного патологического состояния индуцированием ревматоидного артрита у крыс

Экспериментальный ревматоидный артрит (ЭРА) вызывали путём подкожного введения в подушечку лапки полного адьюванта Фрейнда – комплекса соединений, вызывающего развитие данной патологии, в объёме 100 мкл [369]. Инъекцию осуществляли однократно. Развитие КН контролировали с помощью определения уровня маркерных ферментов (аспартатаминотрансферазы и креатинкиназы-МБ) в сыворотке крови подопытных животных. Для подтверждения развития ЭРА использовали биомаркеры патологии: измерение РФ, СОЭ, толщины лапок крыс.

В качестве протекторов использовали синтетические производные гуанидина 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, которые вводили ежедневно, однократно, начиная с 7-го дня после введения адьюванта Фрейнда (в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг в 1 мл 0,9% NaCl). Животных забивали на 15-й день эксперимента.

Во время исследования животные были разделены на шесть экспериментальных групп: в 1-й группе (n = 19) самцы белых лабораторных крыс находились в стандартных условиях вивария (контроль); 2-ю группу (n = 15) составляли животные с ЭРА, вызванным введением адьюванта Фрейнда; в 3-й группе (n = 18) животным с патологией внутрибрюшинно вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг на 1 кг веса животного, в виде раствора в 1 мл 0,9% раствора NaCl, ежедневно, однократно, начиная с 7-го дня после введения адьюванта Фрейнда; крысам 4-й группы (n = 18) по аналогичной схеме вводили 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг на кг; крысам 5-й группы (n = 19) по

представленной выше схеме вводили 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг на 1 кг веса животного; крысам 6-й группы (n = 20) по представленной выше схеме вводили 2,4-ДМФБ в дозе 50 мг на кг веса животного. На 15 день эксперимента после введения адьюванта Фрейнда у наркотизированных животных забирали кровь и извлекали сердце.

2.2.3. Получение тканевого гомогената

Извлеченное у наркотизированных животных сердце многократно промывали ледяным физиологическим раствором и осушали фильтрованной бумагой, затем измельчали ножницами. Полученную ткань миокарда взвешивали на торсионных весах и растирали в фарфоровой ступке в 3х-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Полученный гомогенат фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и осаждали в ходе центрифугирования при 10000g в течение 12 минут для седиментации неразрушенных тканевых элементов и мембран кардиомиоцитов. Оценку исследуемых параметров проводили в надосадочной жидкости.

Забор крови осуществляли в чистую стеклянную пробирку без содержания антикоагулянта и инкубировали в термостате 0,5 часа при температуре 37 °C, после расслаивания фаз собирали супернатант и разделяли его методом центрифугирования при 3000g в течение 10 мин. Для последующего исследования использовали полученную сыворотку.

2.2.4. Оценка оксидативного статуса

2.2.4.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции

Скорость протекания процессов СО оценивали с помощью метода железоиндуцированной хемилюминесценции пероксидом водорода. Принцип

метода состоит в каталитическом разложении пероксида водорода ионами металла с переходной валентностью – Fe^{2+} , по реакции Фентона: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$. Синтезированные при этом свободные радикалы (R^\bullet , OH^\bullet , RO^\bullet , RO_2^\bullet , O_2^\bullet) инициируют СО в биологических образцах. В результате взаимодействия радикалов RO_2^\bullet в среде появляется неустойчивый тетроксид, распадающийся с высвобождением кванта света. Скорость протекания свободнорадикальных процессов анализировали на биохемилюминиметре БХЛ-07М с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемилюминесценции снимали в течение 30 секунд (периода максимальной информации об его интенсивности) и оценивали следующие показатели: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), дающие характеристику интенсивности свободнорадикальных процессов, и значение тангенса угла наклона кривой ($\text{tg}\alpha_2$), характеризующее общую антиоксидантную активность [39, 135]. Метод позволяет определить уровень компенсаторных механизмов свободнорадикального процесса в организме, в связи с тем, что на скорость протекания исследуемого процесса воздействует полный комплекс веществ, обладающих как антиоксидантными, так и прооксидантными свойствами. Общеизвестна высокая чувствительность биохемилюминесценции на выявление патологических процессов в организме.

В состав среды для определения интенсивности биохемилюминесценции входили следующие компоненты: 0,4 мл 0,1М калий-фосфатного буфера (рН 7,5), 0,4 мл 0,01ММ FeSO_4 , 0,2 мл 2%-ного раствора H_2O_2 (вносимого непосредственно перед измерением). Перед добавлением 2%-ного раствора H_2O_2 в кювету вносили исследуемый биологический материал крыс в объеме 0,1 мл.

2.2.4.2. Определение содержания диеновых конъюгатов

Уровень диеновых конъюгатов (ДК) оценивали спектрофотометрически при длине волны 233 нм. Принцип метода: при протекании процессов пероксидного окисления липидов на стадии генерации АФК в молекулах полиненасыщенных жирных кислот образуется система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением максимума при $\lambda=233$ нм [125].

0,25 мл биологического образца встряхивали в течение 15 мин в 9 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом в соотношении 1:1. Полученную взвесь перемещали в плотно закрывающиеся пробирки. Образцы разделяли центрифугированием при 4000g в течение 10 мин. Супернатант собирали в мерные пробирки и приливали 1/10 объема дистиллированной воды. После двукратного встряхивания происходило разделение фаз, затем отбирали гептановый слой. К одинаковым объемам по 0,5 мл добавляли этанол в соотношении 1:5 – 1:10. Контролем служил 96% этиловый спирт.

Расчет концентрации первичных продуктов липопероксидации в гомогенате ткани осуществляли по формуле:

$$[\text{ДК}] = \frac{V_{\text{общ}} \times D \times 10^6}{L \times E \times m \times V_{\text{внес.}}}, \text{ мкМ/г}$$

Уровень диеновых конъюгатов в сыворотке крови вычисляли по формуле:

$$[\text{ДК}] = \frac{D \times 10^6}{L \times E \times V_{\text{внес.}}}, \text{ мкМ/мл}$$

где [ДК] – концентрация диеновых конъюгатов; $V_{\text{общ}}$ – объём полученного образца, мл; D – значение оптической плотности, ед.; L – длина оптического пути, см; E – коэффициент молярной экстинкции, равный $2,2 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$; $V_{\text{внес.}}$ – объём вносимого образца, мл.

2.2.4.3. Оценка окислительной модификации белков

Принцип метода определения окислительной модификации белков заключается во взаимодействии окисленных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенил-гидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [97]. Для оценки спонтанной окислительной модификации белков к 0,1 мл плазмы (0,3 мл гомогената) приливали 100 мМ фосфатный буфер рН 7,4 до конечного объема пробы 1 мл. Затем образец инкубировали в термостате при 37°C 15 минут. В холостую пробу затем вносили 4 мл 2,5 М соляной кислоты. В опытный образец – 4мл 10 мМ 2,4-ДНФГ, растворенного в 2,5М HCl. Контрольную и опытную пробы инкубировали при комнатной температуре 1 час в темноте, встряхивая каждые 15 минут. После этого, в каждый образец приливали по 5 мл холодной 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) для седиментации белка и охлаждали 15 минут. Затем осуществляли формирование белкового осадка путем центрифугирования в течение 15 минут при 3000 об/мин. Супернатант удаляли. Осадок белка дополнительно промывали 4 мл 10% ТХУ и центрифугировали.

Для выделения липидов и элиминации 2,4-ДНФГ, который не вступил в реакцию с карбонильными группами окисленных белков, осадки механически разрушали, промывали 3 раза 4 мл смеси этанол:этилацетат (1:1). Затем растворяли осадок белка в 2 мл 8 М мочевины и инкубировали 1 час при 37°C с постоянным взбалтыванием. Экстинкцию опытного образца оценивали при 370 нм относительно холостой пробы, обработанной 2,5М соляной кислотой.

Расчет концентрации карбонильных групп (нМ) проводили с применением коэффициента молярной экстинкции $\xi = 22,000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$. Вследствие того, что потери белка на всех этапах промывания составляют 10-15%, для расчета фактического содержания карбонильных групп показатели пересчитывали в нМ/мг белка. Концентрацию белка оценивали с применением метода Лоури.

2.2.4.4. Определение степени фрагментации ДНК

ДНК экстрагировали с применением набора реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В».

Для экстракции ДНК использовали 0,1 мл исследуемого образца. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 инкубировали в термостате при температуре 65°C до растворения кристаллов. В одноразовые пробирки вносили по 300 мкл лизирующего раствора, после чего добавляли по 100 мкл пробы. Образцы перемешивали на вортексе и инкубировали 5 мин при 65°C. Центрифугировали 5 с при 5 тыс. об/мин на микроцентрифуге. В случае неполного растворения пробы, проводили дополнительное центрифугирование в течение 5 мин при 12 тыс. об/мин. Для экстракции ДНК использовали супернатант, перенесенный в новую пробирку. Тщательно ресуспендировали сорбент универсальный на вортексе. В пробирки отдельным наконечником приливали по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешивали на вортексе, инкубировали при комнатной температуре 2 мин, еще раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. Осаждение сорбента универсального осуществляли центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 с. После этого элиминировали супернатант с помощью вакуумного отсасывателя. Вносили в образцы по 300 мкл раствора для отмывки 1, перемешивали на вортексе до полного ресуспензирования сорбента универсального. Осаждали сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 30 с. Элиминировали супернатант. Вносили в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировали 30 с при 10 тыс. об/мин. Удаляли надосадочную жидкость. Затем снова приливали в пробы по 500 мкл раствора для отмывки 2, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, центрифугировали 30 с при 10 тыс. об/мин. Удаляли полностью супернатант. Пробирки инкубировали при

65°C 5-10 мин для высушивания сорбента универсального. Процедура проводилась при открытых крышках пробирок. Затем в образцы вносили по 50 мкл трис-ЭДТА буфера (TE-буфера) для элюции ДНК. Перемешивали на вортексе. Инкубировали в термостате при 65°C 5 мин, периодически перемешивая на вортексе. После этого, центрифугировали пробирки при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин. Супернатант содержал очищенную ДНК.

Полученную ДНК можно хранить в течение 1 недели при температуре от 2 до 8°C, и в течение года при температуре не выше минус 16°C. Выход ДНК составляет 50 – 70%.

2.2.4.5. Электрофорез ДНК

Фрагментацию ДНК анализировали с помощью электрофореза пробы ДНК в агарозном геле с применением трис-ацетат-ЭДТА буфера (ТАЕ). Для приготовления 100 мл 50-кратного ТАЕ буфера смешивали 24,22 г триса, 1,862 г ЭДТА, 73 мл стерильной дистиллированной воды. С помощью уксусной кислоты (~8,96 мл или 9,4 г) доводили рН до 7,6. В состав буфера для нанесения входили: 0,25% бромфеноловый синий, 40% раствор сахарозы в 1-кратном ТАЕ. Набор «MassRuler», содержащий маркеры от 1500 до 10000 нуклеотидных пар, применяли для сравнительной оценки молекулярной массы.

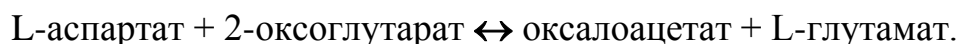
Электрофорез осуществляли по следующей схеме. Использовали однократный ТАЕ в объеме, необходимом для заполнения камеры для электрофореза (примерно 250 мл), затем к нему приливали 120 мкл 0,1% раствора бромистого этидия. В последующем пробы исследуемой и маркерной ДНК перемешивали с буфером для нанесения. Изготавливали 15%-ный раствор агарозы в однократном ТАЕ (450 мг агарозы на 30 мл буфера). Раствор прогревали до полного растворения агарозы. Остужали состав до 60°C, приливали 1,5 мкл 2% раствора бромистого этидия и помешивали, избегая образования в геле пузырьков воздуха.

Теплую агарозу выливали в кювету для геля и равномерно размещали ее по кювете. Перпендикулярно вставляли гребенки так, чтобы зубцы не касались дна. Оставляли кювету с агарозным гелем на 30 мин., затем вынимали гребенки. Кювету с гелем опускали в электрофоретическую камеру, содержащую нужное количество буфера.

Добавляли в лунки исследуемую и маркерную ДНК. Для обнаружения четкого сигнала, в лунку вносили 10 мкл ДНК. Электрофорез осуществляли при 100 В в течение 1-2 часов. Визуальный анализ геля осуществляли в УФ-свете на трансиллюминаторе и делали снимки на фотоаппарате.

2.2.5. Определение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови

АсАТ катализирует обратимый перенос аминогруппы с L-аспартата на 2-оксоглутарат:



Оксалоацетат в процессе ферментативной реакции превращается в пировиноградную кислоту (пируват).

При добавлении 2,4-ДНФГ в щелочной среде образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты.

АсАТ определяли с помощью комплекта реагентов фирмы «Витал Диагностик», Санкт-Петербург. В состав субстратно-буферного раствора входили DL-аспартат и 2-оксоглутарат, фосфатный буфер (рН 7,4) 0,1М. Раствор 2,4-ДНФГ состоял из 2,4-ДНФГ (1мМ) в 1М растворе HCl. 0,4 М раствор NaOH готовили следующим образом - 16 г NaOH растворяли 1000 мл прокипяченной дистиллированной водой. Также в состав комплекта входил калибровочный раствор пирувата натрия с концентрацией 0,11 г/л. Ход работы представлен в таблице 1.

Таблица 1

Схема определения активности фермента

Поместить в пробирки, мл	Опытная проба	Холодная проба
1. Соответствующий субстратно-буферный раствор	0,25	0,25
Прогреть в водяной бане при 37°C в течение 5 минут		
2. Сыворотка крови, свободная от гемолиза	0,05	-
Инкубировать в водяной бане при 37°C в течение 30 минут		
3. Раствор 2,4-ДНФГ	0,25	0,25
Выдержать при 18 - 25°C в течение 20 минут		
4. 0,4 М Раствор NaOH	2,5	2,5
5. Сыворотка крови, свободная от гемолиза	-	0,05
Выдержать при 18 - 25°C в течение 10 минут и фотометрировать опытную пробу против контроля в интервале длин волн 500-560 нм ($\lambda_{opt}=537\text{нм}$) в кюветах с толщиной слоя 1 см		

Далее строили калибровочный график, откладывая по оси абсцисс содержание пировиноградной кислоты, а по оси ординат - величины экстинкций (табл. 2).

Активность АсАТ рассчитывали в мкМ/(с×л) или мМ/(ч×л) по формуле:

$$\text{мкМ/(с×л) или мМ/(ч×л)} = (E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}) \times k,$$

где k – коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику:

$$k = C/E, E_{\text{пр}} - \text{экстинкция пробы, } E_{\text{к}} - \text{экстинкция контроля.}$$

Таблица 2

Схема построения калибровочного графика

№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	
Поместить в пробирки, мл	Калибровочные пробы						Контроль	
1. Калибровочный раствор пирувата натрия	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	-	
2. Дистиллированная вода	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,60	
3. Раствор 2,4-ДНФГ	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Выдержать при 18 - 25°C в течение 20 минут								
4. 0,4М раствор NaOH	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Выдержать при 18-25°C в течение 10 минут и фотометрировать калибровочные пробы против контроля в интервале длин волн 500-560 нм ($\lambda_{opt}=537$ нм) в кюветах с толщиной слоя 1 см.								
Активность фермента, соответствующая содержанию пирувата, мкМ	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	-	
АсАТ	мкМ/ (с×л)	0,13 9	0,27 8	0,41 7	0,55 6	0,69 5	0,83 4	-
	ммМ/ (ч×л)	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	-

2.2.6. Определение активности креатинкиназы–МВ в сыворотке крови

Принцип метода. Активность КК-МВ определяли с помощью оптического теста:

- 1) Фосфокреатин + ADP \leftrightarrow креатин + АТФ;
- 2) АТФ + глюкоза \leftrightarrow ADP + глюкозо-6-фосфат;
- 3) Глюкозо-6-фосфат + NADP \leftrightarrow 6-фосфоглюконат + NADPH.

Скорость восстановления NADP в NADPH пропорциональна активности креатинкиназы в образце. В состав реакционной смеси входили специфические антитела (АТ) против М-субъединицы, полностью инактивирующие ее активность. Следовательно, АТ ингибируют активность креатинкиназы-ММ изофермента и половину активности, приходящейся на долю КК-МВ изофермента.

В тесте определяли только активность КК-МВ, составляющую половину активности КК. Спектрофотометрирование проводили против воздуха при $\lambda=340$ нм.

Ход работы. В кювету вносили 1 мл рабочего реагента и 0,04 мл сыворотки, смешивали и через пять минут измеряли изменения оптической плотности с интервалом 1 минута в течение 5 минут (25°C). Рассчитывали среднее изменение оптической плотности за 1 минуту ($\Delta E/\text{мин}$).

Вычисление активности (А) осуществляли по формуле:

$$A = 8254 \times \Delta E_{340\text{нм}}/\text{мин}.$$

2.2.7. Определение содержания ревматоидного фактора

Содержание РФ определяли в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом с помощью приборов Cobas 6000 ("F. Hoffmann-LaRocheLtd", Швейцария) и CobasIntegra 400 ("F. Hoffmann-LaRocheLtd", Швейцария) [19].

2.2.8. Определение скорости оседания эритроцитов

СОЭ крови крыс определяли по методу Панченкова [74]. В калиброванный на 100 делений капилляр Панченкова набирали до метки «Р» 5%-ный раствор цитрата натрия и вносили его на часовое стекло. После чего в тот же капилляр набирали двукратно кровь до метки «К» и оба раза выдували ее на часовое стекло. Тщательно смешанную кровь с цитратом натрия, вновь набирали в капилляр до метки «К». Капилляр оставляли в штативе в вертикальном положении. СОЭ определяли через 1 час и выражали в миллиметрах.

2.2.9. Визуальный метод оценки степени воспаления

Диаметр лапки крысы, на которой визуализировалось воспаление, измеряли в районе щиколотки штангенциркулем, сравнивали с контрольными показателями.

2.2.10. Определение активности ферментов

Активность представляли в ферментативных единицах или в форме удельной активности. Единицей ферментативной активности (Е) считали количество энзима, катализирующее образование 1 мкМ продукта реакции в течение 1 мин при температуре 25°C. Активность энзимов измеряли на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением.

2.2.10.1. Определение активности ферментов сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями NAD и NADP

О скорости протекания энзиматических реакций, связанных с окислительно-восстановительными трансформациями NAD или NADP, судили по изменению экстинкции при $\lambda=340$ нм. Вычисление активностей ГП, ГР, Г6ФДГ и NADP-ИДГ осуществляли по ниже представленной формуле:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times t \times 6,22},$$

где D – прирост экстинкции при 340 нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем энзиматического раствора, мл; ΔV – объем внесенного для измерения образца, мл; t – время измерения, мин; 6,22 – коэффициент оптической плотности для дегидрогеназ, соответствующий показателю поглощения, которую дает 1 мкМ кофермента,

находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора 1 см.

2.2.10.1.1. Определение активности глутатионредуктазы

Скорость протекания ГР-реакции определяли на основании снижения экстинкции опытных проб при $\lambda=340$ нм в результате окисления NADPH, происходящего вследствие реакции восстановления глутатиона под влиянием ГР. В состав среды для определения активности ГР входили следующие компоненты: 0,05 М калий-фосфатный-буфер (рН 7,4), 0,8 мМ окисленный глутатион, 1мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH.

2.2.10.1.2. Определение активности глутатионпероксидазы

Скорость протекания ГП-реакции определяли на основании снижения экстинкции опытных проб при $\lambda=340$ нм в результате окисления NADPH, происходящего вследствие сопряженных энзиматических реакций: синтеза окисленного глутатиона под воздействием ГП и его последующего восстановления, связанного с окислением NADPH под воздействием ГР. В состав среды для определения активности ГП входили следующие компоненты: 0,05 М калий-фосфатный-буфер (рН 7,4), 0,85 мМ восстановленный глутатион, 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 1 ед/мл ГР, 0,37 мМ H_2O_2 . В состав холостой пробы не входил восстановленный глутатион.

2.2.10.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Скорость протекания глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции определяли на основании увеличения экстинкции опытных проб при $\lambda=340$ нм в результате восстановления NADP в ходе катализируемой энзимом трансформации глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Активность

глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы измеряли в среде следующего состава: 0,05 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 3,0 мМ глюкозо-6-фосфата, 1,0 мМ $MnCl_2$, 0,25 мМ NADP. Запуском реакцию являлось внесение энзиматического препарата в среду.

2.2.10.1.4. Определение активности NADP - зависимой изоцитратдегидрогеназы

Скорость окислительного декарбоксилирования изоцитрата оценивали по увеличению экстинкции вследствие восстановления NADP. Среда для измерения активности NADP-ИДГ имела следующий состав: 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), 2 мМ $MnCl_2$, 1,5 мМ изоцитрат, 0,4 мМ NADP.

2.2.10.2. Определение активности глутатионтрансферазы

Скорость протекания ГТ-реакции определяли на основании увеличения экстинкции опытных проб при $\lambda=340$ нм. Определение активности фермента основано на превращении субстрата в глутатион-2,4-динитробензол:

глутатион восстановленный + 1-хлор-2,4-динитробензол \rightarrow глутатион-2,4-динитробензол + HCl

Измерение активности ГТ осуществляли в среде, в состав которой входили следующие компоненты: 0,1 М калий-фосфатный-буфер (рН 7,4), 1 мМ 1-Cl-2,4-динитробензол, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ GSH.

Вычисление активности глутатионтрансферазы осуществляли по формуле:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times t \times 9,6}$$

где D – прирост экстинкции при $\lambda=340$ нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем энзиматического раствора, мл; ΔV – объем внесенного для измерения образца, мл; t – время измерения,

мин; 9,6 – коэффициент микромоллярной оптической плотности для глутатион-2,4-динитробензола при $\lambda=340\text{нм}$.

2.2.10.3. Определение активности аконитатгидратазы

Активность аконитазы измеряли на спектрофотометре при $\lambda=233\text{ нм}$. Скорость дегидратации цитрата в ходе АГ-реакции определяли на основании увеличения экстинкции в результате образования двойной связи в молекуле *цис*-аконитата. Активность аконитатгидратазы определяли в 50 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,8), содержащем 0,15 мМ цитрата. Запуск реакции осуществлялся с помощью добавления аликвоты ферментатического препарата в среду спектрофотометрирования. Активность АГ вычисляли по формуле:

$$E = \frac{\Delta D \times V_0 \times V_1}{\varepsilon \times t \times V_2},$$

где ΔD – изменение экстинкции образца в единицу времени измерения t ; V_0 - общий объём ферментатического раствора, мл; V_1 - объём реакционной среды, применяемой для измерения активности фермента, мл; V_2 - объём ферментатического раствора, внесённый для измерения, мл; ε - коэффициент молярной экстинкции для хромофорной группы субстрата, отражающий изменение оптической плотности при окислении или восстановлении 1 μM субстрата в 1 мл среды (для *цис*-аконитата – 3,08); t - время измерения активности фермента, мин.

2.2.10.4. Определение активности супероксиддисмутазы

Определение активности супероксиддисмутазы проводили спектрофотометрически при длине волны $\lambda=540\text{ нм}$. Активность определяли по ингибированию скорости восстановления тетразолия нитросинего в неферментатической системе феназинметасульфата и NADH [78].

Измерение активности СОД осуществляли в среде следующего состава: 0,1 М калий-фосфатный-буфер (рН 7,8), 0,41 мМ НСТ, 0,33 мМ ЭДТА, 0,8 мМ NADH, 0,01 мМ ФМС. Субстрат добавляли из расчёта 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Запуск реакции осуществлялся добавлением NADH, фиксировали прирост экстинкции в течение 5 минут.

Единицей активности супероксиддисмутазы считали количество энзима, способного ингибировать 50% восстановления НСТ. Вычисление осуществляли по формуле:

$$\frac{100 - \frac{E_0 \times 100}{E_K}}{50 \times [\text{мг белка}]}$$

где E_0 и E_K - средняя величина прироста оптической плотности за 5 минут в опытной и холостой пробах.

2.2.10.5. Определение активности каталазы

Измерение активности каталазы осуществляли на спектрофотометре при $\lambda=410$ нм. В основании метода лежит способность H_2O_2 формировать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 410 нм [81].

Активность каталазы определяли в среде следующего состава: 0,1 М трис-НСl-буфер (рН 7,4), буферно-субстратная смесь (10 мл трис-НСl-буфера рН 7,4+30 мл 0,08% H_2O_2), 4,5% раствор аммония молибденовокислого, 0,08% раствор H_2O_2 .

Таблица 3

Ход определения активности каталазы

	Контроль	Опыт	Примечание
Буферно-субстратная смесь	2 мл	2 мл	10 минут при 37 ⁰ С
Гомогенат	–	0,1 мл	3 минуты при 37 ⁰ С
Молибдат аммония	2 мл	2 мл	–
Гомогенат	0,1 мл	–	–

Вычисление активности каталазы проводили по следующей формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_o) \times 1,0 \times 10^4 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3},$$

где 4,1 – конечный объем пробы; $1,0 \times 10^4$ фактор разведения; 10^6 – коэффициент пересчета на мкм; $22,2 \times 10^6$ – коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 ; 3 минуты – время инкубации.

2.2.11. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы

2.2.11.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона

Сульфгидрильная группа GSH взаимодействует с 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана), в результате чего в эквимольных количествах синтезируется тионитрофенильный анион, окрашенный в желтый цвет, с максимум поглощения при $\lambda=412$ нм [14].

Ход определения:

1. В пробирку добавляли 0,5 мл биологического образца, 3,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4) и перемешивали;
2. 2,0 мл разведенного биологического образца переносили в центрифужную пробирку и добавляли 1,0 мл 20% ТХУ. Пробу перемешивали и оставляли в холодильнике на 15 – 20 минут;

3. Пробы доставали из холодильника и центрифугировали 15 минут при 3000 об/мин;
4. В пробирки наливали по 0,5 мл фосфатного буфера и в каждую добавляли по 1,0 мл супернатанта;
5. В опытную пробирку добавляли 0,05 мл реактива Эллмана, а в холостую пробирку – 0,05 мл метанола. Пробирки встряхивали;
6. Измеряли экстинкцию опытной и холостой проб против фосфатного буфера при $\lambda=412$ нм в кювете.

Содержание восстановленного глутатиона вычисляется по формуле:

$$C = \frac{E_{оп} - E_{к}}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3,$$

где C – концентрация восстановленного глутатиона, мМ; $13,1 \times 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции реактива Эллмана при 412 нм; $72,6$ – фактор разведения.

2.2.11.2. Определение содержания цитрата

Метод Нательсона позволяет определить содержание цитрата. Он основан на образовании из цитрата с помощью бромного реактива и KMnO_4 пентабромацетона, его удаления петролейным эфиром и определения поглощения окрашенного комплекса с тиомочевинной при $\lambda=430$ нм [8]. Расчёт осуществляли по калибровочному графику.

К 0,5 мл исследуемого биологического образца приливали 0,5 мл 17%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали в течение 10 минут при 4000g. В пробирку с плотно закрывающейся пробкой к 0,5 мл супернатанта добавляли 0,25 мл 50%-ного раствора серной кислоты, 0,1 мл 1М бромистого калия и 0,05 мл KMnO_4 . Встряхивали и охлаждали 20 минут в холодильнике. Избыток перманганата калия устраняли добавлением по каплям 3%-ного раствора перекиси водорода. Для удаления

образовавшегося пентобромацетата приливали петролейный эфир по частям: сначала 0,5 мл; потом 0,5 мл и ещё 0,3 мл. После прибавления каждой дозы петролейного эфира пробирки встряхивали 5 минут с помощью шейкера. Для осуществления цветной реакции в пробирку с плотно закрывающейся пробкой вносили 2,5 мл 2%-ного раствора тиомочевины в боратном буфере и 1 мл эфирного экстракта. Пробирку встряхивали 5 минут, после разделения фаз окрашенный в светло-жёлтый цвет нижний слой осторожно отсасывали с помощью пипетки Пастера. Интенсивность окрашивания определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 430 нм. Спектрофотометрирование осуществляли против 0,5 мл 10%-ного раствора ТХУ.

2.2.12. Определение содержания белка

Измерение концентрации белка осуществляли по методу Лоури [321]. В основе данного метода лежит взаимодействие белка со щелочным раствором сульфата меди (биуретовая реакция) и вольфраматом и молибдатом натрия (реакция Фолина на тирозиновые и цистеиновые радикалы) с образованием комплексного окрашенного соединения.

Концентрацию белка вычисляли по формуле:

$$C = \frac{0,067 \times D \times V_{\text{общ}}}{V_{\text{пр}}} \text{ (мг/мл)},$$

где 0,067 – коэффициент пропорциональности, рассчитанный по калибровочному графику, построенному с использованием бычьего сывороточного альбумина; D – экстинкция образца при 750 нм; $V_{\text{общ}}$ – общий объем исследуемого раствора, мл; $V_{\text{пр}}$ – объем внесенного образца, мл.

2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты осуществляли в 15-20-ти кратных биологических и 2-х кратных аналитических повторностях. Результаты опытов сопоставляли с контрольными значениями. На рисунках и в таблицах приводятся средние арифметические величины и их стандартные ошибки. Использовался метод вариационной статистики для определения достоверности результатов исследований. Полученные данные обрабатывали с применением статистических критериев. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$ [73].

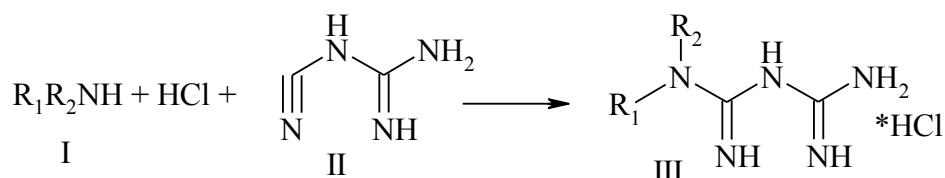
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ 3,5-
ДИКАРБОМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА И 2,4-
ДИМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ
КАДИОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ВВЕДЕНИЕМ
АДРЕНАЛИНА

3.1. Поиск бигуанидиновых производных с целевой биологической
активностью

На первом этапе работы был осуществлен скрининг бигуанидов и их производных с предполагаемым спектром интересующей нас биологической активности с использованием программы прогноза «структура-свойство» PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [43, 313]. Анализировалось несколько сотен соединений, у выявленных веществ с наиболее высокой вероятностью (>0,7-0,8) обнаруживались кардиопротекторные и антиоксидантные свойства (табл. 5).

Для данных соединений разработаны методики синтеза и успешно осуществлено их получение в чистом виде на кафедре органической химии Воронежского государственного университета. Методика синтеза основана на реакции первичных или вторичных ароматических, жирно-ароматических и алифатических аминов (I) с дициандиамидом (II) в спиртовом растворе в присутствии соляной кислоты (схема 1). Получаемые гидрохлориды бигуанидов III переводят в свободные основания действием гидроксида (для ароматических и жирно-ароматических) или метилата (для алифатических) натрия (схемы 2 и 3).

Схема 1



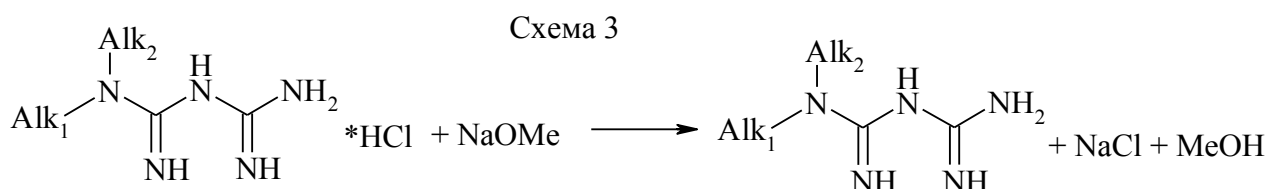
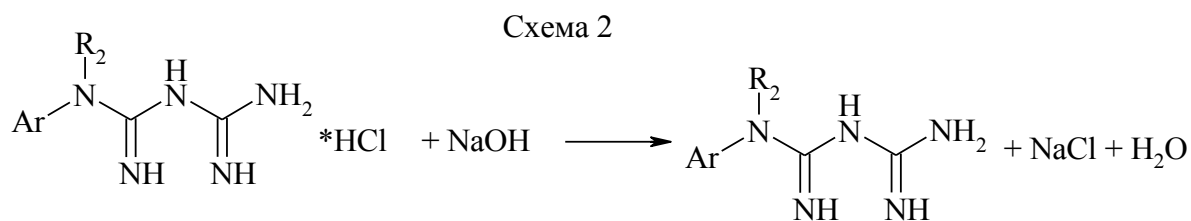
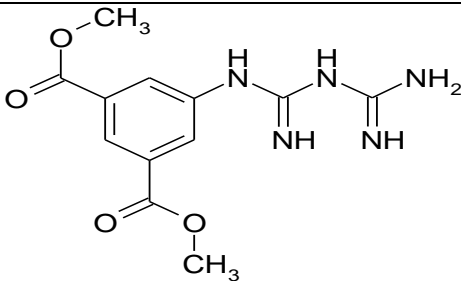
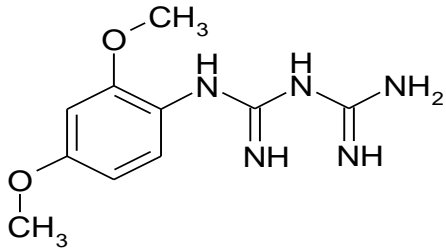


Таблица 4

Характеристика бигуанидов, отобранных для исследования

№	Структурная формула бигуанида	Наиболее вероятная активность	Вероятность
1	 3,5-дикарбометоксифенилбигуанид	Противоишемическая, кардиопротекторная	0,77-0,81
2	 2,4-диметоксифенилбигуанид	Противоишемическая, кардиопротекторная	0,75-0,82

Таким образом, с помощью компьютерной программы PASS был проведен скрининг базы данных по структурам и были отобраны соединения: производные гуанидина – бигуаниды – 3,5-дикарбометоксифенилбигуанид и 2,4-диметоксифенилбигуанид, с предполагаемым спектром биологической активности, которые в дальнейшем были протестированы на животных.

3.2. Оценка кардиопротекторного действия 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида при кардиоваскулярной патологии, индуцируемой введением адреналина

Для оценки степени цитолиза кардиомиоцитов было проведено определение уровня маркерных ферментов в сыворотке крови подопытных животных. При патологии происходило увеличение активности АсАТ и КК-МВ в 5,8 и в 5,6 раза соответственно по сравнению с контрольной группой животных (рис. 6, 7). Введение производных бигуанида приводило к снижению активности АсАТ и КК-МВ и, следовательно, уменьшению степени цитолиза кардиомиоцитов. При этом наиболее выраженный кардиопротекторный эффект характерен для 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида. Так, при введении данного вещества в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг на кг веса тела животного активность АсАТ снижалась в 2,3, 3,9, 3,3 и 3,1 раза соответственно по сравнению с животными с патологией. Активность КК-МВ при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 и 25 мг на кг веса тела животного уменьшалась в 2,0 раза по сравнению с животными 2-й группы. При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг на кг веса тела животного происходило снижение активности КК-МВ в 1,5 раза. Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг/кг веса тела животного не приводило к значимому снижению активности КК-МВ. Введение 2,4-диметоксифенилбигуанида в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг веса тела животного приводило к снижению активности АсАТ в 3,6, 3,4, 3,9 и 2,7 раза соответственно по сравнению с животными с патологией. Активность КК-МВ при введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного понижалась в 1,1 и 1,2 раза соответственно по сравнению с животными 2-й группы (рис. 6, 7). Однако, введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 и 75 мг/кг веса тела животного не приводило к достоверным изменениям активности данного маркерного фермента.

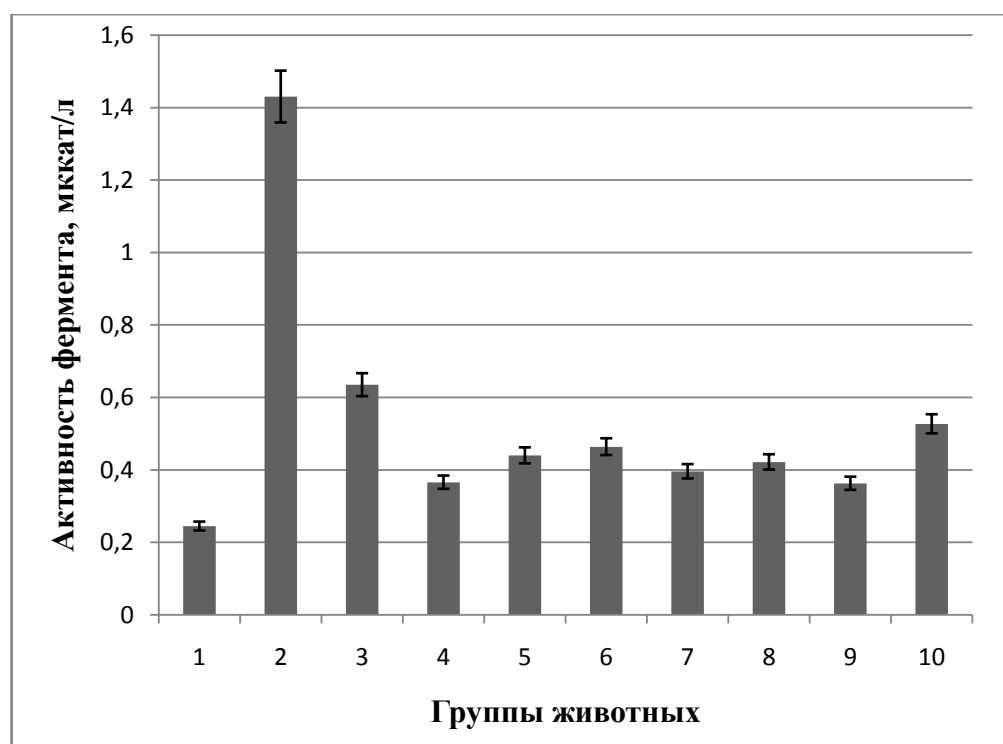


Рис. 6. Активность аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

Снижение активности АсАТ и КК-МВ под действием производных бигуанида свидетельствовало об уменьшении степени цитолиза кардиомиоцитов у исследуемых животных, что является следствием проявления кардиопротекторных свойств исследуемых соединений. Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными. Так, известно, что применение препарата метформина оказывало положительное влияние на реологию крови и систему гемостаза, способствовало снижению риска образования тромбов и тормозило агрегацию тромбоцитов [185, 248, 312]. Кроме того, *in vitro* доказано антиатеросклеротическое действие метформина. Влияя на ранние стадии развития атеросклероза, он нарушает адгезию моноцитов, их трансформацию

и возможность захватывать липиды [180, 185, 248]. Помимо этого, метформин может проявлять антиоксидантные свойства, связанные со снижением скорости клеточных окислительных реакций, в том числе и окислительного гликозилирования белков [248, 274].

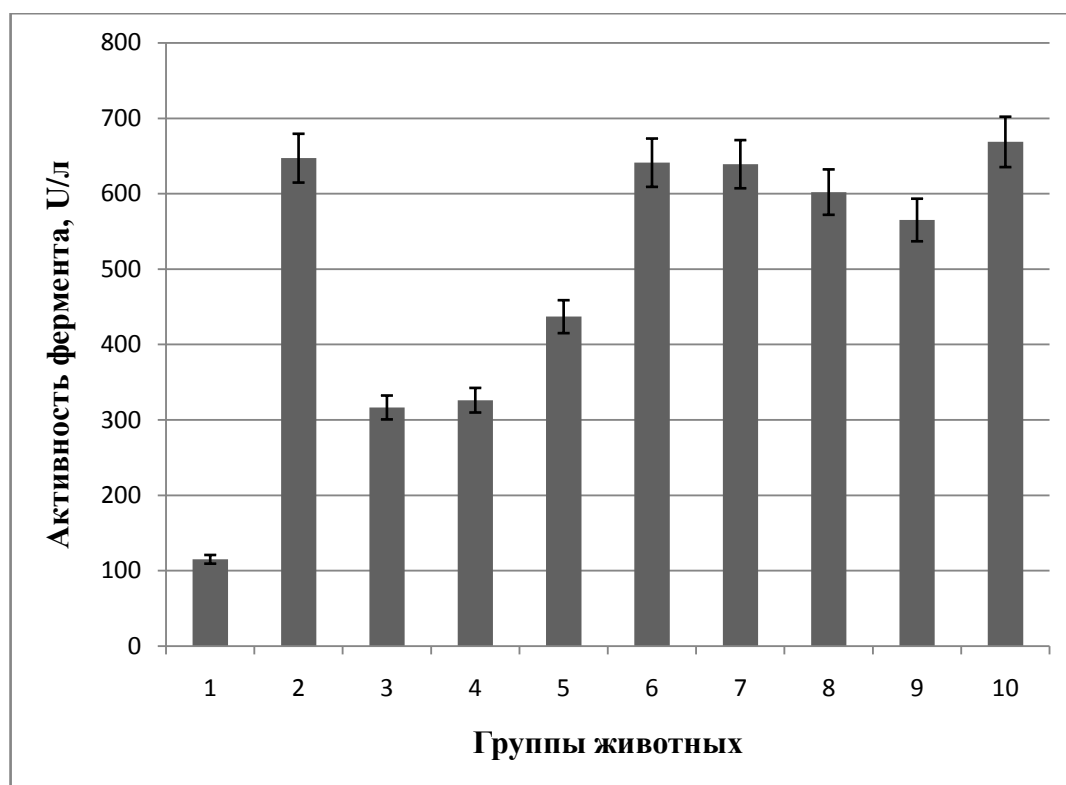


Рис. 7. Активность креатинкиназы - МБ в сыворотке крови животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистых нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

3.3. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на свободнорадикальные процессы в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина

Оценка оксидативного статуса в тканях крыс при патологии и действии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ проводилась на основе показателей биохемилюминесценции (БХЛ), определения содержания диеновых конъюгатов, карбонильных групп белков и фрагментации ДНК.

3.3.1. Интенсивность свободнорадикальных процессов в тканях крыс при введении 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на фоне кардиоваскулярных нарушений, вызванных введением адреналина

Согласно полученным данным параметры БХЛ: S и I_{\max} , характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, возрастали при развитии патологического состояния в сердце – в 1,7 и 3,8 раза, в сыворотке крови в 1,5 и 1,7 раза соответственно (табл. 5, 6). Полученные результаты согласуются с литературными данными, подтверждающими существенную роль интенсификации генерации АФК и ПОЛ в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе при инфаркте миокарда и ишемической болезни сердца, способствующих как разрушению плазмолеммы, так и субклеточных мембран кардиомиоцитов, что усугубляет течение патологического процесса [134]. Имеются также сведения, что при ишемии снижение содержания кислорода приводит к увеличению генерированных цитотоксичных супероксидных анион-радикалов и других АФК [69, 70].

В условиях развития КН, опосредованных введением адреналина, величина $tg\alpha_2$, характеризующая общую антиоксидантную активность, была

выше в сердце – в 3,3 раза, в сыворотке крови в 2,8 раза, чем соответствующий параметр в условиях нормы (табл. 5, 6). Полученные результаты свидетельствуют об активации АОС организма в патологическом состоянии.

При введении производных бигуанида на фоне развития патологии происходило снижение показателей БХЛ, что в большей степени было выражено в сердце крыс. Максимальный эффект был отмечен при введении исследуемых бигуанидов в дозе 25 мг на кг веса животного. При введении 3,5-ДКМФБ в данной дозе параметр S в сердце и сыворотке крови крыс уменьшался в 1,6 и 1,3 раза, I_{\max} снижалась в 4,1 и 1,4 раза, $\text{tg}\alpha_2$ падал в 3,1 и 2,6 раза соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг/кг веса тела животного приводило к уменьшению в сердце и сыворотке крыс показателей БХЛ: S в 1,7 и 1,5 раза, I_{\max} в 3,8 и 1,4 раза, $\text{tg}\alpha_2$ в 2,1 и 2,4 раза соответственно (табл. 5, 6).

Введение 3,5-ДКМФБ на фоне развития патологического состояния в дозе 50 мг на кг веса тела животного сопровождалось уменьшением показателя S в сердце и сыворотке крови крыс в 1,4 и 1,2 раза, параметр I_{\max} снижался в 3,5 и 1,2 раза, $\text{tg}\alpha_2$ уменьшался в 1,9 и 2,3 раза соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в вышеуказанной дозе приводило к снижению S в сердце и сыворотке крови крыс в 1,5 и 1,1 раза, I_{\max} - в 3,7 и 1,2 раза, $\text{tg}\alpha_2$ - в 1,7 и 2,2 раза.

Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 12,5 мг на кг веса тела животного не приводило к значимому снижению показателей БХЛ в сыворотке крови крыс. В сердце крыс происходило снижение I_{\max} и $\text{tg}\alpha_2$ в 1,5 и 1,8 раза соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в вышеуказанной дозе приводило к уменьшению показателей S и I_{\max} в сердце крыс в 1,3 раза.

Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг на кг веса тела животного на фоне развития КН, индуцируемых адреналином, не приводило к значимым изменениям показателей биохемилюминисценции в сыворотке крови крыс.

Показатели S , I_{\max} и $\text{tg}\alpha_2$ снижались в сердце крыс в 1,4, 3,3 и 1,3 раза соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в вышеуказанной дозе приводило к увеличению S в сыворотке крови крыс в 1,1 раза. Параметры S , I_{\max} и $\text{tg}\alpha_2$ в сердце крыс понижались в 1,3, 1,4 и 1,5 раза соответственно.

Таким образом, выявлено снижение интенсивности процессов СО при действии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ как в сердце, так и в сыворотке крови крыс в условиях развития кардиоваскулярных нарушений, вызванных введением адреналина. Необходимо отметить, что введение протекторов в дозе 25 мг на кг массы тела животного приводило к более выраженному снижению параметров биохемилюминесценции, отражающих интенсивность СРП.

Таблица 5

Параметры биохемилюминесценции в сердце животных исследуемых групп

№ группы животных	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), mVхс	Интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}), mV	Тангенс угла наклона кинетической кривой ($\text{tg } \alpha_2$)
1	485±24	51,5±2,6	7,10±0,36
2	824±41	195,7±9,8	23,70±1,19
3	792±40*	128,0±6,4*	13,40±0,67*
4	524±26*	48,2±2,2*	7,70±0,39*
5	576±29*	55,6±2,8*	12,80±0,64*
6	592±30*	59,4±3,0*	18,0±0,9*
7	630±32*	155,8±7,8*	24,60±1,23*
8	473±24*	51,6±2,6*	11,20±0,56*
9	542±27*	53,0±2,7*	13,80±0,69*
10	637±32*	139,25±7,0*	16,0±0,80*

Примечание: * - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$).

Таблица 6

Параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови животных
исследуемых групп

№ группы животных	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), mVхс	Интенсивность максимальной вспышки (I _{max}), mV	Тангенс угла наклона кинетической кривой (tg α ₂)
1	903±45	68,5±3,4	14,5±0,7
2	1354±67	116,5±5,8	40,6±2,0
3	1289±64*	108,0±5,4*	41±2,1*
4	1023±51*	81,3±4,1*	15,6±0,8*
5	1176±29*	99,5±5,0*	17,8±0,9*
6	1332±67*	104,0±5,2*	36,0±1,8*
7	1377±69*	119,3±6,0*	29,75±1,49*
8	908±45*	84,6±4,2*	17,0±0,85*
9	1197±60*	99,8±5,0*	18,6±0,93*
10	1545±77*	118±5,9*	22,67±1,13*

Примечание: * - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$).

В условиях сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина, происходило накопление ДК – первичных продуктов ПОЛ, что являлось следствием активизации данного процесса. Так, известно, что в процессе развития ишемии нарушается β-окисление жирных кислот в митохондриях, в конечном итоге аккумулируются недоокисленные активированные формы жирных кислот, оказывающие повреждающее действие на мембраны кардиомиоцитов [306]. Данные недоокисленные продукты активно участвуют в процессах перекисидации липидов. Кроме того, в регуляции перекисидного окисления липидов участвуют антиоксидантные ферменты, понижение активности которых может служить основной причиной усиления перекисидного окисления липидов при

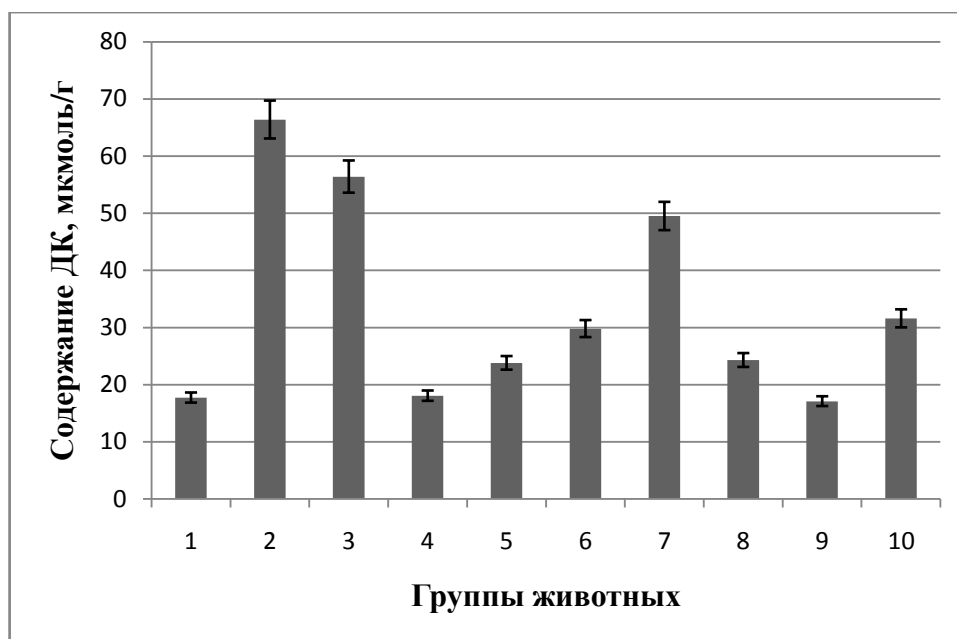
кардиоваскулярных нарушениях. В патологическом состоянии, индуцированной введением адреналина, содержание продуктов ПОЛ возрастало в сердце – в 3,7 раза, в сыворотке крови – в 4,2 раза, по сравнению с контрольной группой животных (рис. 8).

Введение производных бигуанида на фоне развития патологии приводило к снижению содержания ДК в тканях исследуемых животных. Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг на кг веса тела животного содержание ДК уменьшалось в сердце крыс в 1,2, 3,7, 2,8 и 2,2 раза соответственно. Введение данного вещества в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг на кг веса тела животного приводило к снижению уровня ДК в сыворотке крови крыс в 1,5, 4,1, 6,4 и 1,6 раза.

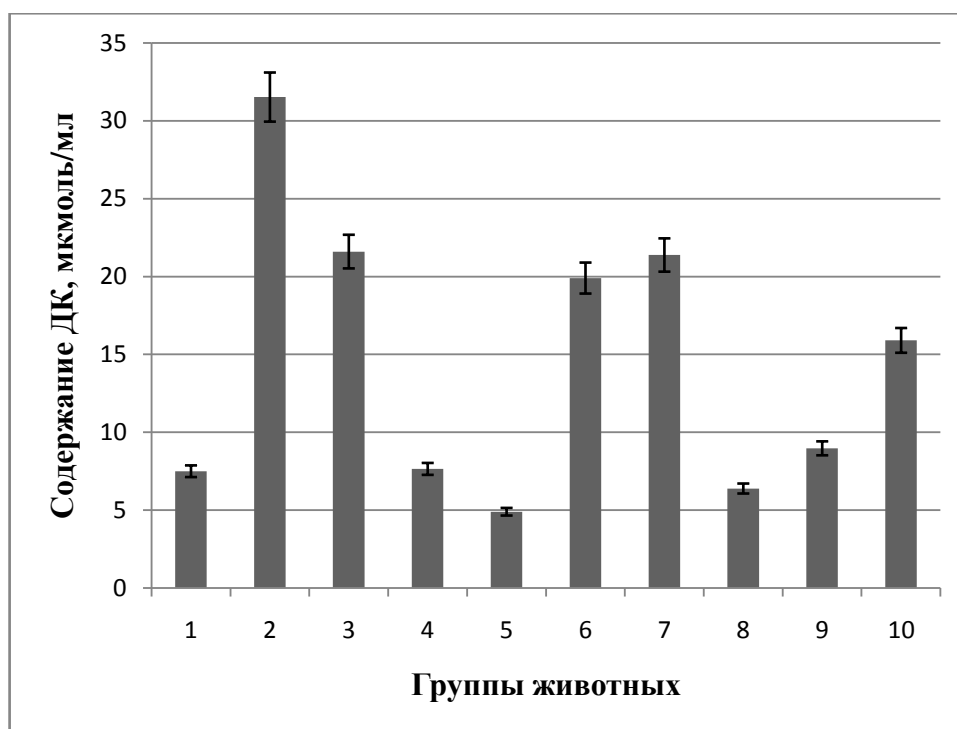
При введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг на кг веса тела животного содержание ДК понижалось в сердце крыс в 1,3, 2,7, 3,9 и 2,1 раза, в сыворотке крови крыс в 1,5, 4,9, 3,5 и 2,0 раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы.

Таким образом, выявлено снижение интенсивности процессов ПОЛ при действии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ как в сердце, так и в сыворотке крови крыс на фоне патологического состояния, индуцированного введением адреналина. Необходимо отметить, что введение протекторов в дозе 25 мг на кг массы тела животного приводило к более выраженному снижению содержания ДК.

В настоящее время хорошо изучены механизмы развития пероксидного окисления липидов, а также его роль в нормальном и патологическом функционировании клеток, однако, АФК вызывают и окислительную модификацию белков (ОМБ). Окислительное повреждение белков представляет собой цепной процесс, в ходе которого гидроксипроизводное белка, образовавшееся при взаимодействии АФК с аминокислотами, распадается на карбонильные фрагменты [98, 256]. В настоящее время карбонильные фрагменты рассматриваются как маркеры ОМБ.



а

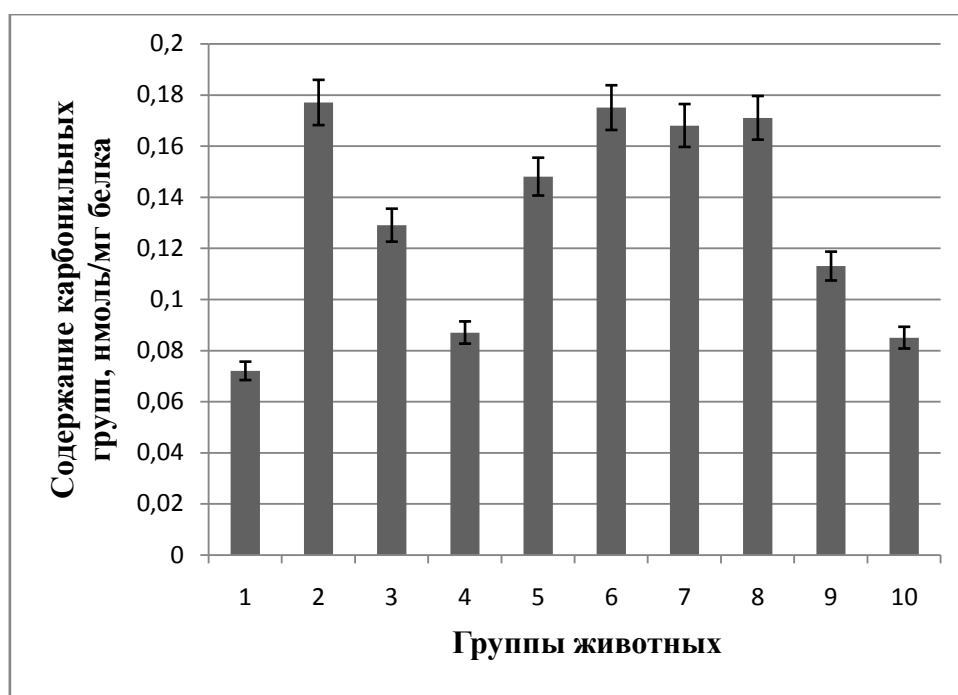


б

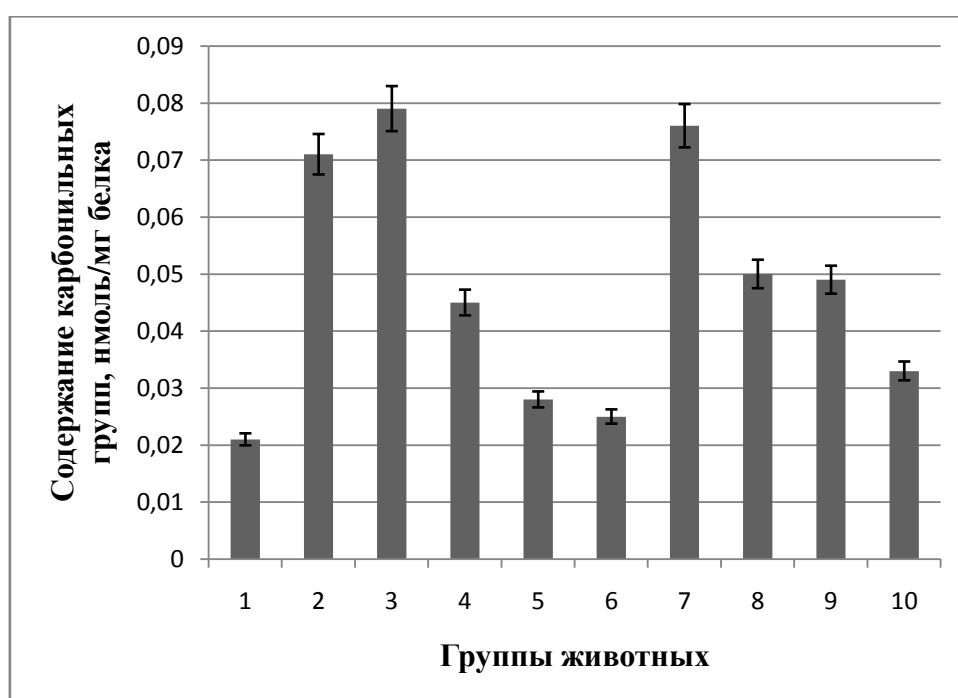
Рис. 8. Содержание диеновых конъюгатов в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) мг/кг и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

Установлено, что при КН, индуцированных введением адреналина, содержание карбонильных соединений в сердце крыс увеличивалось в 2,5 раза, по сравнению с контрольной группой. Возрастание степени ОМБ было выявлено и в сыворотке крови крыс в 3,4 раза (рис. 9). Считается, что во время развития окислительного стресса повреждающему действию АФК, в первую очередь, подвергаются белки плазматических мембран, а не липиды. Известно, что роль главных активаторов ОМБ играют АФК, а также увеличение уровня свободного железа и продукты ПОЛ. Высокие концентрации адреналина приводят к возрастанию потребления кислорода и стимулируют выработку СР [44, 69, 70]. Воздействие АФК сопровождается нарушением нативной структуры белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы. ОН[•] чаще всего вызывает агрегацию белков, но совместно с O₂^{-•} приводит к фрагментации с образованием низкомолекулярных фрагментов. Образование агрегатов происходит следующим образом: при воздействии СР нарушается нативная структура ряда доменов белков, вследствие чего возрастает количество гидрофобных остатков на поверхности глобул, что способствует возникновению крупных белковых конгломератов [186, 187].

Введение производных бигуанида на фоне развития патологии приводило к снижению содержания карбонильных групп в тканях исследуемых животных (рис. 9). Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25 и 50 мг на кг веса тела животного содержание карбонильных групп уменьшалось в сердце крыс в 1,4, 2,0 и 1,2 раза соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 50 и 75 мг на кг веса тела животного сопровождалось снижением карбонильных групп в сердце крыс в 1,6 и 2,1 раза. Однако, при введении 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг на кг веса тела животного и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25 мг на кг веса тела животного не наблюдалось достоверного изменения содержания карбонильных групп в сердце крыс, по сравнению с показателями животных с патологией.



а



б

Рис. 9. Содержание карбонильных групп в сыворотке крови (а) и сердце (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистых нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) мг/кг и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 25, 50 и 75 мг на кг веса тела животного сопровождалось снижением содержания карбонильных групп в сыворотке крови крыс в 1,6, 2,5 и 2,8 раза соответственно по сравнению с животными 2-й группы (рис. 9).

При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного уровень карбонильных групп уменьшалось в сыворотке крови крыс в 1,4 раза по сравнению с животными с патологией. Введение 2,4-ДМФБ в дозе 75 мг на кг тела животного приводило к снижению карбонильных групп в сыворотке крови крыс в 2,2 раза.

При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг на кг веса тела животного не наблюдалось достоверных изменений содержания карбонильных групп в сыворотке крови крыс, по сравнению с показателями животных 2-й группы.

Таким образом, 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ снижали уровень карбонильных соединений, как в сердце, так и в сыворотке крови крыс с КН, индуцированными введением адреналина. Необходимо отметить, что введение протекторов в дозе 50 мг на кг массы тела животного приводило к более выраженному снижению содержания карбонильных групп.

Результаты исследования соответствуют представлениям о способности гуанидиновых производных проявлять антиоксидантные свойства. Известно, что производные бигуанида способны проявлять кардиопротекторные действия через ингибирование процессов свободнорадикального окисления – одного из ключевых патогенетических факторов развития сердечно-сосудистой патологии. Так, метформин способен ингибировать I комплекс ЭТЦ митохондрии и связанную с ним генерацию АФК в ЭТЦ. Также метформин способен ингибировать NADPH-оксидазу, функционирование которой сопряжено с образованием супероксидного анион-радикала [272, 297]. Кроме того известно, что применение метформина снижает количество висцерального жира [84].

Протекторный эффект действия производных бигуанида был более выражен в сердце крыс. В сыворотке крови, отражающей суммарный эффект данных синтетических производных на различные органы и ткани, антиоксидантный эффект был выражен в меньшей степени.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что наиболее оптимальными дозами вводимых веществ, способствующими наибольшему торможению СО, являются дозы 25 мг/кг и 50 мг/кг, при которых наблюдается наиболее выраженный позитивный эффект на антиоксидантный статус организма. Внутривнутрибрюшинное введение данных бигуанидов в дозе 12,5 мг/кг не оказывало должного протекторного влияния, вероятно, из-за недостаточности используемой концентрации. Снижение положительного воздействия при введении используемых веществ в более высоких дозах, скорее всего, связано с проявлением их прооксидантных свойств, что согласуется с современными представлениями о способности многих веществ оказывать в зависимости от определенных условий как антиоксидантный, так и прооксидантный эффект. Так, известно, что некоторые соединения, например полифенольные, могут проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства в условиях их высокой концентрации или при наличии ионов металлов [188, 261, 319, 327]. Недавние исследования открыли прооксидативные свойства у таких антиоксидантных соединений, как кверцетин, катехины, галльская кислота [261, 323]. Было показано, что кверцетин в низких концентрациях (0,1-20 мкМ) проявляет антиоксидантные свойства. В более высоких концентрациях (50 мкМ и выше) данное соединение способно активировать генерацию супероксидного анион радикала в изолированных митохондриях, а также снижать клеточную выживаемость и активность антиоксидантных ферментов, таких как СОД, каталаза, ГТ [323]. Также было показано, что флавоноиды в низких концентрациях (10-25 мкМ) защищают Н4ПЕ клетки крыс от повреждения пероксидом водорода. В высоких концентрациях (50-250 мкМ) флавоноиды способны проявлять цитотоксические свойства,

выражающиеся в повреждении ДНК, активации апоптоза и генерации АФК [261]. Антиоксидантные соединения, относящиеся к катехинам, в присутствии ионов переменной валентности проявляют прооксидантные свойства и вызывают оксидативное повреждение в клетках.

Известно также, что способность хелатировать ионы металлов переменной валентности соединениями – антиоксидантами зависит от кислотности среды. Так, фенольные соединения, проявляющие антиоксидантные свойства при рН 5,8, являются прооксидантами при рН 7,4. Кроме того, феноксильные радикалы – продукты взаимодействия АФК и фенольных антиоксидантов, хотя и являются относительно стабильными благодаря удерживанию неспаренных электронов около бензольного кольца, также способны проявлять прооксидантное действие, приводящее к повреждению клеток [178, 188].

3.3.2. Оценка степени фрагментации ДНК в кардиомиоцитах крыс при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина, и действии 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида

ДНК, выделенная из сердца крыс с кардиоваскулярными нарушениями, индуцированными введением адреналина, была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб (рис. 10). При этом образованные фрагменты ДНК создавали характерную “апоптозную лестницу”.

Из литературных данных известно, что такие фрагменты образуются при воздействии апоптоз-специфических нуклеаз [287]. Визуализировалась также высокоподвижная полоса в области низких молекулярных масс, которая соответствовала разрушенной ДНК, ее присутствие связано с развитием некроза [143]. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ животным с патологией приводило к снижению степени фрагментации ДНК, апоптозная лестница в большинстве проб практически не визуализировалась (рис. 10),

что может быть свидетельством антиапоптотического действия исследуемых веществ. Снижение интенсивности апоптоза в кардиомиоцитах, очевидно, было взаимосвязано с уменьшением скорости процессов СО, на что указывают результаты определения параметров БХЛ и уровня ДК.

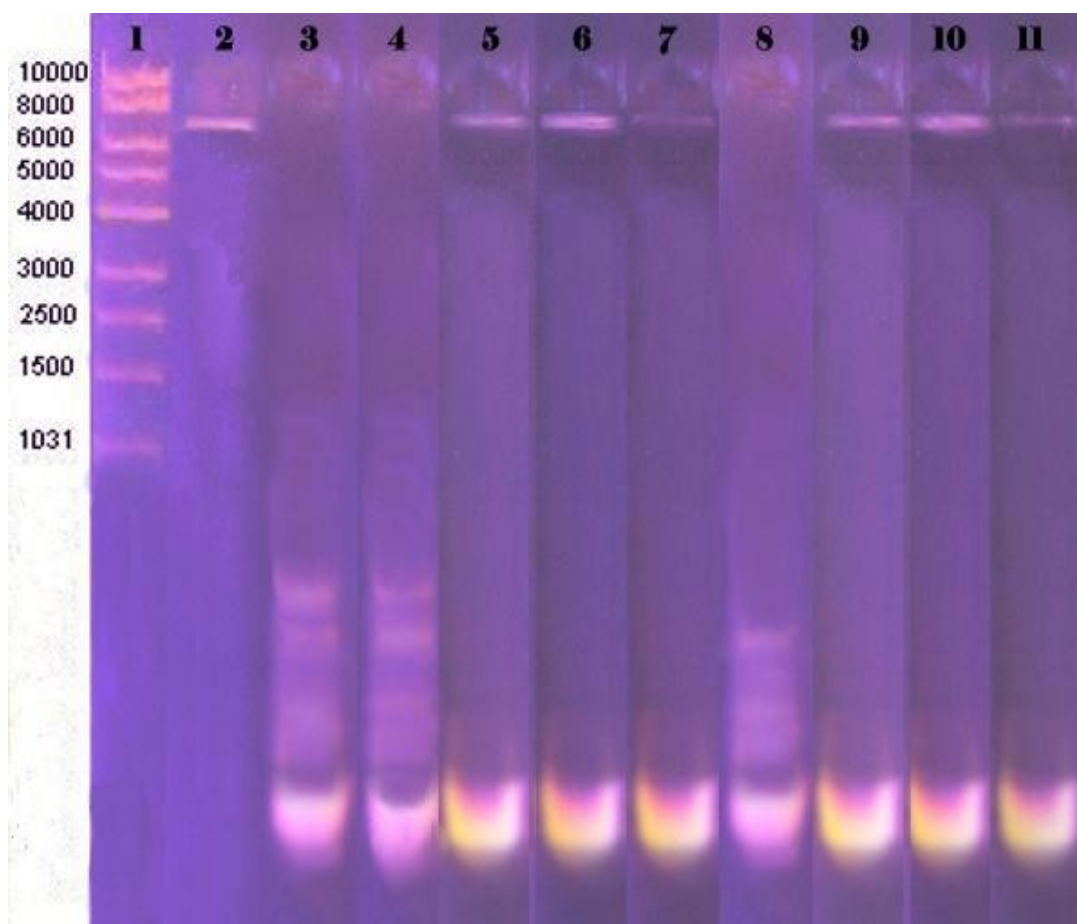


Рис. 10. Электрофореграмма препаратов ДНК из кардиомиоцитов крыс:
1 - маркеры молекулярной массы; 2 - крысы контрольной группы (контроль); 3 - крысы с сердечно-сосудистой патологией, индуцированной введением адреналина; 4, 5, 6, 7 - группы крыс с патологией после введения 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг; 8, 9, 10, 11 - группы крыс с патологией, после введения 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг

3.4. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина

Супероксиддисмутаза и каталаза – ферменты АОС, отвечающие за эффективную элиминацию первичных активных форм кислорода - $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , и выполняющие основную функцию в протекции клеток от эндогенных СР, так как именно эти АФК образуются в первую очередь и дают начало другим, более реакционноспособным формам [169].

Было установлено, что при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, в тканях крыс происходило возрастание ферментативной активности СОД. Активность СОД, как в сердце, так и в сыворотке крови, рассчитанная в виде Е на г сырой массы и Е на мл, увеличивалась в 2,6 раза (рис. 11). При этом удельная активность фермента повышалась в сердце в 2,5 раза, в сыворотке крови в 2,8 раза, относительно данного показателя в норме, что может являться следствием активации фермента при интенсификации СО (рис. 1 приложения).

Введение протекторов приводило к снижению активности СОД по сравнению с показателями животных при патологии. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг веса животного наблюдалось уменьшение активности СОД в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,5, 1,7, 2,5 и 2,0 раза соответственно (рис. 11). Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг веса животного приводило к наиболее выраженному снижению активности фермента в сыворотке крови, рассчитанной в Е на мл, – в 1,8 раза, по сравнению с животными 2-й группы. При введении данного протектора в дозах 12,5 и 75 мг на кг веса животного наблюдалось уменьшение активности СОД в сыворотке крови, выраженной в виде Е на мл, в 1,2 и 1,1 раза. Введение исследуемого протектора в дозе 25 мг на кг веса животного не приводило к достоверным изменениям активности фермента, рассчитанной в

виде Е на мл сыворотки, по сравнению с животными с патологией. При расчёте удельной активности фермента в сердце и в сыворотке крови крыс сохранялись тенденции, характерные для активностей, выраженных в Е на грамм сырой массы и в Е на мл (рис. 1 приложения). Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг веса животного наблюдалось уменьшение удельной активности СОД в сердце в 1,6, 2,0, 2,1 и 2,3 раза соответственно. Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг веса животного приводило к снижению удельной активности фермента в сыворотке крови в наибольшей степени в - 1,6 раза, по сравнению с животными с КН, индуцированными введением адреналина. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25 и 75 мг/кг веса животного не наблюдалось значительных изменений удельной активности энзима в сыворотке крови, по сравнению с животными 2-й группы.

Введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 и 25 мг/кг веса животного сопровождалось снижением активности СОД, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 2,1 и 2,0 раза, в сыворотке крови в 2,6 и 2,4 раза соответственно (рис. 11). При введении 2,4-ДМФБ в дозах 50 и 75 мг/кг веса животного наблюдалось уменьшение активности СОД, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 2,9 и 7,4 раза, в сыворотке крови в 2,4 и 1,8 раза соответственно. При расчёте удельной активности фермента в сердце и в сыворотке крови крыс сохранялись тенденции, характерные для активностей, выраженных в Е на грамм сырой массы и в Е на мл (рис. 1 приложения). При введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг веса животного наблюдалось снижение удельной активности СОД в сердце в 1,8, 2,4, 3,1 и 5,9 раза, в сыворотке крови в 1,6, 2,0, 2,2 и 1,3 раза соответственно. Таким образом, введение 3,5 – ДКМФБ и 2,4 – ДКФБ на фоне развития КН, индуцированных введением адреналина, по всей видимости, способствует снижению степени протекания СО, и, как следствие, снижению функциональной нагрузки на СОД.

Показано, что на фоне развития кардиоваскулярного патологического процесса, индуцированного введением адреналина, происходило увеличение активности каталазы в тканях крыс. Так, активность фермента при патологии увеличивалась в сердце в 1,8 раза, а в сыворотке крови в 2,2 раза (рис. 12). При этом удельная активность фермента в патологическом состоянии возрастала в сердце в 1,7 раза, в сыворотке крови – в 2,3 раза (рис. 2 приложения). Модификации активности каталазы, по всей видимости, являются механизмом защитной реакции организма на чрезмерное генерирование АФК при развитии окислительного стресса. Увеличение активности каталазы в сыворотке крови и сердце при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина, обеспечивающее расщепление пероксида водорода до воды и молекулярного кислорода, способствует снижению вероятности образования гидроксильного радикала.

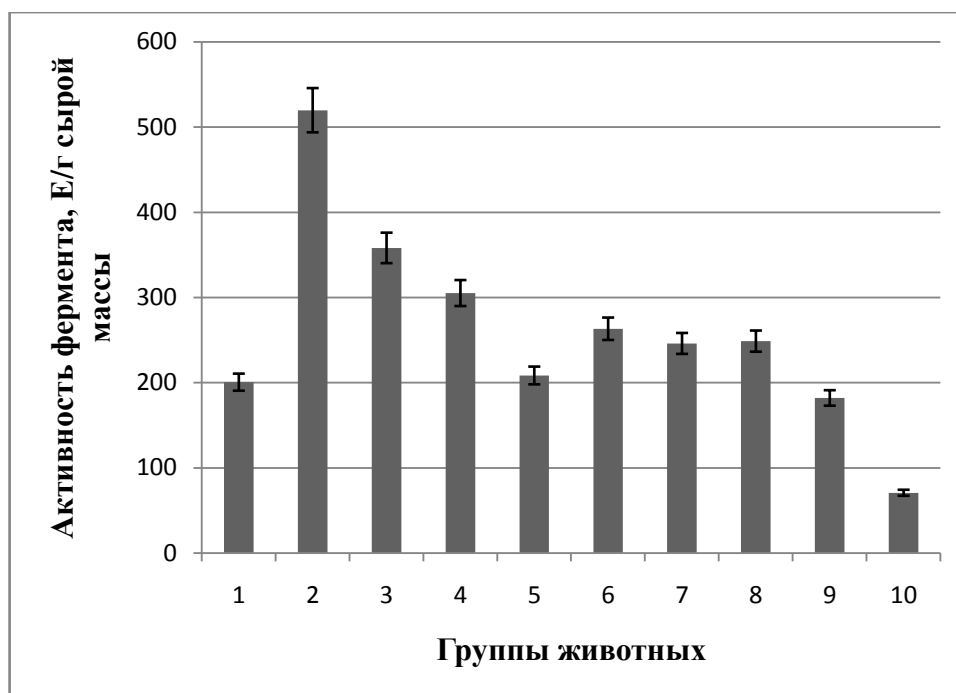
Введение протекторов приводило к снижению активности каталазы по сравнению с показателями животных с кардиоваскулярной патологией. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось снижение активности каталазы в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,1, 1,3 и 1,8 раза соответственно (рис. 12). В данном случае введение исследуемого протектора в дозе 12,5 мг/кг веса животного сопровождалось уменьшением удельной активности фермента в сердце в 1,5 раза (рис. 2 приложения). При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного удельная активность фермента снижалась в сердце в 1,9 раза. Введение данного протектора в дозах 12,5 и 50 мг/кг не приводило к существенному снижению активности фермента в сыворотке крови. При использовании 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг на кг активность каталазы уменьшалась в 1,3 раза. Расчёт удельной активности фермента в сыворотке крови крыс показал, что сохранялись тенденции, характерные для активности, выраженной в Е на мл (рис. 2 приложения). При введении протектора в дозе 25 мг на кг удельная активность каталазы в сыворотке крови снижалась в 1,4 раза. Введении 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг/кг

сопровождалось увеличение активности каталазы, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 1,3 раза, в сыворотке крови в 1,2 раза, что может быть связано с проявлением прооксидантных свойств. При этом удельная активность фермента увеличивалась в сыворотке крови в 1,4 раза, а в сердце оставалась без существенных изменений.

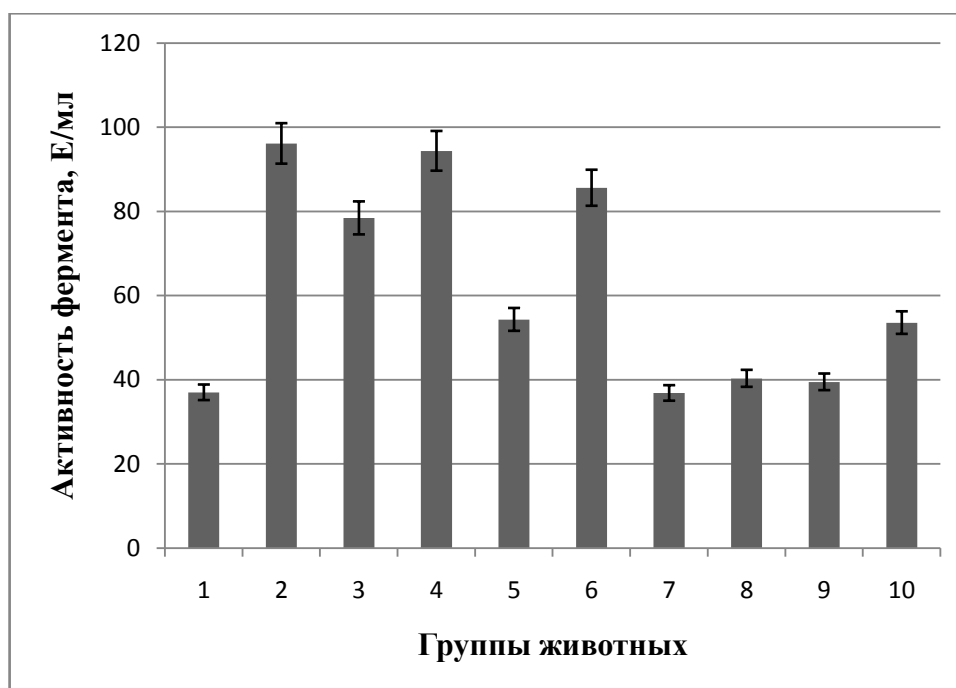
При введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось снижение активности каталазы в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,1, 1,5 и 1,2 раза соответственно (рис. 12). При этом удельная активность фермента понижалась в сердце в 1,1, 2,1 и 1,6 раза (рис. 2 приложения). Введение данного протектора в дозе 75 мг/кг не приводило к существенному снижению активности каталазы, рассчитанной как в виде Е на г сырой массы, так и удельной активности в сердце крыс, по сравнению с животными 2-й группы. При введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 и 50 мг/кг веса животного не было выявлено изменений активности каталазы в сыворотке крови, выраженной в Е на мл и в Е на мг белка. Введение протектора в дозе 25 мг на кг сопровождалось снижением активности каталазы, выраженной в Е на мл и Е на мг белка, в сыворотке крови в 1,3 и 1,2 раза соответственно (рис. 12, рис. 2 приложения). При введении 2,4-ДМФБ в дозе 75 мг/кг наблюдалось увеличение активности каталазы, представленной как в Е на мл, так и в Е на мг белка, в сыворотке крови. В данном случае ферментативная активность возрастала в 1,2 и 1,4 раза соответственно, что может быть связано с проявлением прооксидантных свойств (рис. 12, рис. 2 приложения).

Результаты исследования свидетельствуют, что протекторное действие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ наиболее выражено при введении данных веществ в дозе 25 мг/кг веса животного.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что снижение степени мобилизации антиоксидантных ферментов, обеспечивающих обезвреживание $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , по-видимому, сопряжено с уменьшением интенсивности СРП в условиях действия протекторов.

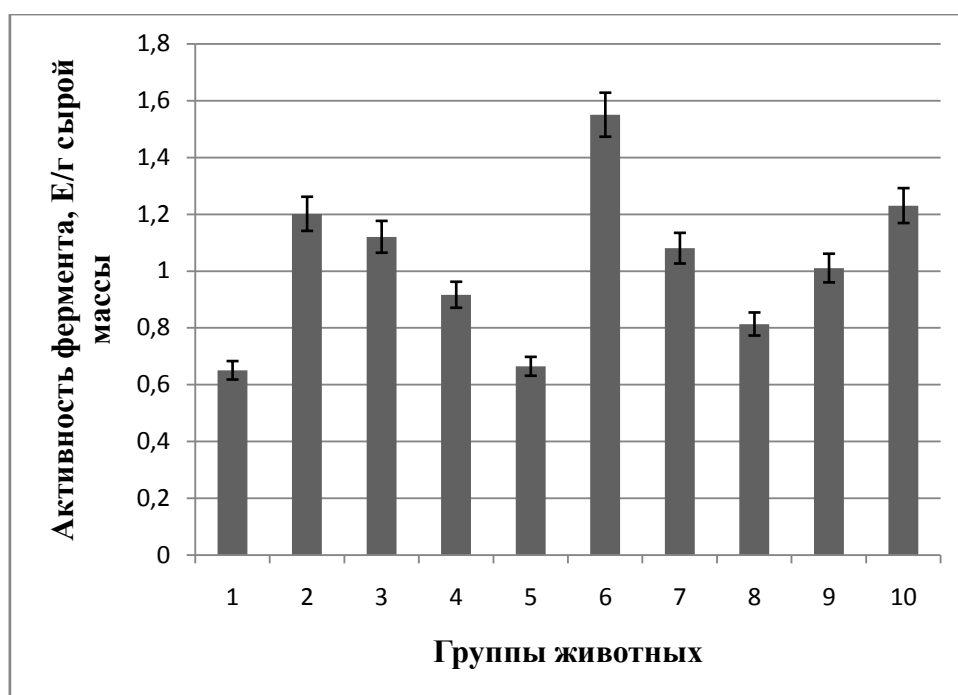


а

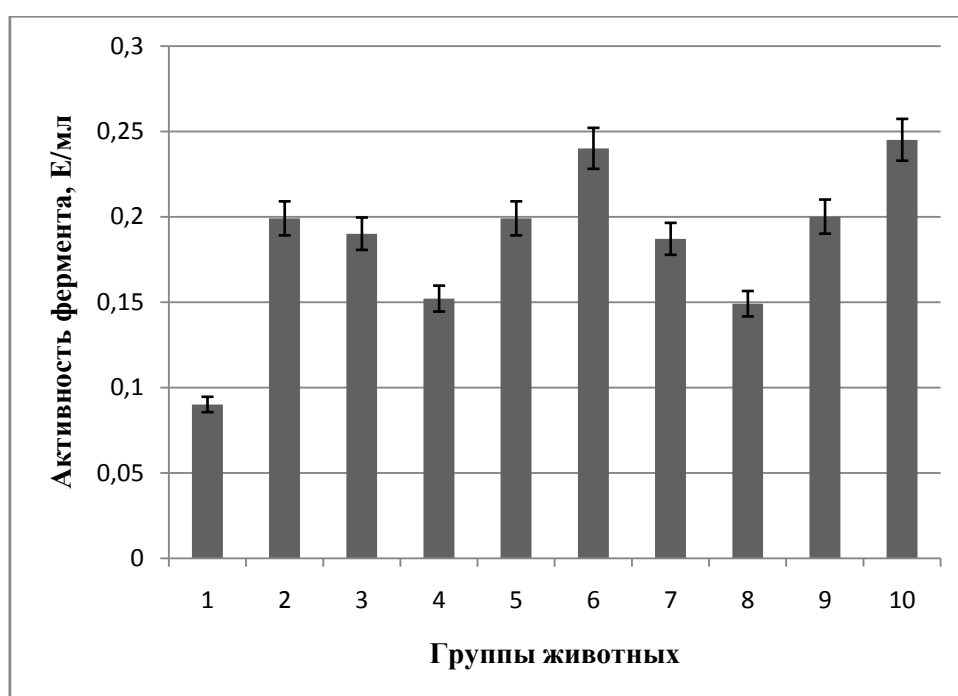


б

Рис. 11. Активность СОД в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)



а



б

Рис. 12. Активность каталазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

3.5. Влияние протекторов на активность глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях крыс при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина

Показано, что в условиях развития кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, содержание глутатиона увеличивалось в сердце и сыворотке крови крыс – в 1,8 раза, относительно контрольного уровня (рис. 13). Многие исследователи отмечают, что при негативных воздействиях, в первую очередь, содержание восстановленного глутатиона уменьшается, вследствие чего клетка продуцирует его в больших количествах.

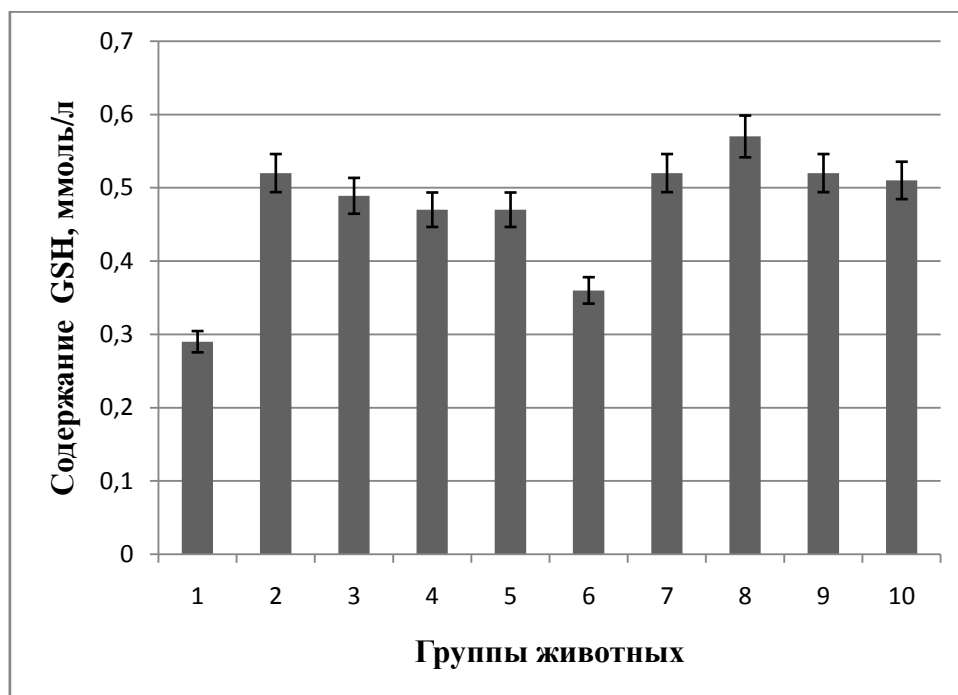
С другой точки зрения, увеличение уровня глутатиона в клетке при развитии окислительного стресса может быть взаимосвязано с антиоксидантными свойствами различных белков теплового шока – шаперонов, образование которых увеличивается в данном состоянии. Известно, что шапероны способствуют повышению внутриклеточного содержания глутатиона, от чего непосредственно зависит их антиоксидантная способность [207, 295].

Помимо этого, концентрация восстановленного глутатиона может увеличиваться за счет восстановления его окисленной формы в ходе протекания ГР-реакции, что согласуется с полученными результатами, указывающими на повышение функциональной активности ГР при развитии КН, индуцированных введением адреналина.

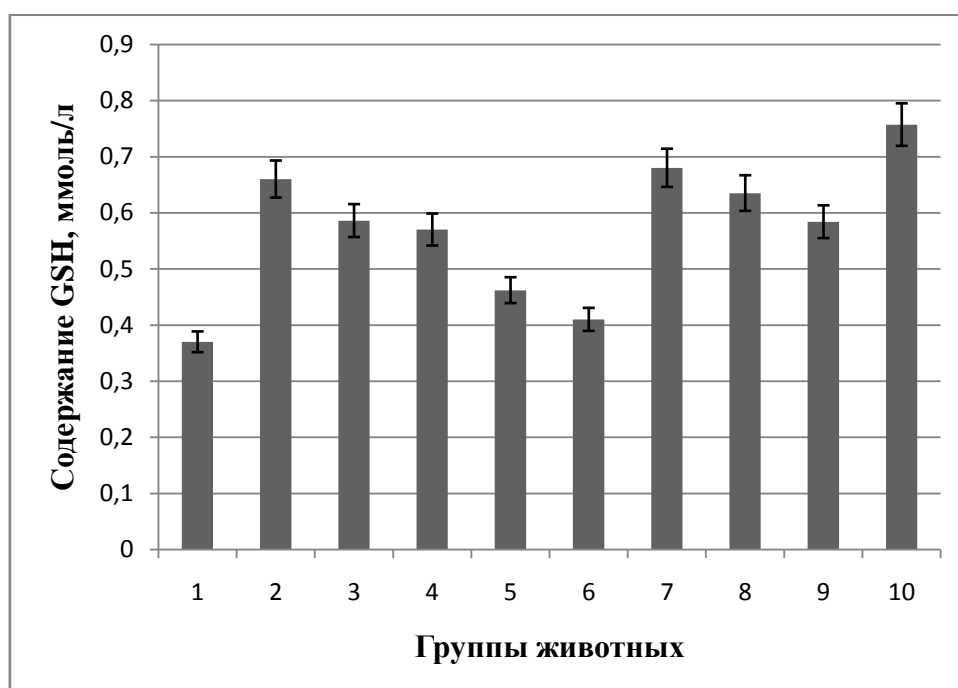
Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозе 50 мг/кг веса животного сопровождалось снижением уровня GSH в сыворотке в 1,4 и 1,1 раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы (рис. 13). При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг на кг наблюдалось уменьшение содержания GSH в сердце в 1,5 раза, в сыворотке крови в 1,6 раза.

Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 и 25 мг/кг веса животного не приводило к достоверным изменениям уровня GSH в сердце и

сыворотке крови крыс, по сравнению с показателями животных с патологией.



а



б

Рис. 13. Содержание восстановленного глутатиона в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

При развитии патологического состояния, индуцированного введением адреналина, наблюдалось увеличение активности ГП, представленной в виде Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце крыс в 3,5 раза, в сыворотке крови в 2,7 раза соответственно (рис. 14). При этом удельная активность возрастала в сердце в 3,3 раза, в сыворотке крови в 2,9 раза по сравнению с контролем (рис. 3 приложения).

Развитие кардиоваскулярных нарушений, индуцированных введением адреналина, сопровождалось также увеличением активности ГР, выраженной в Е на г сырой массы и Е на мл, в сердце крыс в 2,1 раза, в сыворотке крови крыс в 2,8 раза соответственно (рис. 15). При этом удельная активность возрастала в сердце в 1,9 раза, в сыворотке крови в 3,0 раза по сравнению с контролем (рис. 4 приложения).

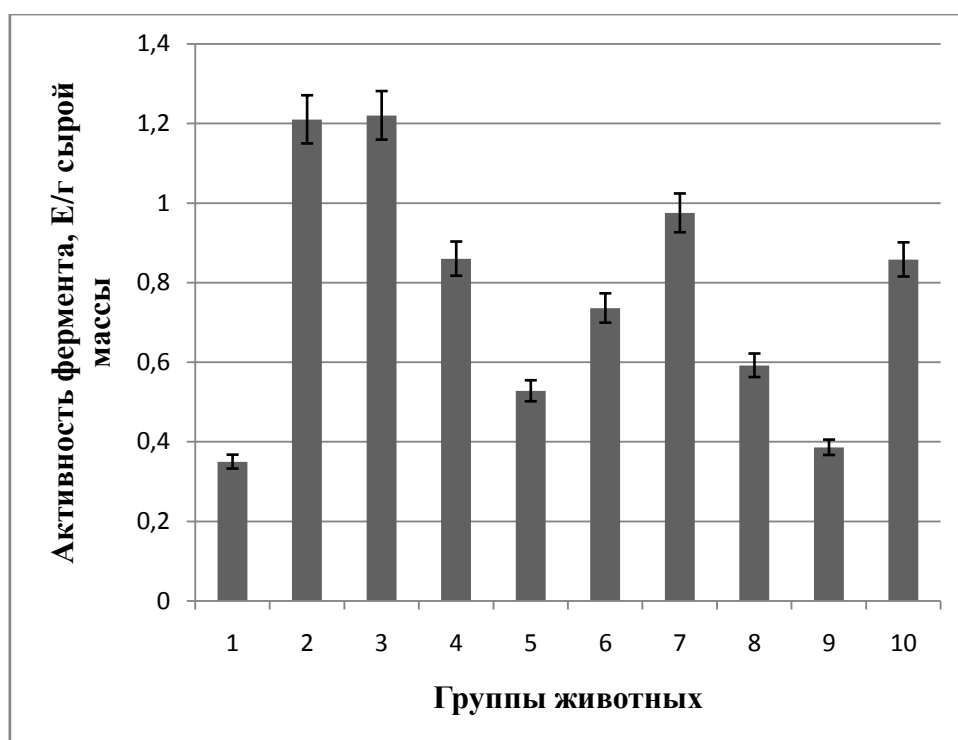
Вероятно, наблюдаемые изменения активностей ГП и ГР могут быть защитной реакцией организма адаптационного характера на чрезмерное образование АФК при интенсификации СО в процессе развития кардиоваскулярной патологии, опосредованной введением адреналина. В основе увеличения активности ГР и ГП при окислительном стрессе может лежать индукция данных ферментов под действием редокс-зависимых транскрипционных факторов [303]. Кроме того, модификации активностей ГП и ГР в сыворотке крови крыс могут быть результатом их выхода из клеток в кровь вследствие нарушения транспортных и барьерных свойств биомембран в условиях развития окислительного стресса. Помимо этого, необходимо отметить, что активация ГР может быть сопряжена с функционированием других систем, использующих глутатион. Так, например, глутаредоксин-зависимая система, играющая важную роль в поддержании внутриклеточного редокс-гомеостаза, включает GSH в качестве агента, восстанавливающего окисленный глутаредоксин, и ГР, восстанавливающую глутатион из его окисленной формы [46]. Изменение активности ферментов могут быть связаны с модификациями конформаций молекул энзимов в условиях окислительного стресса и действия протекторов,

в результате изменения микроокружения. Так, известно, что при окислительном стрессе (при ряде патологических состояний) наблюдается синтез белков-шаперонов, способных поддерживать определенные конформации ферментов для выполнения их функций [207, 295].

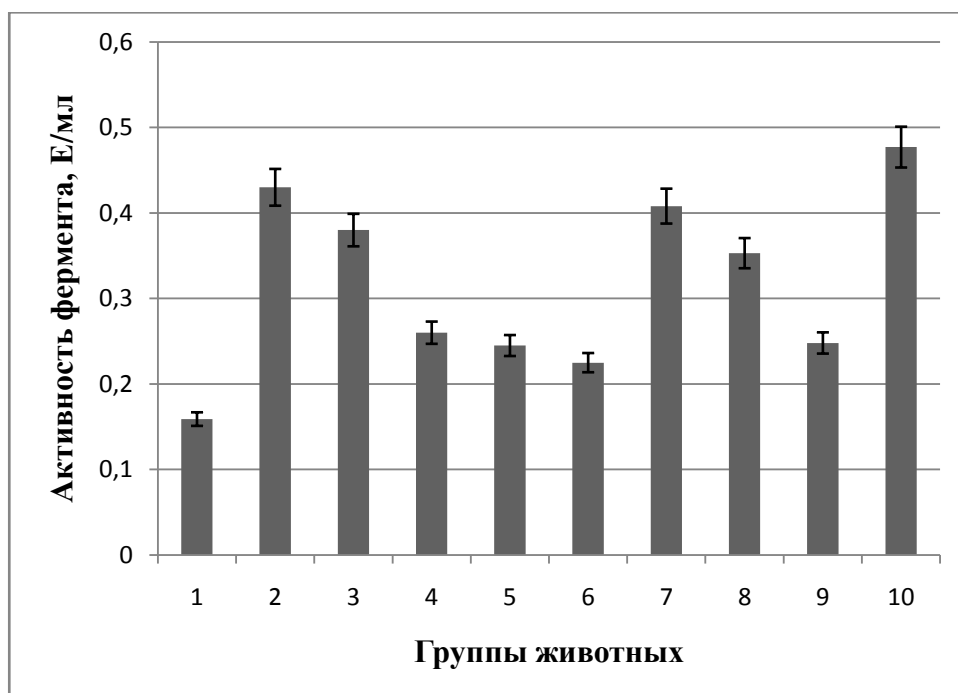
Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 25, 50 и 75 мг на кг веса животного приводило к понижению активности ГП, что, вероятно, связано со снижением нагрузки на данный фермент. Внутривентриальное введение данного бигуанида в дозе 12,5 мг/кг не оказывало должного протекторного влияния, вероятно, из-за недостаточности используемой концентрации.

При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг активность ГП, выраженная в Е на г сырой массы и в Е на мл, снижалась в сердце в 1,4, 2,3 и 1,7 раза, в сыворотке крови крыс в 1,7, 1,8 и 1,9 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 14). Сходная тенденция сохранялась при расчете удельной активности фермента. Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг удельная активность ГП уменьшалась в сердце крыс в 2,4, 2,3 и 2,5 раза, в сыворотке крови крыс в 1,7, 1,5 и 1,6 раза (рис. 3 приложения).

При введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг активность ГП в сердце, выраженная в Е на г сырой массы, снижалась в 1,3, 2,1, 3,1 и 1,4 раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы (рис. 14). При этом удельная активность ГП в сердце уменьшалась в 1,4, 1,6, 4,2 и 1,3 раза соответственно (рис. 3 приложения).



а



б

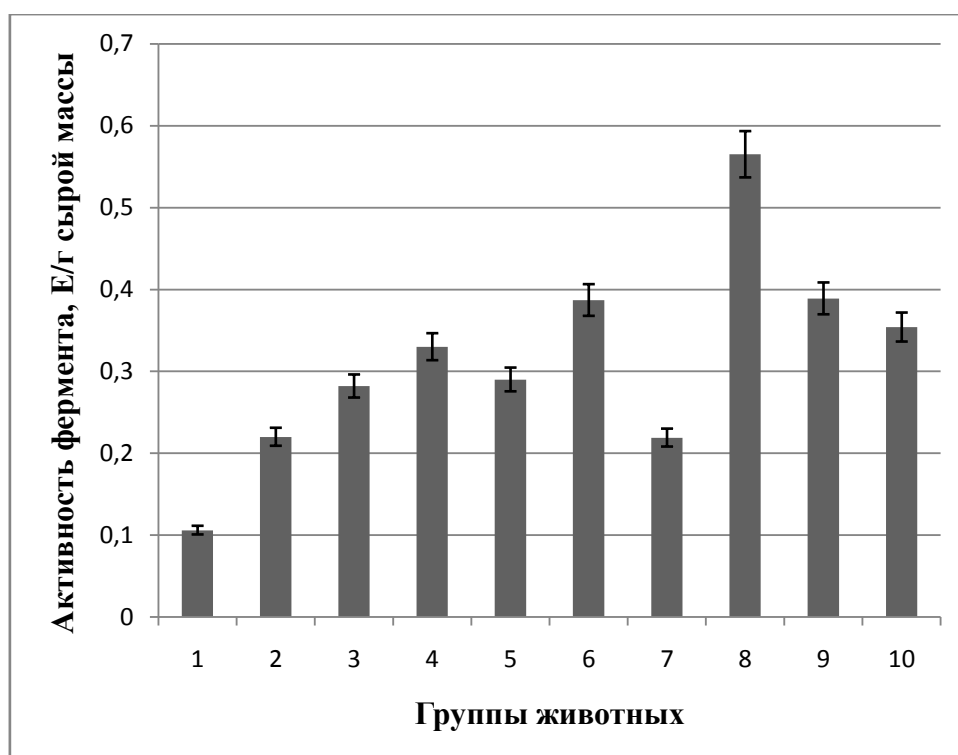
Рис. 14. Активность глутатионпероксидазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг сопровождалось снижением активности ГП в сыворотке крови, выраженной в Е на мл, в 1,2 и 1,7 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг на кг и 75 мг на кг веса тела животного не приводило к значимому изменению активности ГП в сыворотке крови крыс. При введении 2,4-ДМФБ в дозе 50 мг/кг наблюдалось понижение удельной активности ГП в сыворотке крови в 1,5 раза, по сравнению с животными с патологией. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг на кг и 75 мг на кг веса тела животного приводило к повышению удельной активности ГП в сыворотке крови крыс в 1,6 и 1,5 раза, соответственно. При введении 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг/кг удельная активность ГП в сыворотке крови оставалась без изменений, относительно показателей при патологии.

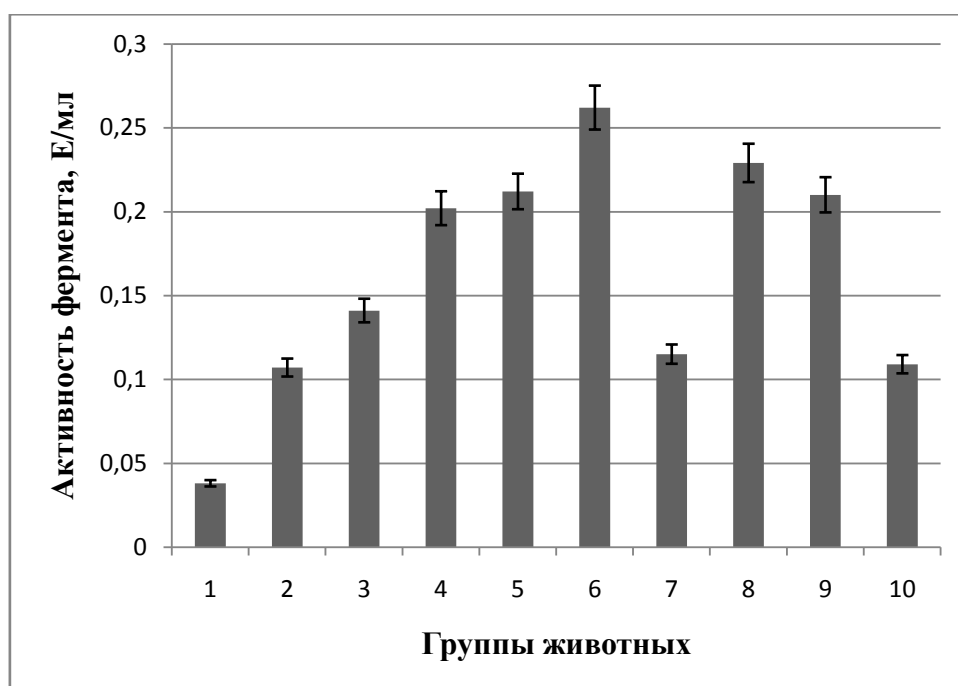
Полученные данные позволяют сделать вывод, что применение производных бигуанида способствует снижению интенсивности процессов ПОЛ, вследствие чего уменьшается активность ГП, основным субстратом которой являются липопероксиды.

Возможно, используемые протекторы способствуют ослаблению нагрузки на глутатионовую АОС на фоне развития окислительного стресса при кардиоваскулярных нарушениях, индуцируемых введением адреналина, за счет проявления антиоксидантных свойств.

Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на фоне развития патологии сопровождалось увеличением активности ГР в сердце и сыворотке крови крыс.



а



б

Рис. 15. Активность глутатионредуктазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг/кг и 50 мг/кг происходило увеличение активности ГР, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 1,3 раза, в сыворотке крови крыс в 1,3 и 2,0 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 15). Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг/кг и 75 мг/кг приводило к увеличению активности ГР, представленной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 1,5 и 1,8 раза, в сыворотке крови крыс в 1,9 и 2,5 раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы. При использовании 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг/кг и 75 мг/кг происходило снижение удельной активности ГР в сердце в 1,4 и 1,3 раза, по сравнению с животными с патологией. Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг не оказывало существенного воздействия на удельную активность ГР в сердце. При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг на кг удельная активность ГР в сердце увеличивалась в 1,5 раза. При применении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг удельная активность ГР возрастала в сыворотке крови крыс в 1,7, 1,8, 2,3 и 2,8 раза соответственно (рис. 4 приложения).

Внутрибрюшинное введение 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг/кг не оказывало существенного протекторного влияния, вероятно, из-за недостаточности используемой концентрации. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг сопровождалось увеличением активности ГР в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 2,6, 1,8 и 1,6 раза соответственно. При этом удельная активность ГР увеличивалась в сердце крыс в 1,8, 1,9 и 1,5 раза, по сравнению с животными 2-й группы (рис. 4 приложения). При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг наблюдалось возрастание активности фермента в сыворотке крови крыс, выраженной в Е на мл, в 2,1 и 2,0 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 15). Введение 2,4-ДМФБ в дозе 75 мг/кг не оказывало влияния на активность ГР в сыворотке крови крыс. При введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг и 75 мг/кг удельная активность ГР в сыворотке крови увеличивалась

в 1,8, 2,6, 2,3 и 1,3 раза соответственно, по сравнению с животными второй группы (рис. 4 приложения).

Полученные результаты, вероятно, связаны с особенностями действия данных протекторов на функционирование глутатионового звена антиоксидантной системы при патологии сердечной мышцы. Значительное увеличение активности ГР под действием данных производных гуанидина может быть сопряжено с активацией фермента в ответ на метаболические сдвиги, происходящие в клетке при введении протекторов в условиях кардиоваскулярных нарушений, индуцированных введением адреналина. Известно, что воздействие метформина связано его специфическим влиянием на образование и пул глюкозных переносчиков в клетке. Метформин способен увеличивать экспрессию и активность переносчиков глюкозы, повышать их содержание и транслокацию из внутриклеточного пула на клеточную мембрану [215, 347]. Нельзя исключить, что рост активности ГР опосредован действием исследуемых бигуанидов на экспрессию фермента.

Установлено, что развитие кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, сопровождалось снижением активности ГТ, выраженной в Е на грамм сырой массы и в Е на мл, в сердце в 3,5 раза и в сыворотке крови в 1,2 раза, по сравнению с контрольным уровнем. При этом удельная активность понижалась в сердце в 2,9 раза, в сыворотке крови в 1,5 раза (рис. 16, рис. 5 приложения).

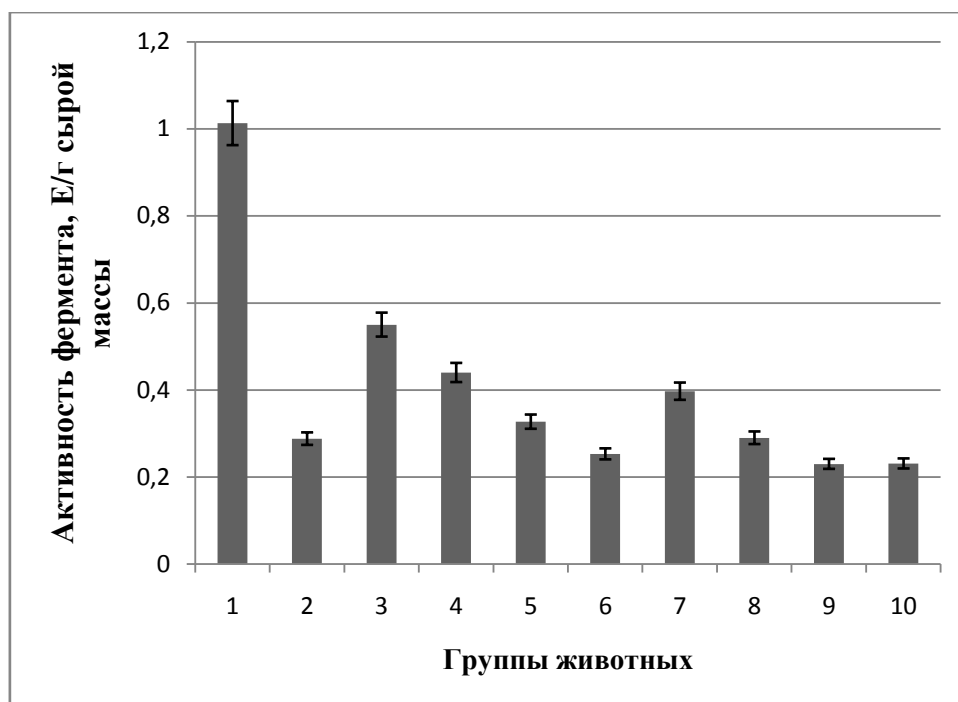
Полученные данные соотносятся с литературными сведениями о том, что при ишемии и гипоксии тканей имеет место последовательное снижение активности глутатионтрансферазы [105, 112]. Известно, что ГТ играет главную роль в обезвреживании вторичных продуктов ПОЛ и биотрансформации ксенобиотиков [199, 366]. Уменьшение активности глутатионтрансферазы, может свидетельствовать о нарушении детоксикационной функции печени, так как активность этого фермента в эритроцитах характеризует процессы, происходящие в самих клетках печени [330]. Кроме того, при развитии окислительного стресса в сердечной мышце

наблюдается активация ГП, что, вероятно, может быть сопряжено с перераспределением потоков восстановленного глутатиона, следствием чего является снижение ГТ активности.

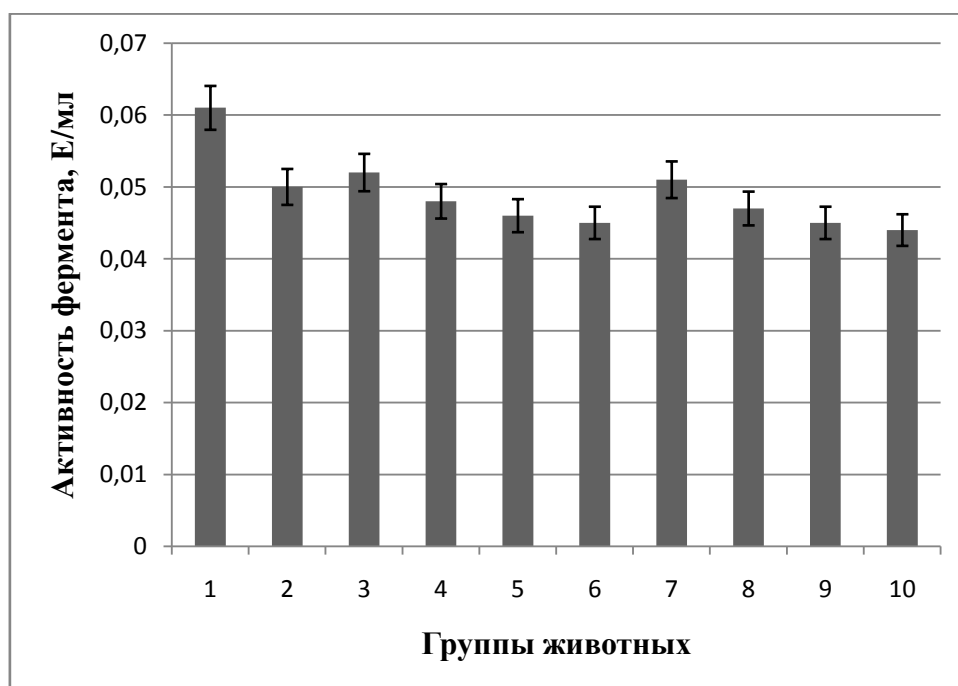
Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг сопровождалось увеличением активности ГТ в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,9, 1,5 и 1,1 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 16). При этом удельная активность ГТ повышалась в сердце в 1,3, 1,2 и 1,4 раза, по сравнению со второй группой животных (рис. 5 приложения). Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг на кг веса животного не оказывало влияния на активность ГТ в сердце крыс. Сходная тенденция наблюдалась и при расчете удельной активности фермента. Вероятно, это связано с проявлением его прооксидантных свойств, что согласуется с современными представлениями о способности многих веществ оказывать в зависимости от определенных условий как антиоксидантный, так и прооксидантный эффект [178, 188].

При введении 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг/кг наблюдалось увеличение активности ГТ в сердце, выраженной в Е на грамм сырой массы, в 1,4 раза, по сравнению с животными с патологией (рис. 16). Введение 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг на кг массы тела животного не оказывало воздействия на активность ГТ в сердце. При введении 2,4-ДМФБ в дозах 50 мг на кг и 75 мг на кг массы тела животного, прооксидантный эффект 2,4-ДМФБ, по-видимому, усиливался, и активность ГТ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, снижалась и в том, и в другом случае в 1,3 раза. Те же тенденции прослеживались и при расчете удельной активности фермента. Так, при введении 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг/кг удельная активность ГТ в сердце возрастала в 1,9 раза, а с увеличением дозы протектора наблюдалось снижение удельной активности фермента (рис. 5 приложения).

Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ во всех исследуемых дозах не приводило к достоверным изменениям активности ГТ в сыворотке крови крыс, по сравнению с показателями животных с патологией.



а



б

Рис. 16. Активность глутатионтрансферазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологией, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что введение гетероциклических производных бигуанидов приводило к увеличению активности ГТ, уменьшающейся при патологии.

Протекторный эффект действия производных бигуанида был более выражен в сердце, чем в сыворотке крови крыс, что может быть связано с тропизмом исследуемых соединений к сердечной мышце.

Поскольку ГТ способна выполнять детоксицирующие функции, то нормализация ее активности, очевидно, свидетельствовала о позитивном влиянии используемых протекторов на состояние АОС. По-видимому, возрастание активности ГТ могло быть сопряжено со снижением степени дисбаланса в глутатионовой АОС, происходящем под действием бигуанидов.

3.6. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность NADPH-продуцирующих ферментов в тканях крыс при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина

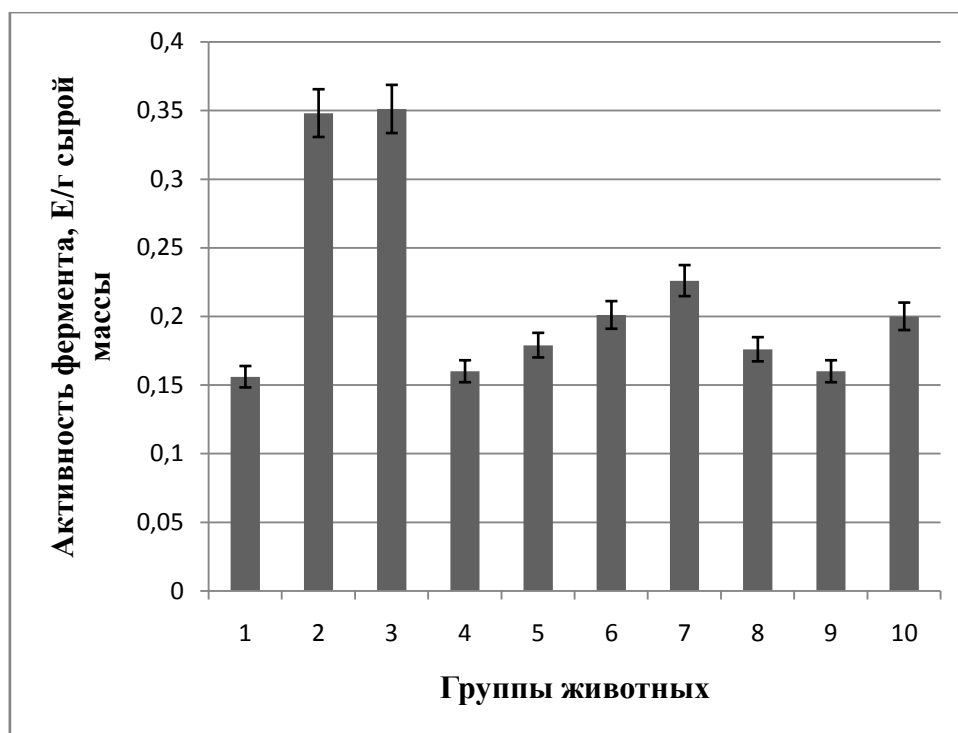
Регенерация восстановленного глутатиона в ходе ГР-реакции осуществляется при постоянном притоке в систему восстановительных эквивалентов, основным поставщиком которых в клетке является ключевой фермент ПФП – Г6ФДГ. В качестве альтернативного источника NADPH рассматривают NADP-ИДГ-реакцию [115].

На фоне развития кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, наблюдалось увеличение активности NADPH-генерирующих ферментов в сердце и сыворотке крови крыс. Так, активность Г6ФДГ в сердце и сыворотке крови, выраженная в Е на грамм сырой массы и в Е на мл, увеличивалась в 2,2 и 2,3 раза соответственно (рис. 17). При этом удельная активность Г6ФДГ увеличивалась в сердце в 2,1 раза, а в сыворотке крови в 2,0 раза (рис. 6 приложения). Активность NADP-ИДГ, представленная в Е на грамм сырой массы и в Е на мл, в сердце животных с

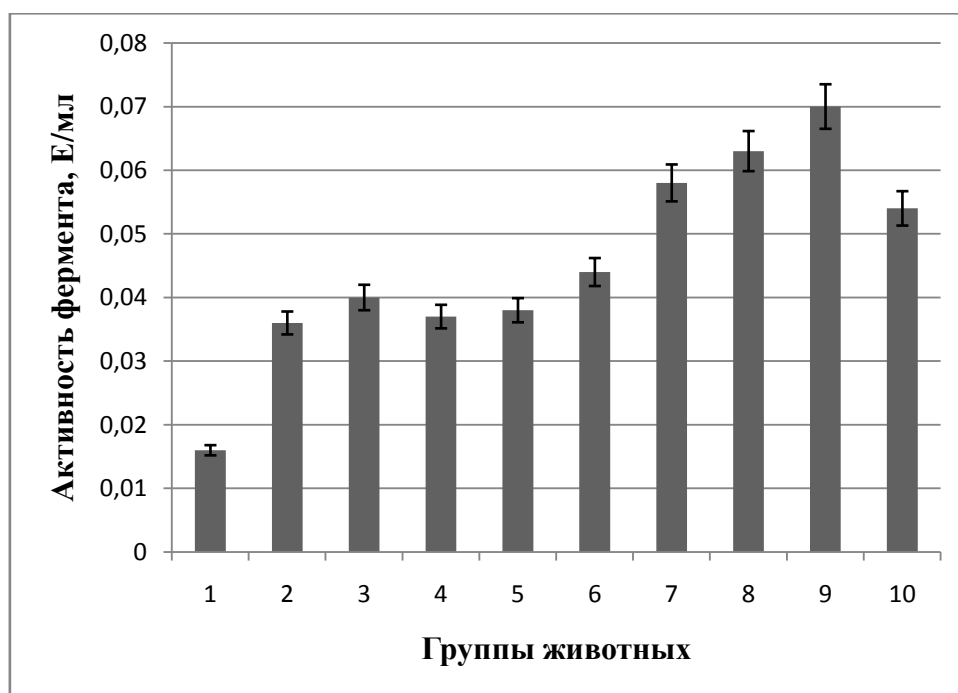
патологией возрастала в 1,6 раза, в сыворотке крови в 4,4 раза по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 18). Удельная активность NADP-ИДГ возрастала в сердце в 1,5 раза, в сыворотке крови в 4,7 раза (рис. 7 приложения).

В патологическом состоянии, вызванном введением адреналина, активность Г6ФДГ в сердце крыс увеличивалась в большей мере, чем активность NADP-ИДГ, что свидетельствует о большей функциональной нагрузке на фермент пентозофосфатного пути как поставщика NADPH для работы ГП/ГР-системы [115].

При действии 3,5-ДКМФБ наблюдалось снижение активности Г6ФДГ в сердце крыс с патологией (рис. 17). В сердце крыс наибольший эффект был выявлен при внутрибрюшинном введении 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг на кг массы тела животного. При этом активность Г6ФДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, снижалась в 2,2 раза и достигала показателей нормы. В данном случае схожие тенденции прослеживались при расчете удельной активности фермента (рис. 6 приложения). При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 50 мг/кг и 75 мг/кг активность Г6ФДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, снижалась в 1,9 и 1,7 раза соответственно. При этом удельная активность Г6ФДГ в сердце уменьшалась в 2,1 и 2,7 раза соответственно. Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 12,5 мг/кг не оказывало влияния на активность Г6ФДГ в сердце крыс. Введение 3,5-ДКМФБ во всех исследуемых дозах приводило к незначительному повышению активности Г6ФДГ, представленной в виде Е на мл сыворотки, по сравнению с животными с патологией (рис. 17). При этом удельная активность Г6ФДГ в сыворотке крови при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5, 50 и 75 мг/кг увеличивалась в 1,5, 1,3 и 1,5 раза соответственно (рис. 6 приложения).



а



б

Рис. 17. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

При действии 2,4-ДМФБ наблюдалось снижение активности Г6ФДГ в сердце крыс, выраженной в Е на грамм сырой массы, и возрастание ферментативной активности в сыворотке крови животных с патологией. Так, при введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг массы тела животного активность Г6ФДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, понижалась в 1,5, 2,0, 2,2 и 1,7 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 17). При этом удельная активность фермента при использовании 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного уменьшалась в сердце в 3,1 раза (рис.6 приложения). Введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 и 75 мг/кг массы тела животного способствовало снижению удельной активности энзима в сердце в 1,3 и 1,8 раза соответственно. В сыворотке крови крыс наблюдались противоположные тенденции. Так, при введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг массы тела животного активность Г6ФДГ в сыворотке крови, выраженная в Е на мл, увеличивалась в 1,6, 1,8, 1,9 и 1,5 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 17). При этом удельная активность фермента повышалась в сыворотке крови в 3,0, 2,3, 2,5 и 2,0 раза (рис.6 приложения).

Снижение активности Г6ФДГ в сердце, возможно, связано со снижением интенсивности свободнорадикальных процессов при введении исследуемых веществ и, как следствие, уменьшением потребности в NADPH для работы таких антиоксидантных систем, как глутатионпероксидазная/глутатионредуктазная, а также тиоредоксин– и глутаредоксин–зависимые системы [46]. Увеличение Г6ФДГ-активности в сыворотке крови животных с кардиоваскулярной патологией, индуцированной введением адреналина, может быть обусловлено специфической активацией эритроцитарной формы фермента под действием данного вещества [347].

Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг веса животного приводило к наиболее выраженному снижению активности NADP-ИДГ как в сердце крыс, так и в сыворотке крови, по сравнению с активностью фермента при

патологии. Так, активность NADP-ИДГ в сердце и сыворотке крови, выраженная в Е на грамм сырой массы и в Е на мл, уменьшалась в 1,6 и 2,6 раза соответственно (рис. 18). При этом удельная активность фермента снижалась в сердце в 1,9 раза, в сыворотке крови животных в 2,8 раза, по сравнению со значениями в патологическом состоянии (рис. 7 приложения.). При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг наблюдалось снижение активности фермента в сердце в 1,3 раза, в сыворотке крови животных в 2,0 раза (рис. 18). При этом удельная активность фермента в сердце уменьшалась в 1,4 раза, а в сыворотке крови в 1,8 раза (рис. 7 приложения.). Введение 3,5-ДКМФБ в дозе 75 мг/кг сопровождалось снижением активности энзима в сыворотке крови, выраженной в Е на мл, в 1,7 раза, в сердце активность NADP-ИДГ, представленная в виде Е на грамм сырой массы, оставалась без изменений. При этом удельная активность фермента понижалась в сыворотке крови в 1,4 раза, а в сердце в 1,6 раза. При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 12,5 мг/кг веса животного наблюдалось увеличение активности NADP-ИДГ, как в сердце крыс, так и в сыворотке крови, представленной в виде Е на грамм сырой массы и в Е на мл, в 1,2 раза, по сравнению с активностью фермента при патологии (рис. 18).

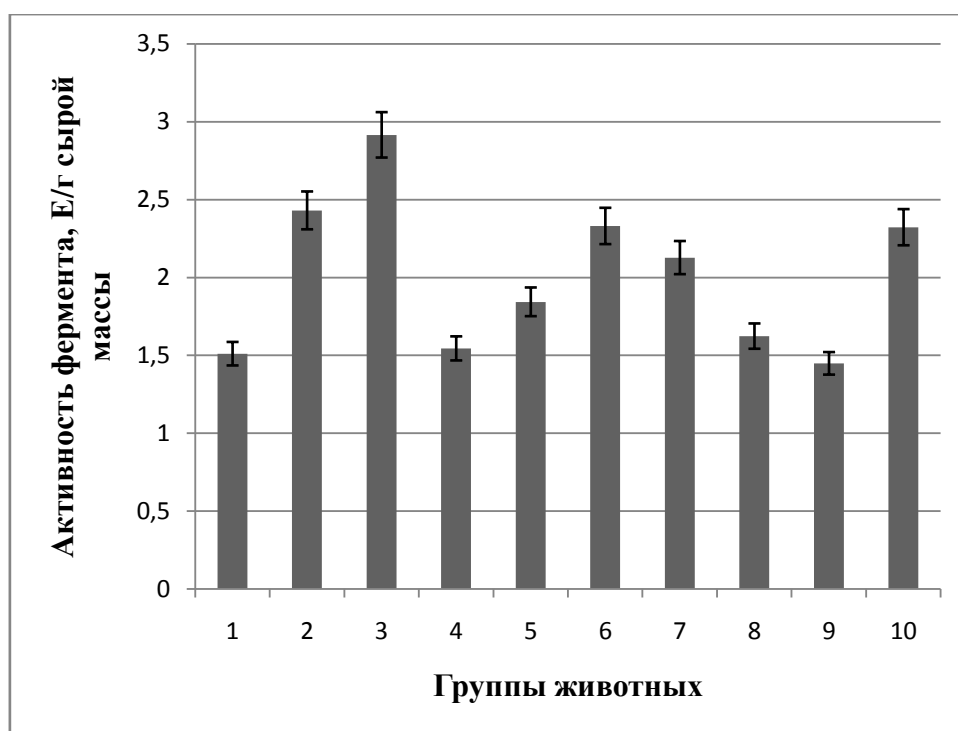
При действии 2,4-ДМФБ наблюдалось снижение активности NADP-ИДГ в сердце и в сыворотке крови животных с КН, вызванными введением адреналина. Так, при введении 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25 и 50 мг/кг массы тела животного активность NADP-ИДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, понижалась в 1,1, 1,5 и 1,7 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 18). Введение 2,4-ДМФБ в дозе 75 мг/кг массы тела животного не оказывало влияния на активность NADP-ИДГ в сердце крыс. Те же тенденции прослеживались и при расчете удельной активности фермента. При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного удельная активность фермента снижалась в сердце в 2,2 раза (рис. 7 приложения). Использование 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг/кг массы тела уменьшало удельную активность энзима в сердце в 1,1 раза. Введение 2,4-

ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного сопровождалось снижением активности NADP-ИДГ в сыворотке крови, выраженной в Е на мл, в 1,3 раза, по сравнению с животными с патологией (рис. 18). При введении протектора в дозах 12,5 и 75 мг/кг массы тела животного наблюдалось уменьшение активности энзима в сыворотке крови, представленной в Е на мл, в 1,2 и 1,7 раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25, 50 и 75 мг/кг массы тела животного сопровождалось снижением удельной активности фермента в сыворотке крови в 1,1, 1,2 и 1,3 раза соответственно (рис.7 приложения).

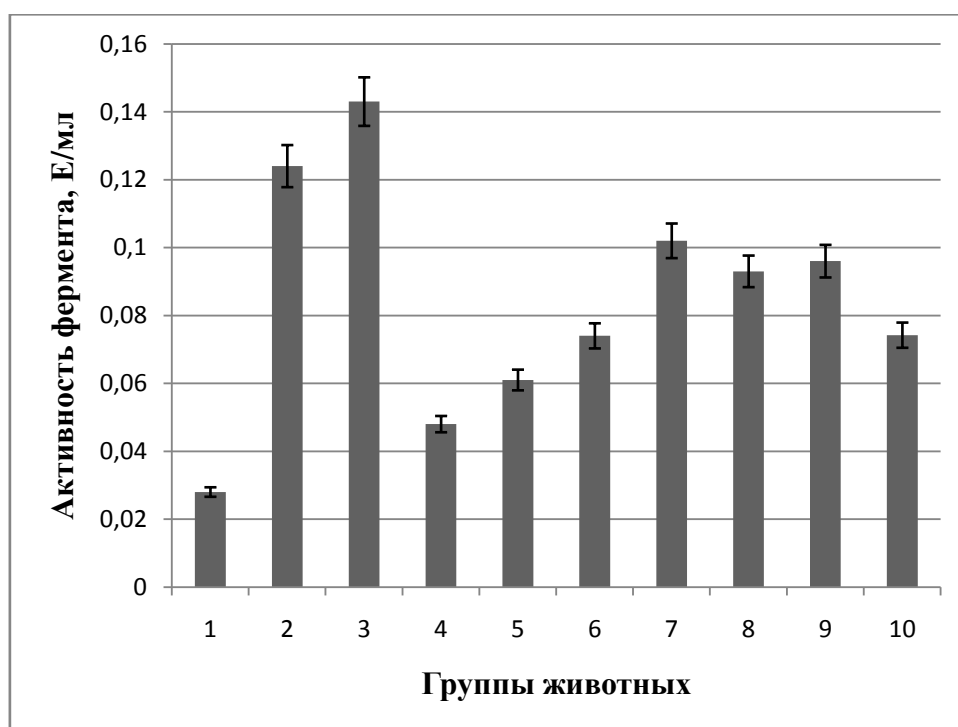
Снижение активности NADP-ИДГ, возможно, связано с уменьшением интенсивности свободнорадикального окисления при введении исследуемого вещества и, как следствие, снижением нагрузки на ГП/ГР систему.

Результаты исследования показали, что 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ оказывают тканеспецифичное действие на исследуемые NADPH-генерирующие ферменты при кардиоваскулярной патологии, вызванной введением адреналина, у крыс. Введение данных веществ, в большинстве случаев, приводило к снижению активности NADP-изоцитратдегидрогеназы в сердце и сыворотке крови крыс и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сердце крыс по сравнению с их уровнем при патологии.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что наиболее оптимальными дозами вводимых веществ являются дозы 25 мг/кг и 50 мг/кг, при которых наблюдается наиболее выраженный позитивный эффект на антиоксидантный статус организма. Внутривентриальное введение данных бигуанидов в дозе 12,5 мг/кг не оказывало существенного протекторного влияния, вероятно, из-за недостаточности используемой концентрации.



а



б

Рис. 18. Активность NADP-изоцитратдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

3.7. Влияние протекторов на активность аконитазы и содержание цитрата в тканях крыс при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина

В настоящее время АГ рассматривают в качестве чувствительной и критической мишени действия АФК в условиях окислительного стресса, что позволяет использовать определение активности данного фермента для оценки интенсивности свободнорадикального окисления. При патологии происходило уменьшение активности АГ, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 1,9 раза, в сыворотке крови в 3,1 раза соответственно (рис. 19). Удельная активность фермента снижалась в сердце в 2,0 раза, в сыворотке крови в 3,0 раза по сравнению с контролем (рис. 8 приложения). Наблюдаемые изменения активности фермента, вероятно, связаны с тем, что АФК, содержание которых возрастает при возникновении КН, индуцируемых введением адреналина, разрушают железо-серные кластеры АГ и переводят фермент в неактивную форму.

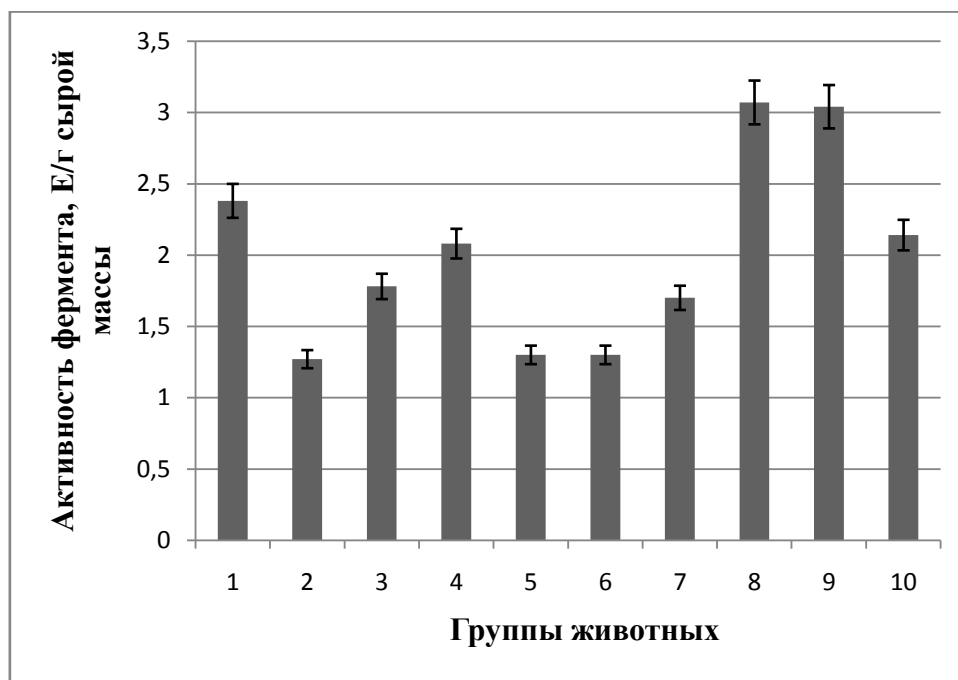
Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ во всех исследуемых дозах приводило к возрастанию активности АГ по сравнению с животными с патологией (рис. 19). Максимальный эффект был выявлен при введении бигуанидов в дозе 25 мг/кг веса тела животного. Так, при введении 3,5-ДКМФБ в указанной дозе наблюдалось увеличение активности АГ, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 1,6 раза, в сыворотке крови в 4,7 раза соответственно. При этом удельная активность фермента повышалась в сердце в 1,4 раза, в сыворотке крови в 4,4 раза (рис. 8 приложения). Введение 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг/кг приводило к увеличению активности АГ, представленной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 2,4 раза, в сыворотке крови в 4,3 раза соответственно (рис. 19). Удельная активность АГ при введении вышеуказанной дозы данного протектора возрастала в сердце в 1,7 раза, в сыворотке крови в 5,2 раза (рис. 8 приложения). По-видимому, 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ уменьшали степень

повреждения молекулы АГ свободными радикалами. Вероятно, активация АГ при введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ происходила вследствие снижения уровня свободнорадикального окисления биомолекул и реконструкции железо-серного кластера данного фермента.

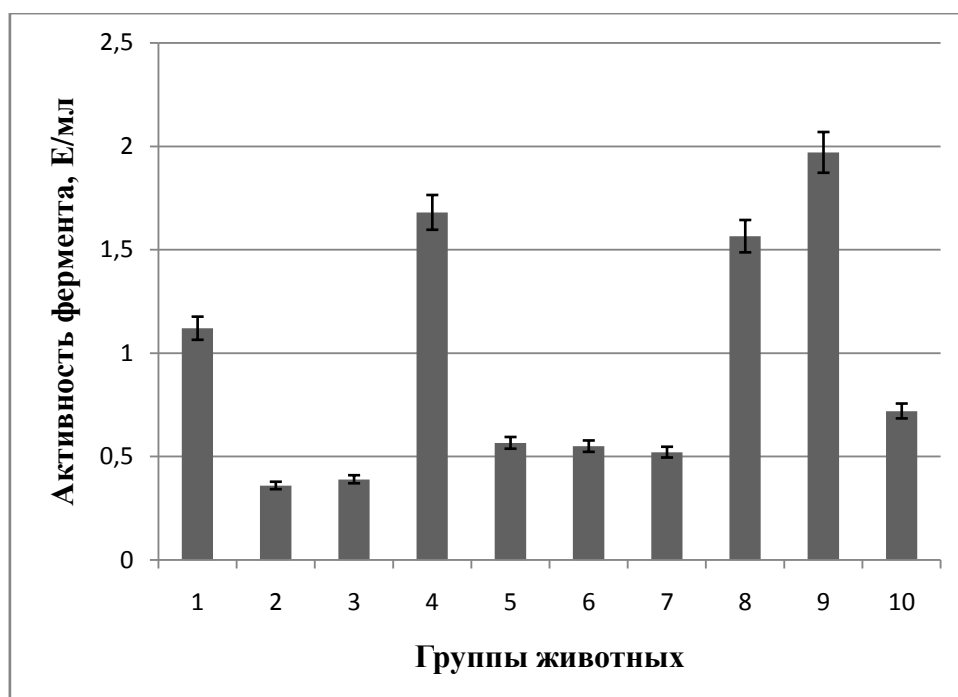
При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 12,5 мг/кг наблюдалось увеличение активности АГ в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,4 раза. Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 50 мг/кг и 75 мг/кг приводило к возрастанию активности АГ в сыворотке крови, представленной в виде Е на мл, в 1,6 и 1,5 раза соответственно. При этом удельная активность фермента в сыворотке крови увеличивалась в 1,8 раза по сравнению с животными 2-й группы.

При введении 2,4-ДМФБ в дозе 12,5 мг/кг наблюдалось увеличение активности АГ, рассчитанной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце и в сыворотке крови в 1,4 раза соответственно. При этом удельная активность фермента возрастала в сердце в 1,3 раза, в сыворотке крови в 2,4 раза по сравнению с животными 2-й группы. Введение данного протектора в дозах 50 мг/кг и 75 мг/кг приводило к увеличению активности АГ, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 2,4 и 1,7 раза, в сыворотке крови в 5,5 и 2,0 раза соответственно (рис. 19). При этом удельная активность АГ возрастала в сердце в 1,8 и 1,7 раза, в сыворотке крови в 6,2 и 2,7 раза соответственно (рис. 8 приложения).

Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными о проявлении некоторыми производными гуанидина антиоксидантной активности. Известно, что гуанидиновые производные, например меркаптоэтилгуанидин, метформин и другие, способны непосредственно перехватывать свободные радикалы, в частности пероксинитрит, или опосредованно уменьшать их содержание за счет торможения внутриклеточного формирования. Данные вещества выступают в качестве ингибиторов NADPH-оксидазы, являющейся основным источником супероксидного радикала, и NO-синтазы, образующей оксид азота [30].



а



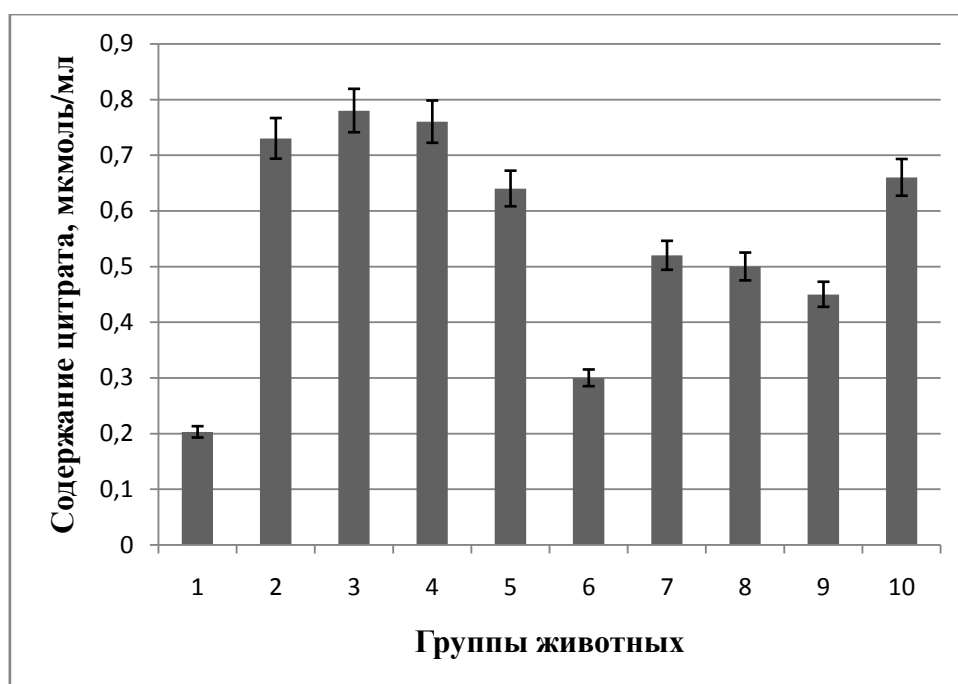
б

Рис. 19. Активность аконитатгидратазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

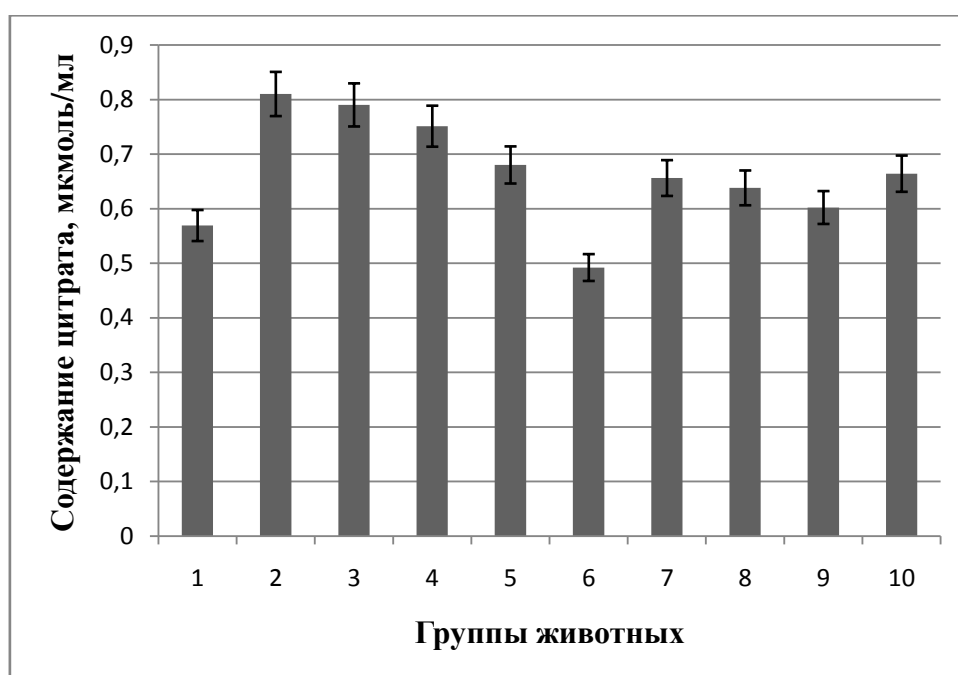
Возрастание ферментативной активности выше показателей контроля может быть обусловлено особенностями влияния данных веществ на метаболические процессы в клетке, а именно, активацией путей утилизации глюкозы под действием гуанидиновых производных, что может вести к усилению функционирования цикла трикарбоновых кислот. Это согласуется с данными, что производные бигуанидов, фенформин и метформин, подобно инсулину, усиливают поступление глюкозы в клетки, активируют гликолиз и ингибируют глюконеогенез [180, 248].

На фоне развития кардиоваскулярных нарушений, вызванных введением адреналина, наблюдалось возрастание содержания цитрата. Так, в сердце содержание цитрата увеличивалось в 3,6 раза, а в сыворотке крови крыс в 1,4 раза, по сравнению с контролем (рис. 20). Это может быть связано с уменьшением активности АГ, фермента катализирующего превращения цитрата в изоцитрат. Кроме того, накопление цитрата может быть адаптивным процессом при развитии оксидативного стресса на фоне развития кардиоваскулярной патологии, так как он способен хелатировать ионы Fe^{2+} , которые являются катализаторами цепных СРП, в результате уменьшается вероятность образования гидроксильного радикала [281]. Цитрат обладает свойствами хелатора, за счет наличия в его структуре трех карбоксильных групп.

Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 50 и 75 мг/кг веса животного сопровождалось снижением уровня цитрата в сердце в 1,1 и 2,4 раза, в сыворотке крови в 1,2 и 1,6 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 20). При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 и 25 мг на кг не наблюдалось достоверных изменений содержания цитрата в сердце и сыворотке крови крыс, по сравнению с показателями животных 2-й группы.



а



б

Рис. 20. Содержание цитрата в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) мг/кг и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

Введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг веса животного приводило к уменьшению уровня цитрата в сердце в 1,4, 1,5, 1,6 и 1,1 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией. При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось снижение содержания цитрата в сыворотке крови крыс в 1,3 раза, по сравнению с показателями животных с кардиоваскулярными нарушениями (рис. 20). Введение 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 и 75 мг/кг веса животного приводило к уменьшению уровня цитрата в сыворотке крови крыс в 1,2 раза, по сравнению с животными с патологией.

Таким образом, развитие кардиоваскулярной патологии, вызванной введением адреналина, у животных сопровождалось уменьшением активности АГ, что, по-видимому, было связано с чрезмерной генерацией АФК и интенсификацией СО при развитии патологии. Повышение содержания цитрата, по-видимому, происходило вследствие угнетения активности АГ – основного фермента, участвующего в его метаболизме. Введение синтетических производных бигуанида приводило к изменению исследуемых параметров в сторону нормы, что, по-видимому, могло быть связано с наличием у данных веществ протекторных свойств.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ
СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ
АКТИВНОСТИ ПРИ ДЕЙСТВИИ 3,5-
ДИКАРБОМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА И 2,4-
ДИМЕТОКСИФЕНИЛБИГУАНИДА НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ
КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

4.1. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-
диметоксифенилбигуанида на маркерные показатели развития
кардиоваскулярной патологии при экспериментальном ревматоидном
артрите

Ревматоидный фактор включен в классификационные критерии ревматоидного артрита и служит маркером серопозитивной и серонегативной форм болезни. Результаты ряда проспективных исследований свидетельствуют, что РФ может являться прогностическим фактором прогрессирования эрозивного процесса [206]. Измерение уровня СОЭ является еще одним показателем, определяемым при РА, поскольку он является наиболее воспроизводимым и доступным для оценки состояния пациентов. Имеются данные, свидетельствующие, что СОЭ может являться биомаркером воспаления при РА [346].

Согласно полученным в ходе работы результатам, маркерные показатели развития ревматоидного артрита – РФ и СОЭ, достигали максимума на 15 день эксперимента, что согласуется с имеющимися литературными данными [262]. Было установлено, что содержание РФ увеличивалось в 1,5 раза, а показатель СОЭ – в 3,0 раза по сравнению с контрольной группой животных (рис. 21, 22) [61, 62, 63].

В ходе развития РА на 6 день исследования разница толщины воспалённой лапки крыс и лапки животных контрольной группы, измеренная

у щиколотки, составляла в среднем $1,4 \pm 0,2$ мм. Разница толщины лапок крыс, измеренная на 15 день после индукции патологии, составляла в среднем $0,7 \pm 0,2$ мм [64]. Согласно нашим результатам исследований, внешние клинические проявления развития патологии были более явными в течение первой недели эксперимента и достигали максимума приблизительно на 6 день после индукции РА. На 15-й день эксперимента после индукции патологии толщина лапок крыс, измеренная у щиколотки, увеличивалась в 1,5 раза по сравнению с показателями в норме. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о развитии РА у экспериментальных животных.

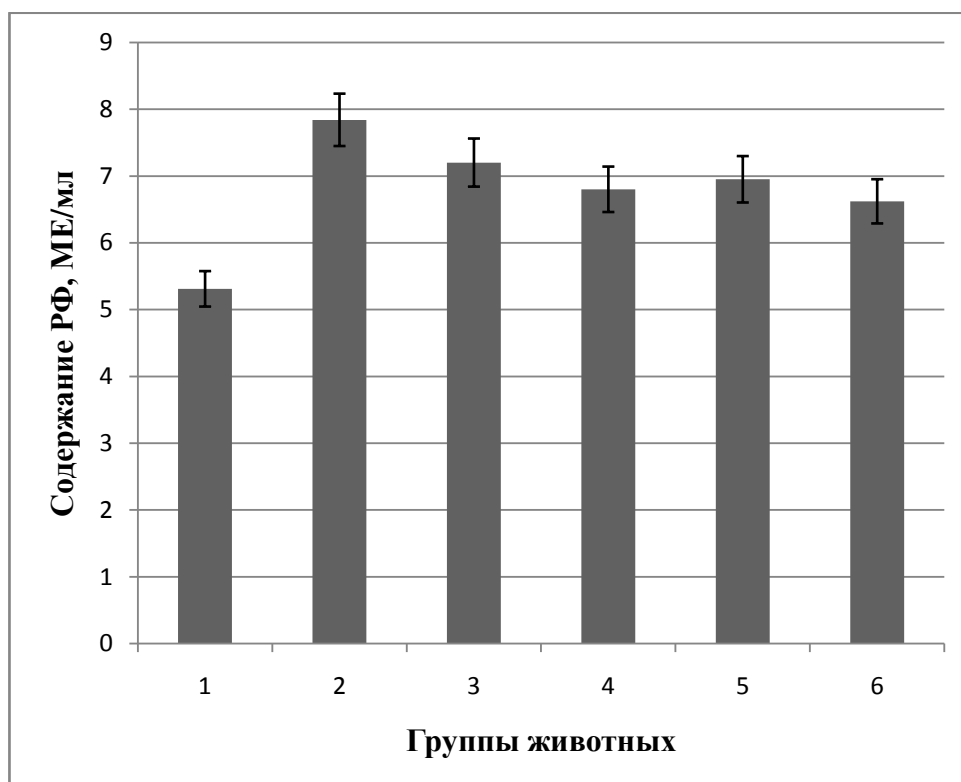


Рис. 21. Содержание ревматоидного фактора в сыворотке крови животных контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

Введение производных бигуанида приводило к снижению маркерных показателей – РФ, СОЭ, а также изменению толщины лапок крыс в сторону контрольных значений (рис. 21, 22). Так, при введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного РФ уменьшался на 13% и 18% соответственно по сравнению с животными с патологией. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного сопровождалось снижением СОЭ в 1,7 и 2,6 раза по сравнению с животными 2-й группы. Толщина лапки при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного уменьшалась в 1,5 и 1,6 раза по сравнению с животными с патологией. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса тела животного приводило к уменьшению толщины лапки в 1,3 и 1,4 раза соответственно по сравнению с показателями 2-й группы животных.

В литературе имеются данные, что в нормализации СОЭ при РА большую роль могут играть биологические агенты, способствующие снижению активности данного заболевания. Так, установлено, что при действии препаратов адалимубаб и метатрекс при ремиссии РА у половины пациентов наблюдались улучшения биохимических и клинических показателей, в том числе нормализация СОЭ. [329]. Таким образом, полученные нами результаты соответствуют литературным данным об улучшении выбранных маркерных показателей заболевания при действии препаратов, оказывающих благоприятное влияние при РА. Снижение уровня РА, СОЭ, а также изменение толщины лапок экспериментальных животных в сторону контрольных значений свидетельствуют о положительном воздействии исследуемых бигуанидиновых производных при РА.

Из литературных данных известно, что среди внесуставных проявлений РА в настоящий момент наибольшее значение имеет поражение сердечно-сосудистой системы, проявляющееся в виде перикардита, миокардиодистрофии, миокардита, эндокардита, амилоидоза, васкулита, поражения клапанного аппарата сердца, сердечной недостаточности и ишемической болезни сердца [293, 365].

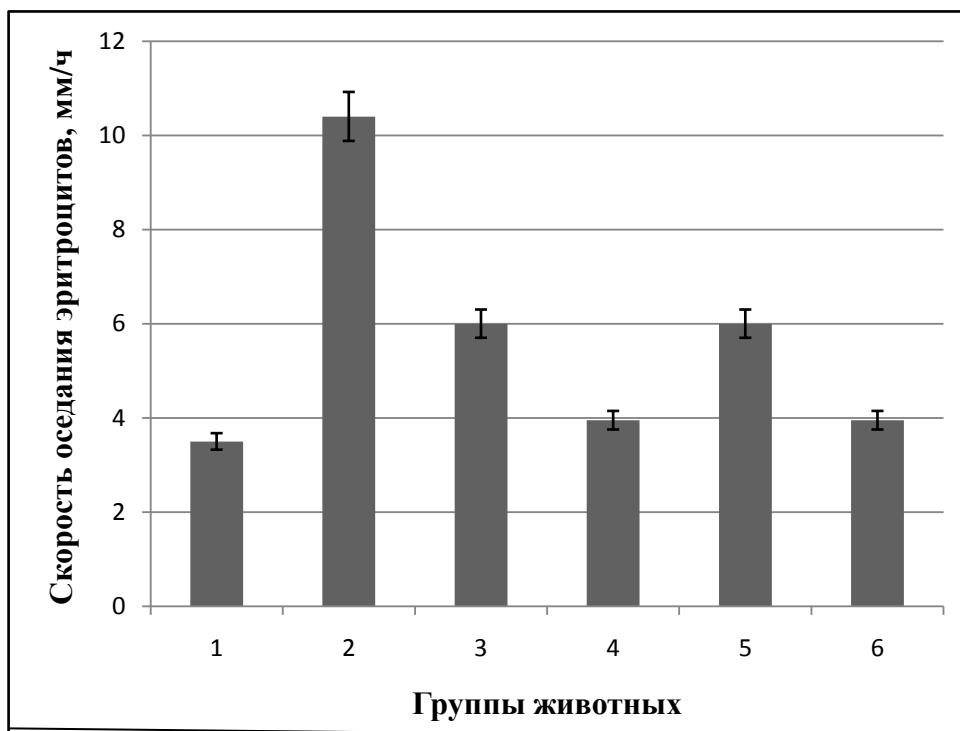


Рис. 22. Скорость оседания эритроцитов крови животных контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

В связи с этим в ходе исследования нами было проведено определение в сыворотке крови подопытных животных уровня маркерных ферментов, свидетельствующих о нарушении функционирования миокарда - АсАТ и КК-МВ. При патологии происходило увеличение активности данных ферментов в 1,9 и в 1,5 раза соответственно по сравнению с контрольной группой животных (рис. 23, 24).

Введение производных бигуанида приводило к снижению активности АсАТ, КК-МВ (рис. 23, 24). Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного активность АсАТ снижалась в 1,1 и 1,3 раза соответственно по сравнению с животными с патологией. Активность КК-МВ при введении данного вещества в тех же дозах уменьшалась в 1,6 раза по сравнению с животными 2-й группы. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50

мг/кг веса тела животного приводило к снижению активности АсАТ в 1,2 и 1,4 раза по сравнению с животными с патологией. Активность КК-МВ при введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного понижалась в 1,3 раза по сравнению с животными с кардиоваскулярными патологическими изменениями, развивающимися при РА.

Снижение активности АсАТ и КК-МВ под действием производных бигуанида свидетельствовало об уменьшении степени цитолиза кардиомиоцитов у исследуемых животных, что является следствием проявления кардиопротекторных свойств исследуемых соединений. Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными. Известно, что метформин характеризуется антиоксидантными свойствами, связанными со снижением скорости клеточных окислительных реакций, в том числе и окислительного гликозилирования белков [248, 274].

Таким образом, введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ приводило к приближению маркерных показателей патологии к норме. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о способности гуанидиновых производных проявлять протекторное действие при кардиоваскулярных нарушениях, развивающихся на фоне экспериментального ревматоидного артрита.

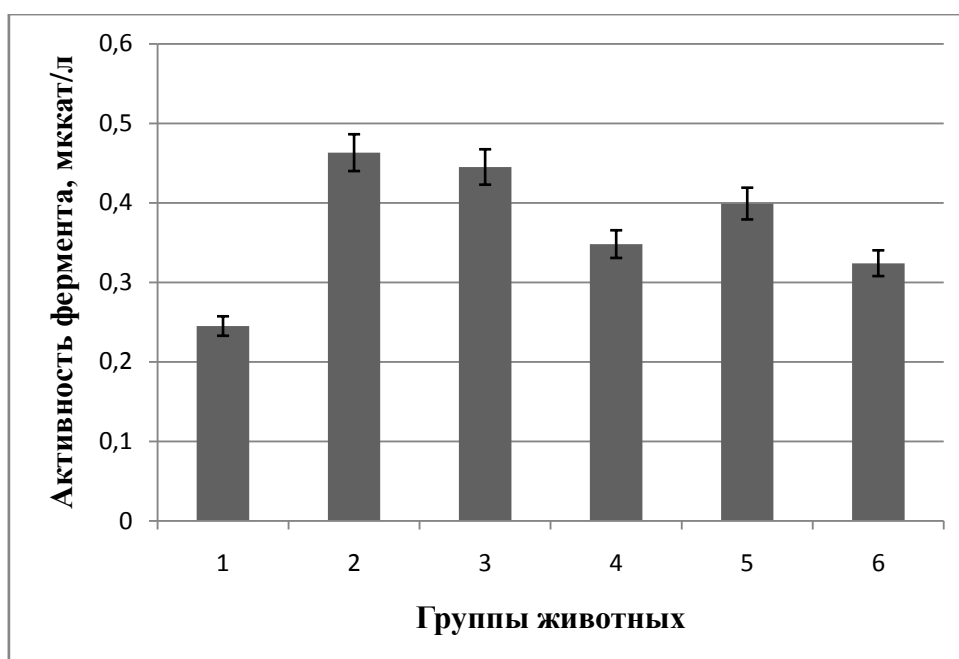


Рис. 23. Активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

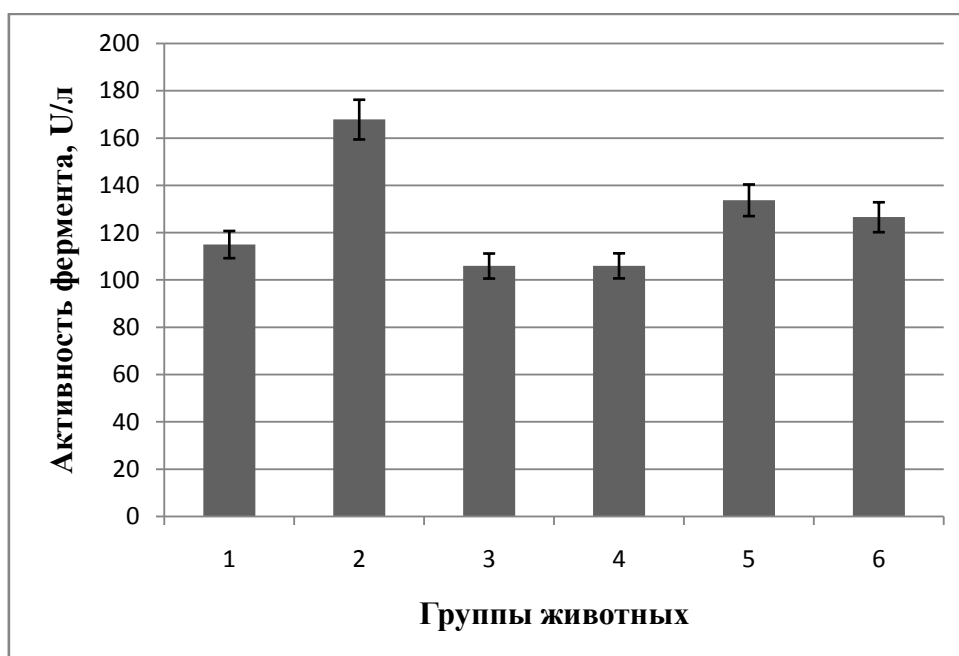


Рис. 24. Активность креатинкиназы - МБ в сыворотке крови животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, на фоне развития РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

4.2. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на оксидативный статус в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита

Оценка оксидативного статуса в тканях крыс при патологии и действии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ осуществлялась на основе параметров биохемилюминесценции, определения содержания диеновых конъюгатов и фрагментации ДНК.

4.2.1. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на интенсивность свободнорадикальных процессов в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, ассоциированной с развитием экспериментального ревматоидного артрита

В литературе имеются некоторые данные, свидетельствующие в пользу того, что в процессе патогенеза РА активизируется генерация АФК [378]. Известно, что среди внесуставных проявлений РА особое место занимает поражение сердечно-сосудистой системы, проявляющееся в виде миокардиодистрофии, миокардита, эндокардита, сердечной недостаточности и ИБС [293]. При этом ряд литературных данных подтверждает существенную роль интенсификации генерации АФК и ПОЛ в развитии кардиоваскулярных нарушений, в том числе при миокардите, инфаркте миокарда и ишемической болезни сердца, способствующих разрушению как плазмолеммы, так и субклеточных мембран кардиомиоцитов, что усугубляет течение патологического процесса [134].

Оценка влияния синтетических производных бигуанида на интенсивность свободнорадикального окисления в тканях крыс при

кардиоваскулярных нарушениях, возникающих на фоне развития РА, осуществлялась на основе параметров БХЛ и определения содержания диеновых конъюгатов. Согласно полученным данным параметры БХЛ: S и I_{\max} , характеризующие интенсивность свободнорадикальных процессов, увеличивались при патологии в сердце – в 1,5 и 1,3 раза, в сыворотке крови в 1,3 и 1,5 раза, соответственно (табл. 7, 8). Параметры БХЛ: S и I_{\max} , возрастающие в патологическом состоянии, снижались в сердце и сыворотке крови крыс при введении исследуемых бигуанидов. Так, введение 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг приводило к снижению исследуемых параметров в сердечной мышце крыс в 1,1 и 1,3 раза соответственно, в сыворотке крови – в 1,3 и 1,5 раза соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в данной дозе сопровождалось снижением данных параметров в сердечной мышце крыс в 1,2 раза, в сыворотке крови – в 1,3 и 1,4 раза.

Таблица 7

Параметры биохемилюминесценции в сердце животных исследуемых групп

№ Группы животных	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), mVx c	Интенсивность максимальной вспышки (I_{\max}), mV	Тангенс угла наклона кинетической кривой ($\operatorname{tg} \alpha_2$)
1	485±24	51,5±2,6	7,1±0,36
2	715±41	65,4±2,8	8,5±0,41
3	694±26*	62,3±2,2*	8,6±0,39*
4	668±18*	51,3±1,1*	7,8±0,63*
5	669±19*	59,5±2,8*	8,7±0,64*
6	606±23*	56,1±2,3*	7,9±0,61*

Примечание: * - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$).

В условиях развития патологии величина $\text{tg}\alpha_2$, отражающая общую антиоксидантную активность, возрастала в сердце – в 1,2 раза, в сыворотке крови в 1,7 раза, по сравнению с показателями нормы (табл. 7, 8), что свидетельствует о мобилизации АОС организма в ответ на усиление свободнорадикальных процессов.

Введение синтетических производных бигуанида в дозе 50 мг/кг приводило к снижению величины $\text{tg}\alpha_2$ как в сердце, так и в сыворотке крови животных с патологией. Под влиянием 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ у крыс с РА было выявлено снижение значения тангенса угла наклона кинетической кривой биохемилюминесценции в сердце крыс на 10%, а в сыворотке крови на 20% и 10%, соответственно, относительно группы животных с патологией. При введении протекторов в дозе 25 мг/кг не было выявлено достоверных отличий данного показателя от значений у животных с кардиоваскулярными нарушениями, развивающимися при РА.

Таблица 8

Параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови животных
исследуемых групп

№ группы животных	Светосумма вспышки хемилюминесценции (S), mVхс	Интенсивность максимальной вспышки (I _{max}), mV	Тангенс угла наклона кинетической кривой ($\text{tg } \alpha_2$)
1	903±45	68,5±3,4	14,5±0,7
2	1197±57	102,5±5,8	24,1±0,91
3	1069±51*	97,6±4,1*	24,3±0,92*
4	899±41*	70,2±3,9*	20,3±0,93*
5	1129±49*	100,5±2,6*	24,2±0,94*
6	907±40*	75,2±3,8*	21,8±0,61*

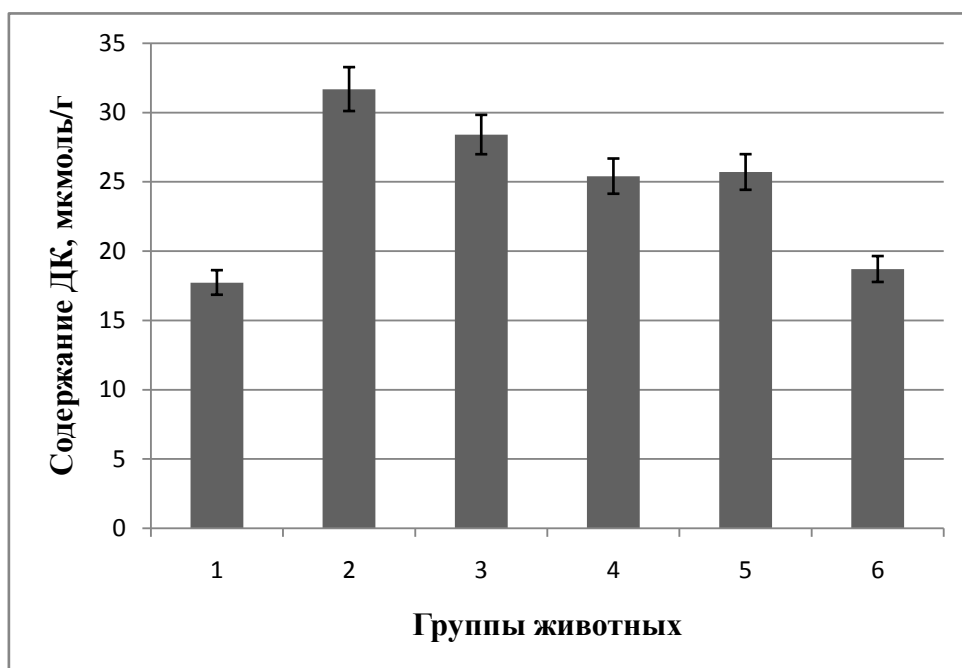
Примечание: * - отличия от значений контрольной группы достоверны (уровень значимости $p < 0,05$).

Полученные результаты могут свидетельствовать об уменьшении степени мобилизации антиоксидантной системы вследствие снижения интенсивности СО биосубстратов под влиянием исследуемых гуанидиновых производных в дозе 50 мг/кг.

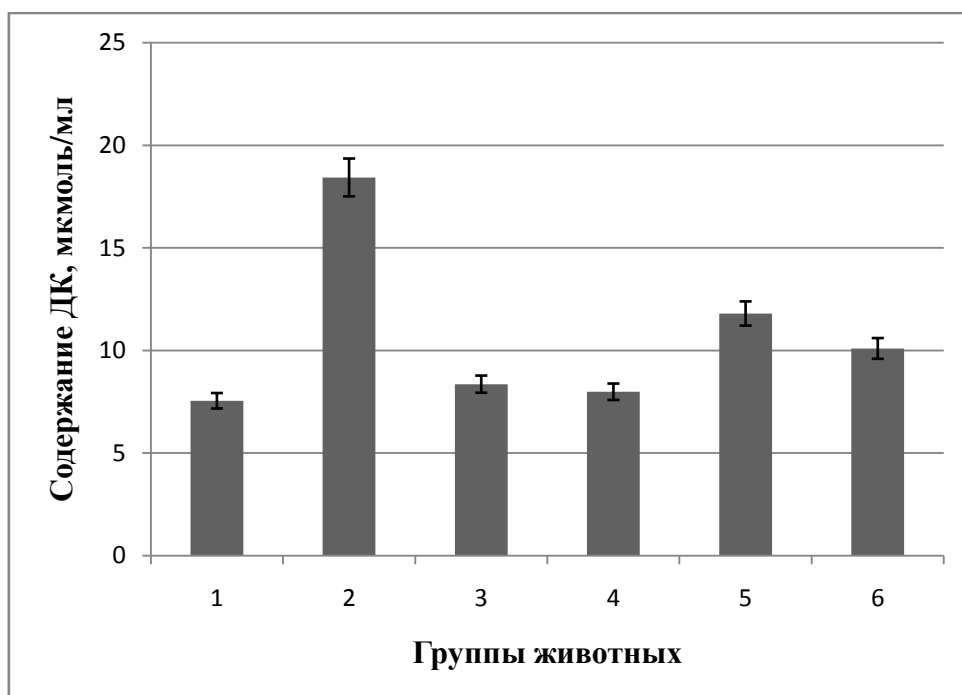
Образовавшиеся в процессе патогенеза РА АФК могут оказывать разрушающее влияние на биологические молекулы, такие как полисахариды, белки, ДНК, а также инициировать пероксидное окисление липидов. Первичные продукты ПОЛ – диеновые конъюгаты относятся к токсическим метаболитам, также оказывающим повреждающее действие на биомолекулы [102]. Результатами данных процессов являются морфо-функциональные нарушения клеточных структур, деградация коллагена, повреждение соединительной ткани.

Развитие экспериментального РА сопровождается увеличением содержания ДК в тканях животных [62, 64]. Введение исследуемых бигуанидов приводило к снижению концентрации ДК в сыворотке крови и сердечной мышце крыс по сравнению с животными с патологией (рис. 25).

При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного содержание ДК уменьшалось в сердце крыс в 1,1 и 1,3 раза соответственно. Введение данного вещества в указанных выше дозах приводило к снижению содержания ДК в сыворотке крови крыс в 2,2 и 2,3 раза. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг на кг веса тела животного сопровождалось снижением содержания ДК в сердце крыс в 1,2 и 1,7 раза, в сыворотке крови крыс в 1,6 и 1,8 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 25).



а



б

Рис. 25. Содержание диеновых конъюгатов в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

Таким образом, снижение интенсивности процессов свободнорадикального окисления при действии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в сердце и в сыворотке крови крыс с экспериментальным ревматоидным артритом, вероятно, обусловлено реализацией комплекса эффектов, обеспечивающего антиоксидантное действие исследуемых бигуанидов. В настоящее время известно, что некоторые гуанидиновые производные, например, меркаптоэтилгуанидин, метформин и другие, способны непосредственно перехватывать свободные радикалы, в частности, пероксинитрит, или опосредованно уменьшать их содержание за счет торможения внутриклеточного формирования. Этот эффект обусловлен ингибированием NADPH-оксидазы, являющейся основным источником супероксидного радикала, и NO-синтазы, образующей оксид азота [58, 270].

4.2.2. Воздействие 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на фрагментацию ДНК при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита

Согласно полученным результатам, ДНК, выделенная из сердца крыс с сердечно-сосудистой патологией, развивающейся на фоне ревматоидного артрита, была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб (рис. 26). При этом образованные фрагменты ДНК создавали характерную “апоптозную лестницу”.

Из литературных данных известно, что такие фрагменты образуются при воздействии апоптоз-специфических нуклеаз [287]. Визуализировалась также высокоподвижная полоса в области низких молекулярных масс, которая соответствовала разрушенной ДНК, ее присутствие связано с развитием некроза [143]. Результаты, полученные при исследовании степени фрагментации ДНК, свидетельствовали об усилении апоптотических процессов в сердце крыс при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита. В индукции данных процессов могут

принимать участие АФК [80, 106], уровень которых при данной патологии возрастает, что подтверждается данными по исследованию параметров БХЛ и содержания ДК, представленными выше.

Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг животным с сердечно-сосудистой патологией, развивающейся на фоне ревматоидного артрита, приводило к снижению степени фрагментации ДНК, апоптотическая лестница в большинстве проб практически не визуализировалась (рис. 26), что может быть свидетельством антиапоптотического действия исследуемых бигуанидиновых производных. Снижение интенсивности апоптоза в кардиомиоцитах, очевидно, было взаимосвязано с уменьшением скорости свободнорадикальных процессов, на что указывают результаты определения параметров БХЛ и уровня ДК при введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ.

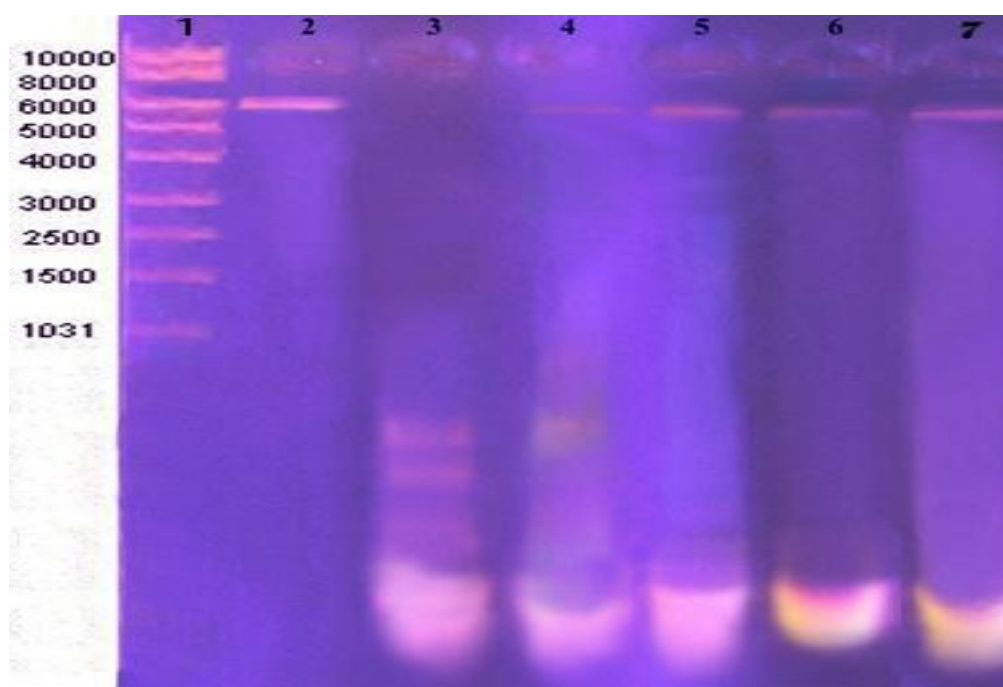


Рис. 26. Электрофореграмма препаратов ДНК из кардиомиоцитов крыс: 1 - маркеры молекулярной массы; 2 - крысы контрольной группы (контроль); 3 - крысы с сердечно-сосудистой патологией, развивающейся на фоне РА; 4, 5 - группы крыс с патологией после введения 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг; 6,7 - группы крыс с патологией после введения 2,4-ДМФБ в дозах 12,5, 25, 50 и 75 мг/кг

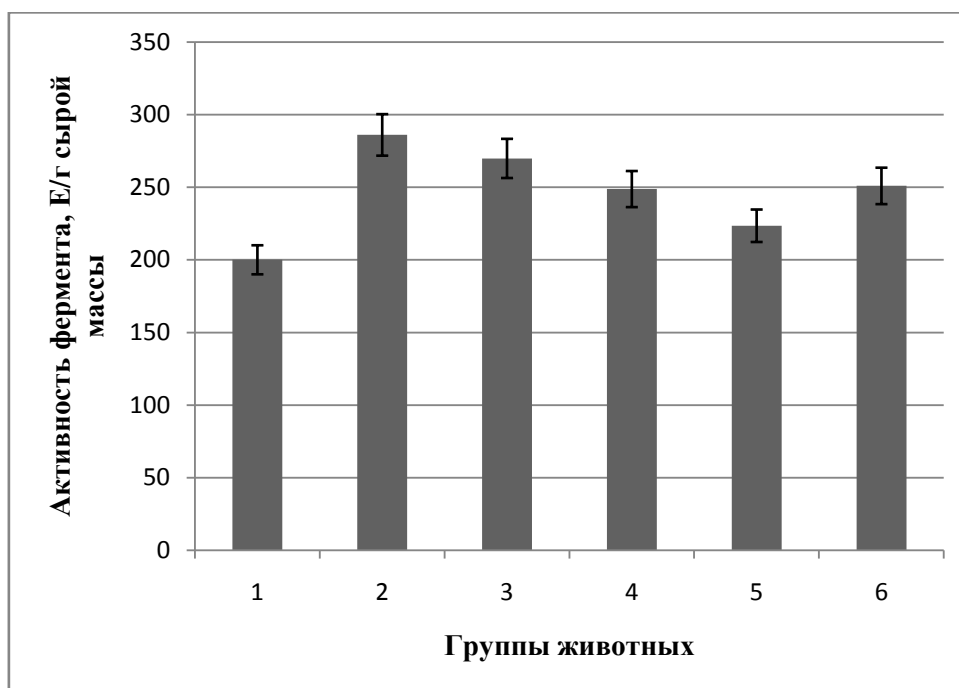
4.3. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярных нарушениях, возникающих на фоне ревматоидного артрита

В процессе эволюции в клетках для защиты от АФК сформировались специализированные системы ферментативных антиоксидантов. Говоря об особенностях функционирования данного звена АОС, следует отметить, что реакции дисмутации $O_2^{\cdot-}$ и разложения H_2O_2 экзотермичны, а катализирующие эти реакции супероксиддисмутаза [364] и каталаза [82] не нуждаются в кофакторах, что делает их активность не зависящей от функционирования других клеточных структур.

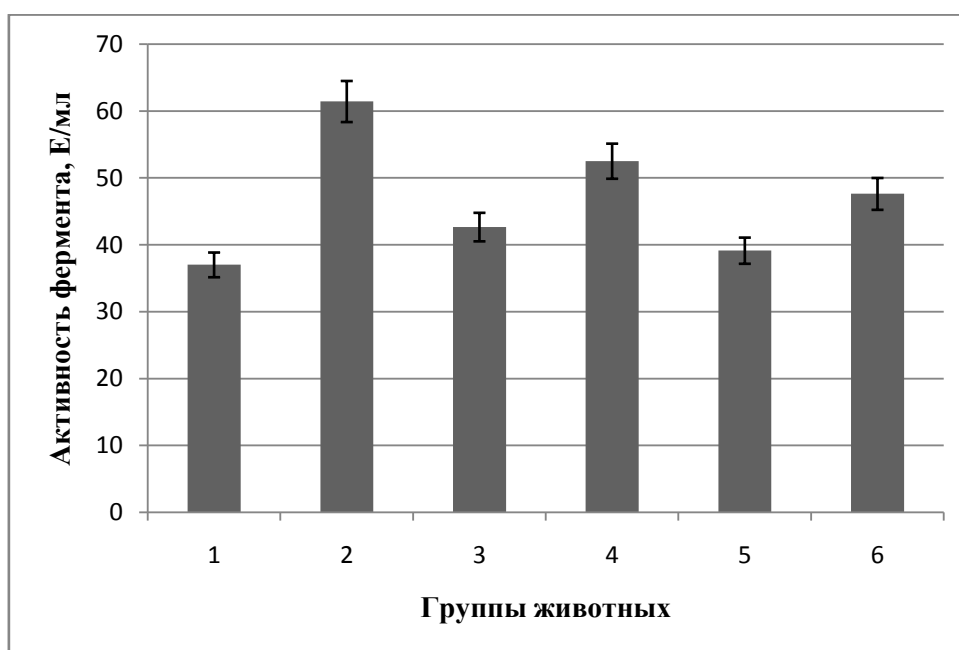
Установлено, что при кардиоваскулярных нарушениях, развивающихся на фоне ревматоидного артрита, в тканях крыс происходит возрастание ферментативной активности СОД. Так, активность фермента в сердце и сыворотке крови, выраженная в Е на г сырой массы и в Е на мл, увеличивалась в 1,4 и 1,7 раза соответственно (рис. 27). При этом удельная активность СОД, в сердце и сыворотке крови животных возрастала в 1,7 и 2,7 раза соответственно (рис. 9 приложения). Вероятно, данные изменения активности СОД при патологии являются признаком функциональных изменений, вызванных избыточной генерацией СР и увеличением биосинтеза антиоксидантных ферментов в процессе развития окислительного стресса [158].

Введение исследуемых бигуанидиновых производных приводило к снижению активности СОД по сравнению с показателями животных при патологии. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось снижение активности СОД, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце в 1,1 и 1,2 раза, в сыворотке крови в 1,4 и 1,2 раза соответственно (рис. 27). При введении 3,5-ДКМФБ в исследуемых дозах

наблюдалось снижение удельной активности СОД в сердце в 1,3 раза, в сыворотке крови в 1,9 и 1,3 раза.



а



б

Рис. 27. Активность супероксиддисмутазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), с сердечно-сосудистой патологией, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось уменьшение активности СОД в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,3 и 1,2 раза соответственно (рис. 27). Введение 2,4-ДМФБ в исследуемых дозах приводило к снижению активности фермента в сыворотке крови, рассчитанной в Е на мл, в 1,6 и 1,3 раза, по сравнению с животными с патологией. При расчёте удельной активности фермента в сердце и в сыворотке крови крыс сохранялись тенденции, характерные для активностей, выраженных в Е на грамм сырой массы и в Е на мл (рис. 9 приложения). Так, при введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось уменьшение удельной активности СОД в сердце в 1,6 и 1,2 раза соответственно, в сыворотке крови - в 2,2 и 1,8 раза, по сравнению с животными 2-й группы.

Таким образом, введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на фоне развития кардиоваскулярных нарушений при ревматоидном артрите, по-видимому, сопровождалось нормализацией свободнорадикального гомеостаза, что выражалось в снижении функциональной нагрузки на СОД. Вероятно, при введении бигуанидиновых производных в большей дозе могло иметь место проявление прооксидантных свойств данных веществ.

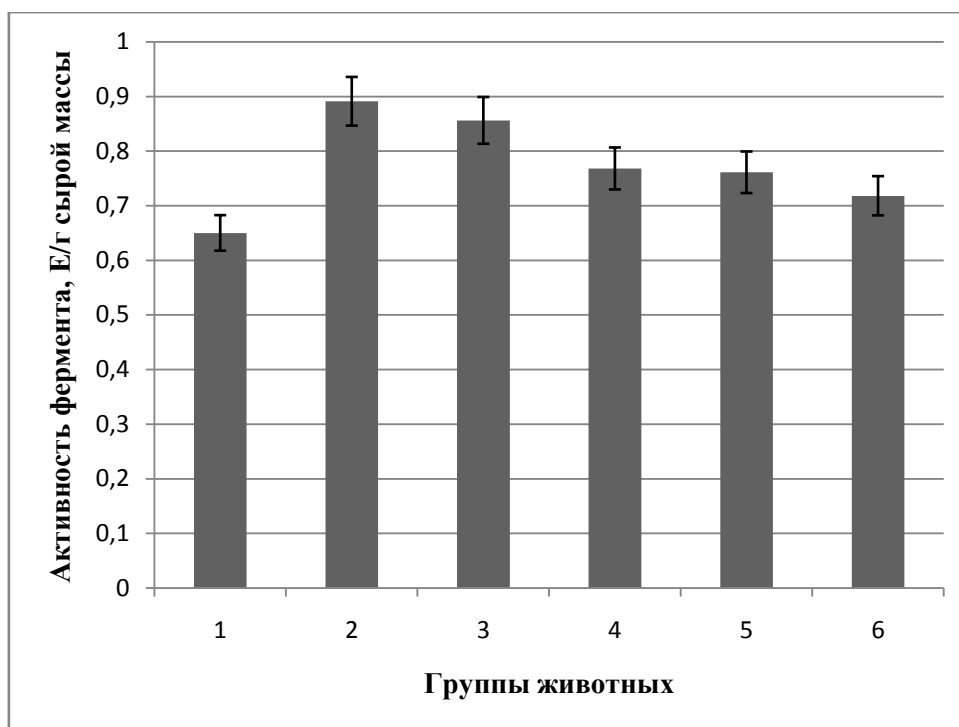
В ходе проведенных экспериментов показано, что на фоне развития кардиоваскулярной патологии при РА происходило увеличение активности каталазы в тканях крыс. Так, активность фермента, выраженная в виде Е на г сырой массы при патологии увеличивалась в сердце в 1,4 раза, в Е на мл сыворотки крови – в 1,7 раза (рис. 28). При этом удельная активность фермента возрастала в сердце и в сыворотке крови в 1,7 раза (рис. 10 приложения).

В некоторых работах отмечалось, что окислительный стресс можно рассматривать как один из ключевых факторов развития РА: постоянная генерация АФК в суставах больных активированными нейтрофилами и макрофагами, а также циклически повторяющиеся процессы гипоксии-реперфузии при работе суставов приводят к повреждению синовиальных

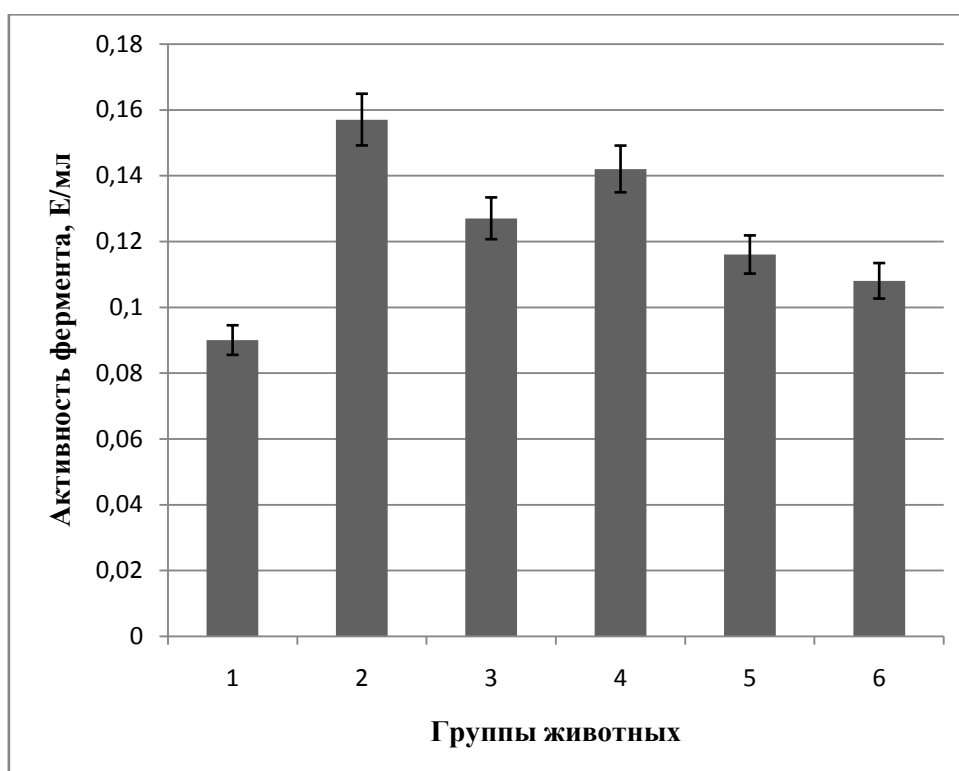
клеток, разрушению хряща и эрозии костной ткани [40, 85, 96]. Таким образом, исходя из имеющихся литературных данных [263, 298, 352], а также полученных нами результатов по оценке параметров БХЛ, уровня ДК, свидетельствующих об интенсификации свободнорадикальных процессов, можно предположить участие СР, образующихся в местах воспаления, в патогенезе кардиоваскулярных нарушений, развивающихся на фоне ревматоидного артрита. В связи с этим, вероятно, увеличение активности каталазы при патологии, является адаптивным механизмом защитной реакции организма на чрезмерное образование АФК в процессе развития окислительного стресса.

Введение протекторов приводило к снижению активности каталазы по сравнению с показателями животных в патологическом состоянии. При введении 3,5-ДКМФБ в дозе 25 мг/кг веса животного не наблюдалось значительных изменений активности фермента в сердце. В сыворотке крови происходило снижение активности каталазы, выраженной в Е на мл, в 1,2 раза (рис. 28). При этом удельная активность фермента уменьшалась в 1,4 раза (рис. 10 приложения). Введение протектора в дозе 50 мг/кг приводило к снижению активности каталазы в сердце и сыворотке крови, выраженной в виде Е на г сырой массы и Е на мл, в 1,2 и 1,1 раза соответственно; удельная активность уменьшалась в 1,3 и 1,2 раза соответственно (рис.10 приложения).

При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного наблюдалось снижение активности каталазы в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,2 раза (рис. 28). При этом удельная активность фермента понижалась в сердце в 1,3 раза (рис. 10 приложения). Введение данного протектора в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к снижению активности фермента в сыворотке крови, выраженной в виде Е на мл, в 1,4 и 1,5 раза соответственно. При расчёте удельной активности фермента в сыворотке крови крыс сохранялись тенденции, характерные для активности, выраженной в Е на мл. При введении протектора в дозах 25 и 50 мг/кг удельная активность каталазы в сыворотке крови снижалась в 1,6 и 1,7 раза.



а



б

Рис. 28. Активность каталазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

Таким образом, по-видимому, снижение активности СОД и каталазы, может являться результатом снижения интенсивности СРП под воздействием исследуемых бигуанидиновых производных, что способствует уменьшению функциональной нагрузки на данные антиоксидантные ферменты.

4.4. Влияние бигуанидиновых производных на активность глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях крыс при кардиоваскулярных нарушениях, развивающихся на фоне ревматоидного артрита

Как было указано выше, ревматоидный артрит может быть отнесен к свободнорадикальным патологиям, сопровождающимся развитием оксидативного стресса [378]. Известно, что глутатионовая АОС выступает в качестве одной из основных линий защиты от чрезмерного образования свободных радикалов на фоне развития патологии, а GSH является важным компонентом антиоксидантной защиты, свойства которого определяются как непосредственным взаимодействием его со свободными радикалами и гидропероксидами, так и участием в качестве субстрата в функционировании нескольких ферментов, осуществляющих детоксикацию АФК и продуктов их взаимодействия с биомолекулами [378]. Реакция восстановления GSSG до GSH катализируется ГР, использующей NADPH как источник восстановительных эквивалентов, окисляя его до $NADP^+$. ГР функционирует вместе с ГП. Именно эти ферменты образуют единую глутатионовую антиоксидантную систему, осуществляющую глутатионовый редокс-цикл [269]. Кроме этого, немаловажная роль в обезвреживании продуктов свободнорадикальных реакций принадлежит и ГТ. Однако, как известно, не всегда внутренних резервов АОС организма достаточно для борьбы с чрезмерным образованием АФК при патологии. В связи с вышесказанным в данной работе было также предпринято исследование активности компонентов глутатионовой системы при введении тестируемых

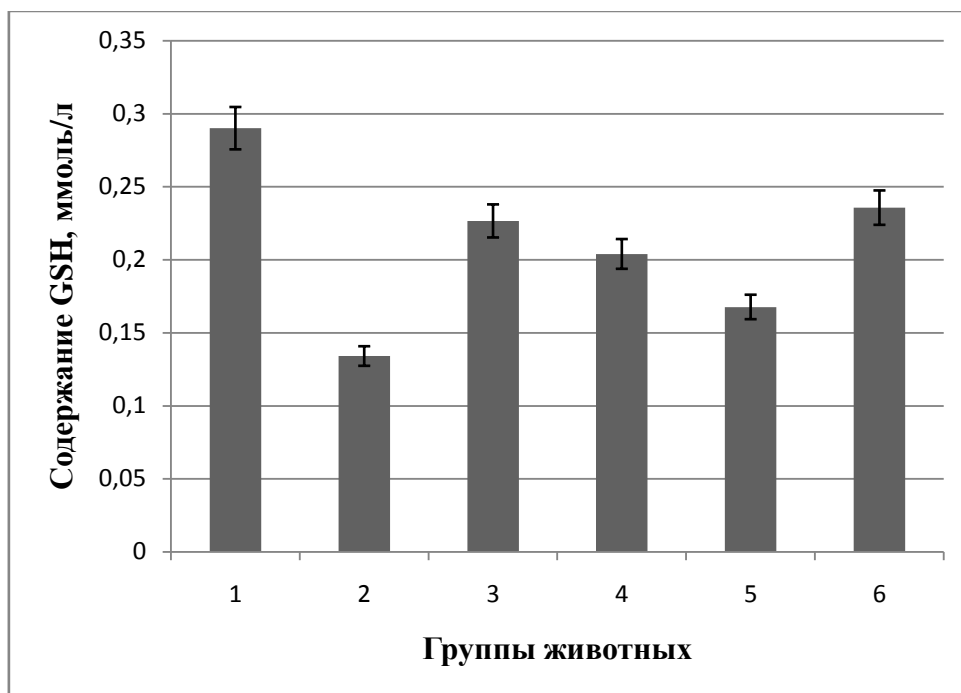
синтетических бигуанидов животным с сердечно-сосудистыми нарушениями, возникающими на фоне развития экспериментального РА.

Результаты проведенных исследований показали, что при развитии сердечно-сосудистых нарушений на фоне ревматоидного артрита у крыс наблюдалось снижение содержания GSH в сердце в 2,2 раза, в сыворотке крови – в 1,2 раза (рис. 29), что согласуется с имеющимися литературными данными [62]. По-видимому, в условиях реализации данной модели патологического состояния, требующей достаточно продолжительного времени, в связи с интенсификацией свободнорадикальных процессов происходило значительное расходование восстановленного глутатиона на обезвреживание образующихся интермедиатов и продуктов СО биомолекул. Значительный вклад в изменение данного параметра мог быть внесен развитием дисбаланса между скоростью образования, восстановления глутатиона и его расходом при усилении генерации АФК [34].

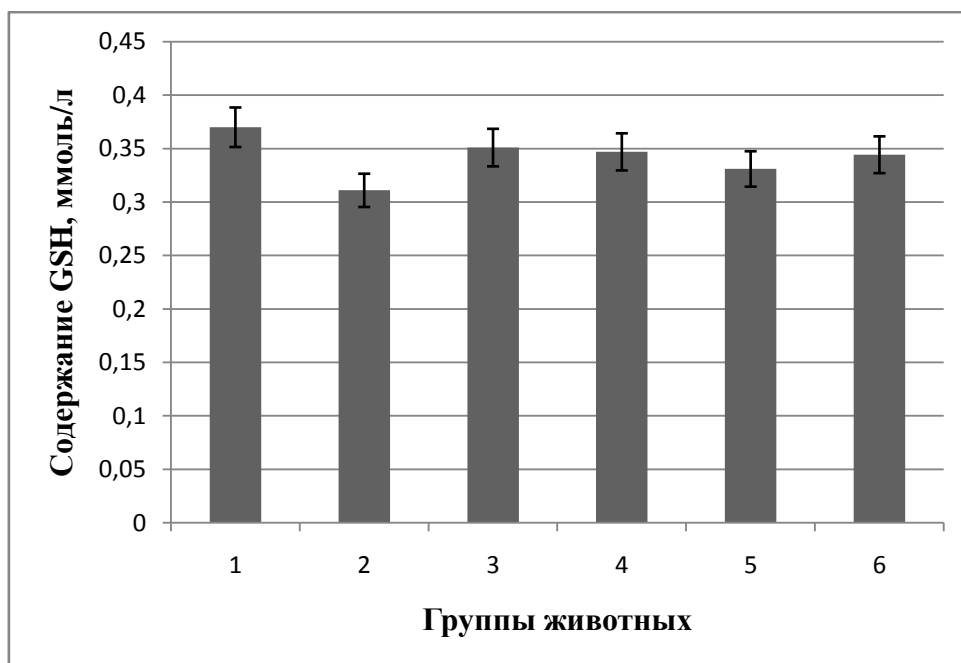
При внутрибрюшинном введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг было выявлено увеличение уровня GSH в сердце в 1,7 и 1,5 раза, в сыворотке крови – в 1,1 раза относительно группы крыс с патологией (рис. 29). Введение 2,4-ДМФБ в тех же дозах приводило к повышению содержания GSH в сердце в 1,3 и 1,8 раза, в сыворотке крови - в 1,1 раза относительно животных 2-й группы (рис. 29). По-видимому, за счет реализации антиоксидантного и кардиопротекторного действия исследуемых бигуанидов происходило уменьшение степени развития оксидативного стресса и, как следствие снижение расхода восстановленной формы глутатиона при сердечно-сосудистых нарушениях, возникающих на фоне развития РА.

На фоне развития сердечно-сосудистых нарушений при экспериментальном РА выявлено увеличение активности ГП в сердце и сыворотке крови, выраженной в виде Е на г сырой массы и Е на мл, в 1,5 и 1,2 раза соответственно (рис. 30). При этом удельная активность фермента возрастала в сердце в 1,8 раза, а в сыворотке крови – в 1,5 раза

соответственно относительно контрольных значений (рис. 11 приложения) [62].



а



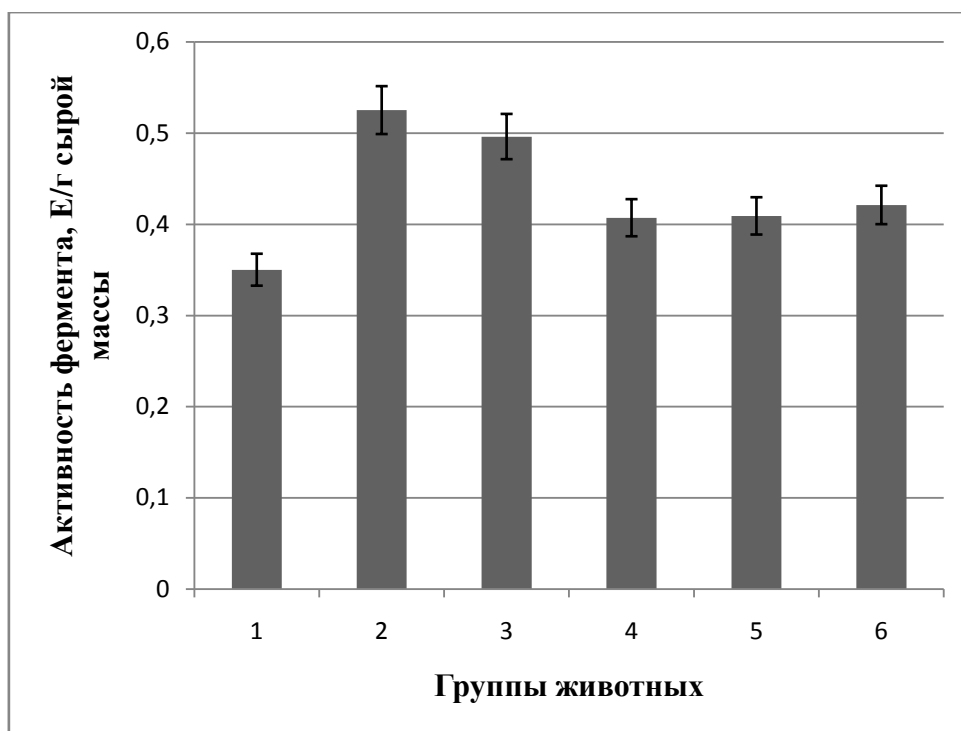
б

Рис. 29. Содержание восстановленного глутатиона в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

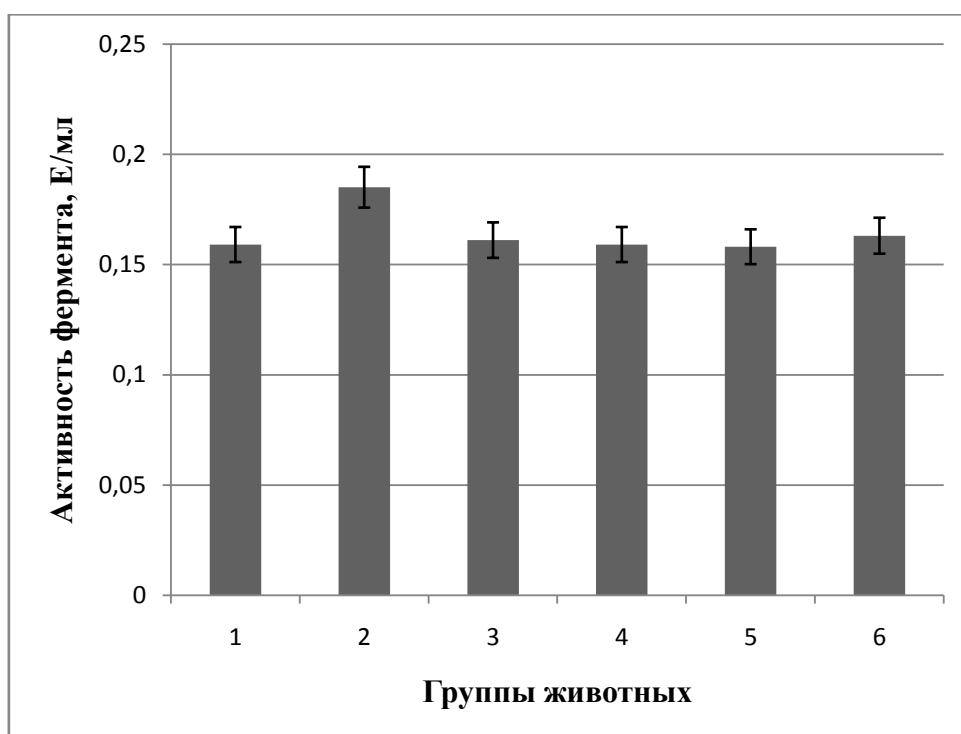
При ревматоидном артрите у крыс активность ГР, выраженная как в виде Е на г сырой массы сердца, так и в виде Е на мл сыворотки крови, увеличивалась в 1,2 раза (рис. 31). При этом удельная активность ГР в сердце и сыворотке крови возрастала в 1,6 и 1,9 раза соответственно, по сравнению с контролем (рис. 12 приложения) [62].

При ревматоидном артрите уменьшение уровня восстановленного глутатиона не могло быть уравновешено даже повышением активности ГР, имеющим место в данных условиях. Данные по снижению содержания GSH и повышению активности ГР по сравнению с нормой были также получены другими авторами при исследовании сыворотки крови больных ревматоидным артритом [34]. Возрастание активности ГР, катализирующей восстановление глутатиона за счет использования NADPH, может иметь важное адаптивное значение для формирования клеточного ответа на развитие оксидативного стресса, поскольку в этих условиях возрастает также активность ГП, непосредственно участвующей в обезвреживании метаболитов и продуктов реакций СО при участии GSH.

В то же время для активности ГТ – еще одного фермента, использующего восстановленный глутатион для обезвреживания экзо- и эндогенных токсикантов, при развитии кардиоваскулярной патологии на фоне РА у крыс было выявлено снижение относительно контроля. Так, на фоне развития кардиоваскулярных нарушений при ЭРА выявлено уменьшение активности фермента в сердце и сыворотке крови, выраженной в виде Е на г сырой массы и Е на мл, в 1,4 и 2,1 раза соответственно (рис. 32). При этом удельная активность ГТ снижалась в сердце в 1,3 раза, а в сыворотке крови – в 1,7 раза соответственно относительно контрольных значений (рис. 13 приложения) [62]. Полученные данные соотносятся со снижением активности ГТ при развитии окислительного стресса у пациентов с остеоартритом коленного сустава [254].



а



б

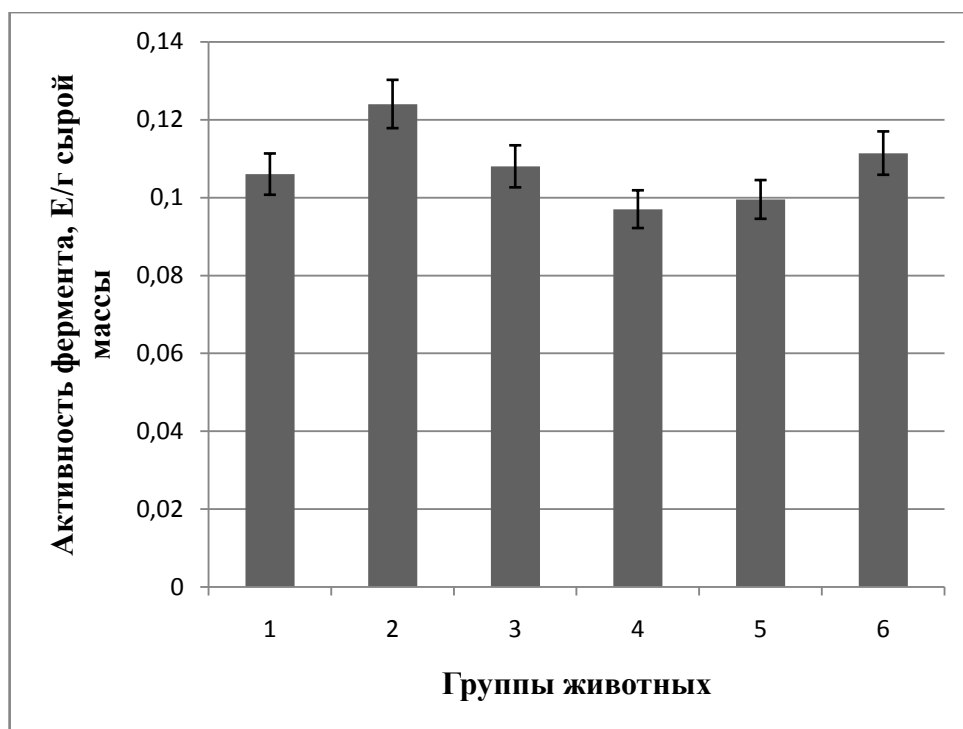
Рис. 30. Активность глутатионпероксидазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

При введении 3,5-ДКМФБ во всех исследуемых дозах было отмечено снижение активности ГП по сравнению со значениями при патологии. Так, в условиях действия данного бигуанида в дозах 25 и 50 мг/кг в сердце было выявлено уменьшение активности ГП, выраженной в виде Е на г сырой массы, в 1,1 и 1,3 раза (рис. 30), по сравнению с животными 2-й группы. При этом удельная активность ГП в сердце снижалась в 1,3 и 1,5 раза (рис. 11 приложения). Для активности ГП в сыворотке крови, выраженной в виде Е на мл, в этих условиях было выявлено уменьшение в 1,2 раза (рис. 30), по сравнению со значениями при патологии. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг удельная активность ГП в сыворотке крови снижалась в 1,4 и 1,5 раза (рис. 11 приложения). Таким образом, в случае введения 3,5-ДКМФБ отмечалось повышение степени проявления протекторного эффекта при возрастании дозы соединения.

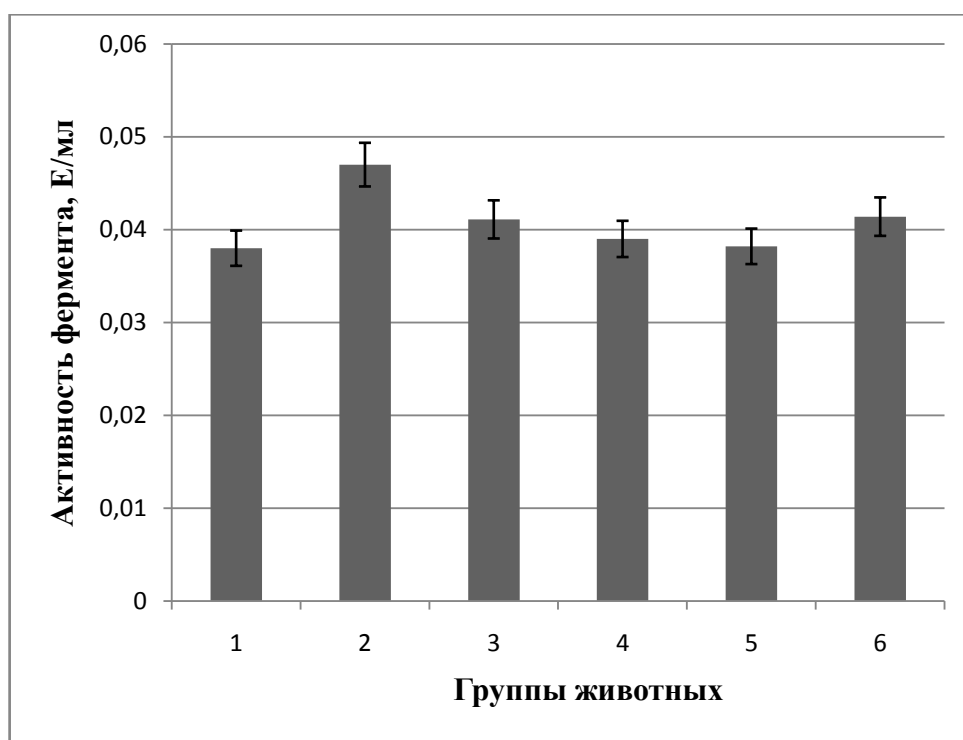
При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг активность ГП, выраженная в Е на г сырой массы, снижалась в сердце в 1,3 раза (рис. 30), относительно крыс с патологией. При этом было выявлено снижение удельной активности ГП в сердце в 1,4 раза (рис. 11 приложения), по сравнению с животными 2-й группы. При этом в сыворотке крови активность ГП, выраженная в виде Е на мл, уменьшалась в 1,2 раза (рис. 30). Удельная активность ГП в сыворотке крови в этих условиях снижалась в 1,5 и 1,4 раза (рис. 11 приложения), относительно данных при патологии.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что применение производных бигуанида способствует снижению интенсивности процессов ПОЛ, вследствие чего уменьшается активность ГП, основным субстратом которой являются липопероксиды.

Возможно, используемые протекторы способствуют ослаблению нагрузки на глутатионовую АОС на фоне развития окислительного стресса при кардиоваскулярных нарушениях, на фоне развития ревматоидного артрита, за счет проявления антиоксидантных свойств.



а



б

Рис. 31. Активность глутатионредуктазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

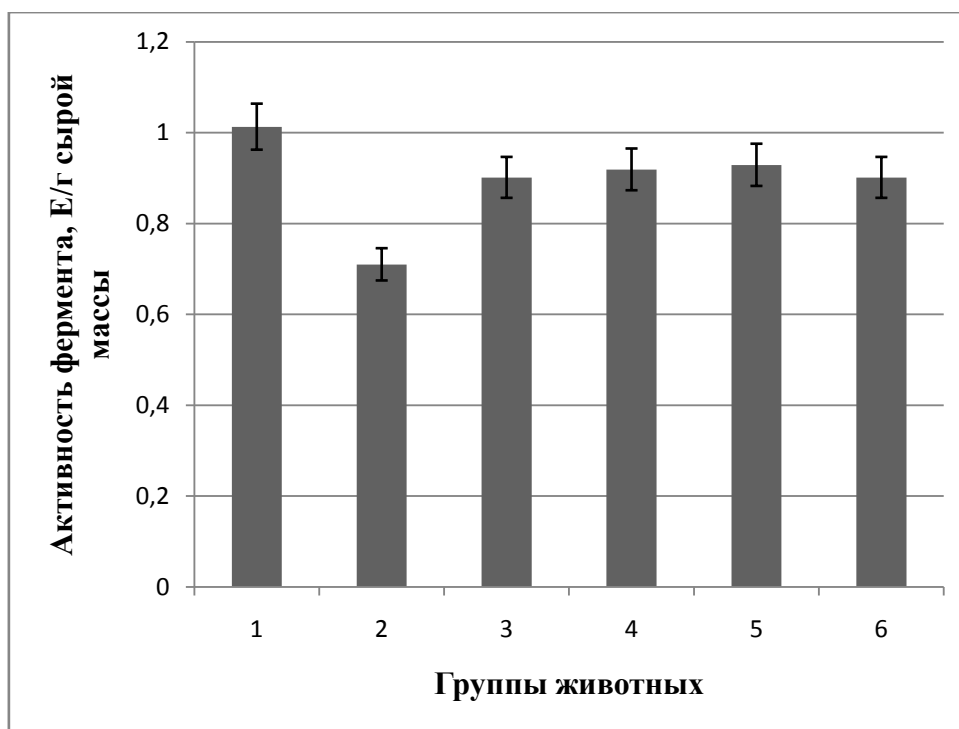
При введении 3,5-ДКМФБ во всех исследуемых дозах было отмечено снижение активности ГР по сравнению со значениями при патологии. Так, в условиях действия данного бигуанида в дозах 25 и 50 мг/кг в сердце было выявлено уменьшение активности ГР, выраженной в виде Е на г сырой массы, в 1,2 и 1,3 раза (рис. 31), по сравнению с животными 2-й группы. При этом удельная активность ГР в сердце снижалась в 1,6 и 1,7 раза (рис. 12 приложения). Для активности ГР в сыворотке крови, выраженной в виде Е на мл, в этих условиях было выявлено уменьшение в 1,1 и 1,2 раза соответственно (рис. 31), по сравнению со значениями при патологии. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг удельная активность ГР в сыворотке крови снижалась в 1,5 и 1,6 раза (рис. 12 приложения). Таким образом, в случае введения 3,5-ДКМФБ отмечалось повышение степени проявления протекторного эффекта при возрастании дозы соединения.

При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг активность ГР, выраженная в Е на г сырой массы, снижалась в сердце в 1,3 и 1,1 раза (рис. 31), относительно крыс с патологией. При этом было выявлено снижение удельной активности ГР в сердце в 1,7 и 1,5 раза соответственно (рис. 12 приложения), по сравнению с животными 2-й группы. При этом в сыворотке крови активность ГР, выраженная в виде Е на мл, уменьшалась в 1,1 раза (рис. 31). Удельная активность ГР в сыворотке крови в этих условиях снижалась в 1,9 и 1,5 раза (рис. 12 приложения), относительно данных при патологии. Таким образом, при сравнении влияния 2,4-ДМФБ в различных дозах на активность ГР в большинстве случаев было обнаружено более выраженное действие данного бигуанида в дозе 25 мг/кг. Как известно, некоторые соединения способны оказывать как анти-, так и прооксидантный эффект, причем результат зависит от дозы воздействующего вещества. По-видимому, в случае введения 2,4-ДМФБ имеет место подобное действие на свободнорадикальный гомеостаз организма, когда с повышением дозы отмечается снижение степени проявления протекторного эффекта.

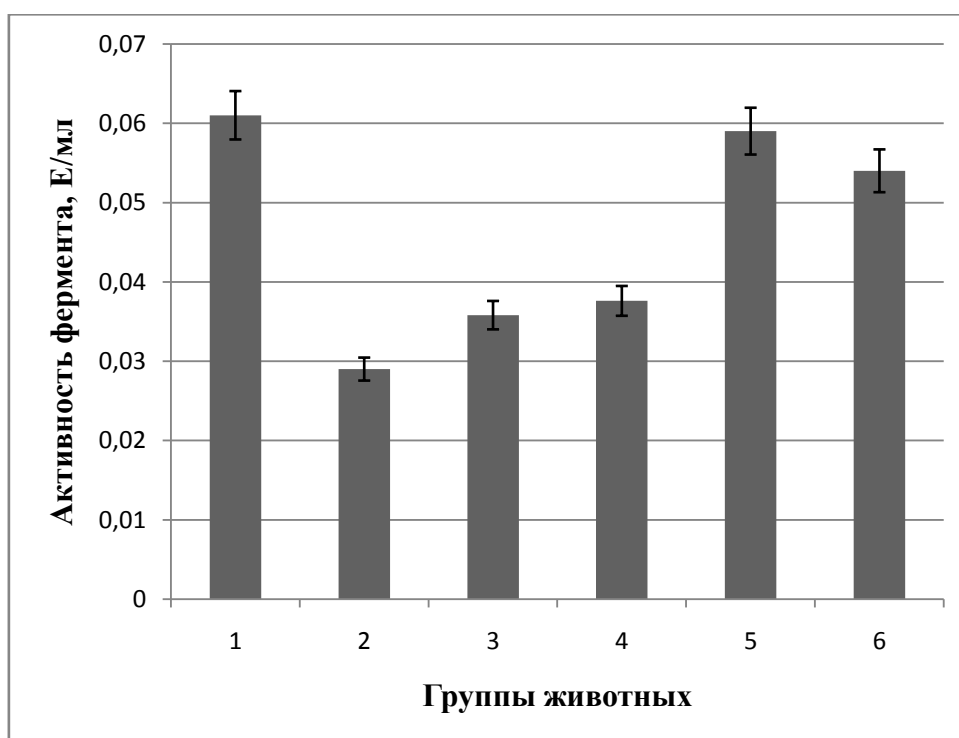
При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг, было отмечено увеличение активности ГТ, выраженной как в виде Е на г сырой массы, так и в виде Е на мг белка, в сердце в 1,3 раза (рис. 32, рис. 13 приложения). В то же время наблюдалось возрастание активности данного фермента в сыворотке крови, выраженного в виде Е на мл, в 1,2 и 1,3 раза, удельной активности – в 1,1 раза по сравнению со значениями при КН на фоне развития экспериментального РА.

При действии 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг в сердце было выявлено возрастание активности ГТ, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,3 раза (рис. 32), удельной активности – в 1,2 раза относительно патологии (рис. 13 приложения). Введение 2,4-ДМФБ в тех же дозах сопровождалось увеличением активности ГТ в сыворотке крови, выраженной в виде Е на мл, в 2,0 и 1,9 раза (рис. 32), удельной активности – в 1,5 и 1,4 раза (рис. 13 приложения).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что использование гетероциклических производных гуанидина приводит к уменьшению активности ГП, действие которой направлено на обезвреживание гидроперекисей липидов, относительно значений при патологии. При снижении потребности в GSH уменьшалась и активность ГР. При этом для активности ГТ, уменьшающейся при патологии, в условиях введения тестируемых соединений было характерно возрастание. По всей видимости, бигуаниды могут способствовать снижению степени дисбаланса в функционировании глутатионовой АОС при кардиоваскулярных нарушениях, возникающих на фоне развития ревматоидного артрита, за счет проявления антиоксидантных и кардиопротекторных свойств.



а



б

Рис. 32. Активность глутатионтрансферазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

4.5. Влияние 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида и 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность некоторых NADPH-продуцирующих ферментов в тканях крыс при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся при ревматоидном артрите

Поставку восстановленных эквивалентов в форме NADPH для функционирования ГП и ГР осуществляют ферменты ПФП, в частности Г6ФДГ. Альтернативным источником NADPH служит реакция, катализируемая цитоплазматической NADP-ИДГ [71].

Активность Г6ФДГ в сердце и сыворотке крови крыс с сердечно-сосудистыми нарушениями, возникающими на фоне развития ревматоидного артрита, выраженная в Е на грамм сырой массы и в Е на мл, увеличивалась в 1,3 и 2,7 раза соответственно (рис. 33). При этом удельная активность Г6ФДГ возрастала в сердце в 1,6 раза, а в сыворотке крови – в 3,0 раза (рис. 14 приложения) [63].

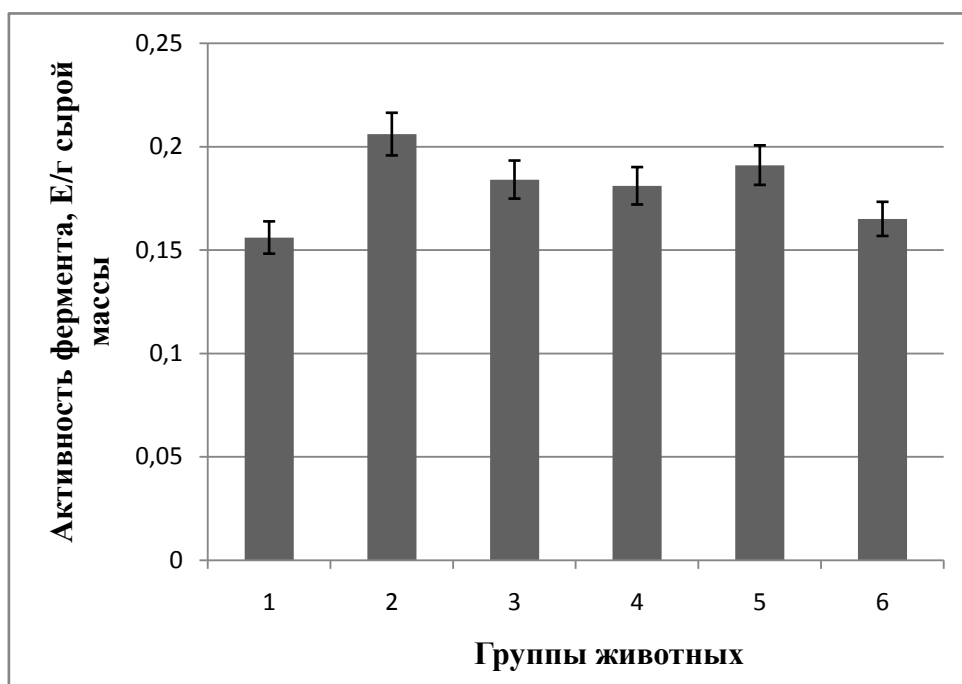
Развитие сердечно-сосудистой патологии при ревматоидном артрите приводит к снижению активности NADP-ИДГ в сердце, выраженной в Е на г сырой массы, в 1,7 раза, удельной активности - в 1,5 раза (рис. 34, рис. 15 приложения). В тоже время, в сыворотке крови происходило возрастание ферментативной активности, выраженной в Е на мл, в 1,8 раза по сравнению с контролем. При этом удельная активность NADP-ИДГ в сыворотке крови увеличивалась в 2,4 раза [62, 63].

Известно, что жирные кислоты являются основным биоэнергетическим субстратом в сердце млекопитающих. Кроме того отмечается, что свободные жирные кислоты могут ингибировать окисление глюкозы в миокарде [354, 379]. Нельзя исключить, что данная особенность метаболизма в сердечной мышце может являться дополнительным фактором, способствующим высокой скорости протекания ПОЛ в миокарде. В ходе этого накапливается один из продуктов данного процесса – 4-гидрокси-2-ноненаль, взаимодействующий с другими биомолекулами [209, 325].

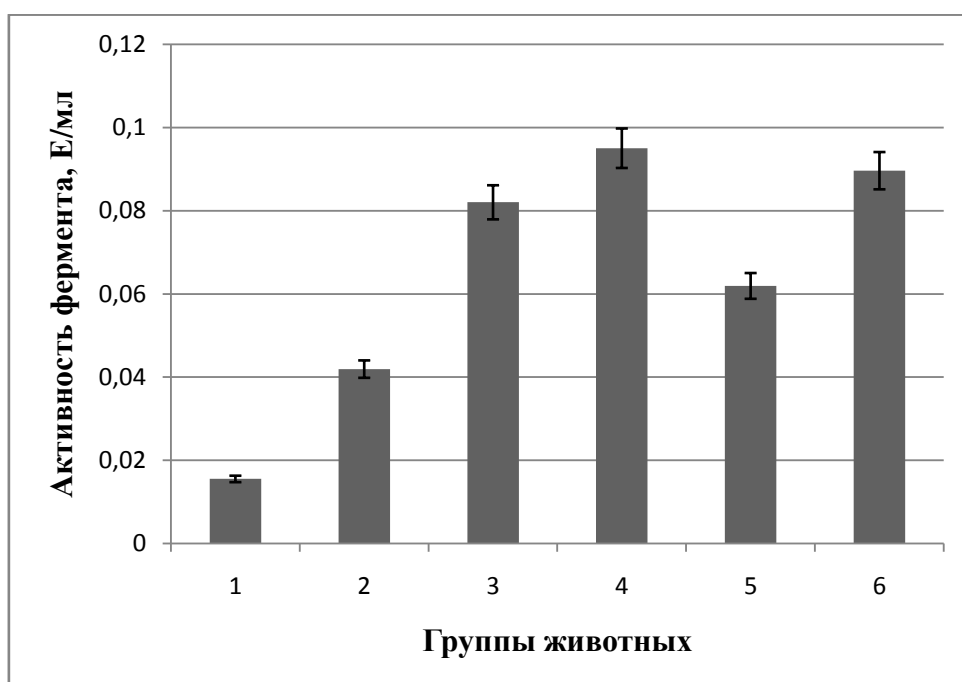
Накопление данного продукта ПОЛ и его аддуктов может приводить к модификации молекул ферментов, в том числе и NADP-ИДГ. Возможно, что это может являться причиной снижения активности исследуемого фермента в сердце [170, 325].

Таким образом, при кардиоваскулярных нарушениях, возникающих на фоне развития ревматоидного артрита, в сердце наблюдалась большая функциональная нагрузка на фермент пентозофосфатного пути как поставщика NADPH для работы ГП/ГР-системы. Кроме того, отмечено разнонаправленное изменение активности NADP-ИДГ в сердце и сыворотке крови крыс, что, вероятно, связано с особенностями энергетического метаболизма в миокарде и ингибированием активности данного фермента продуктами ПОЛ.

При действии 3,5-ДКМФБ наблюдалось снижение активности Г6ФДГ в сердце крыс и возрастание ферментативной активности в сыворотке крови животных с патологией. Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного активность Г6ФДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, понижалась на 13%, по сравнению с животными с патологией (рис. 33). При этом удельная активность фермента уменьшалась в сердце на 21% (рис. 14 приложения). В сыворотке крови крыс наблюдалась противоположная тенденция. Так, при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного активность Г6ФДГ в сыворотке крови, выраженная в Е на мл, увеличивалась в 2,0 и 2,2 раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы (рис. 33). При этом удельная активность фермента повышалась в сыворотке крови в 3,2 и 3,3 раза соответственно (рис. 14 приложения).



а



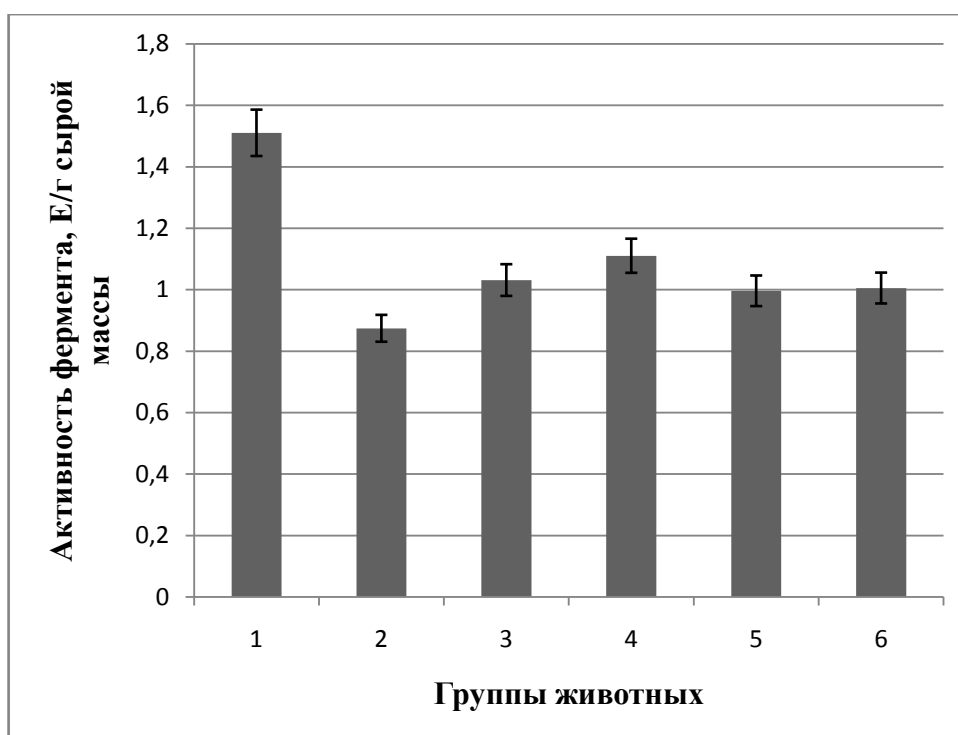
б

Рис. 33. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

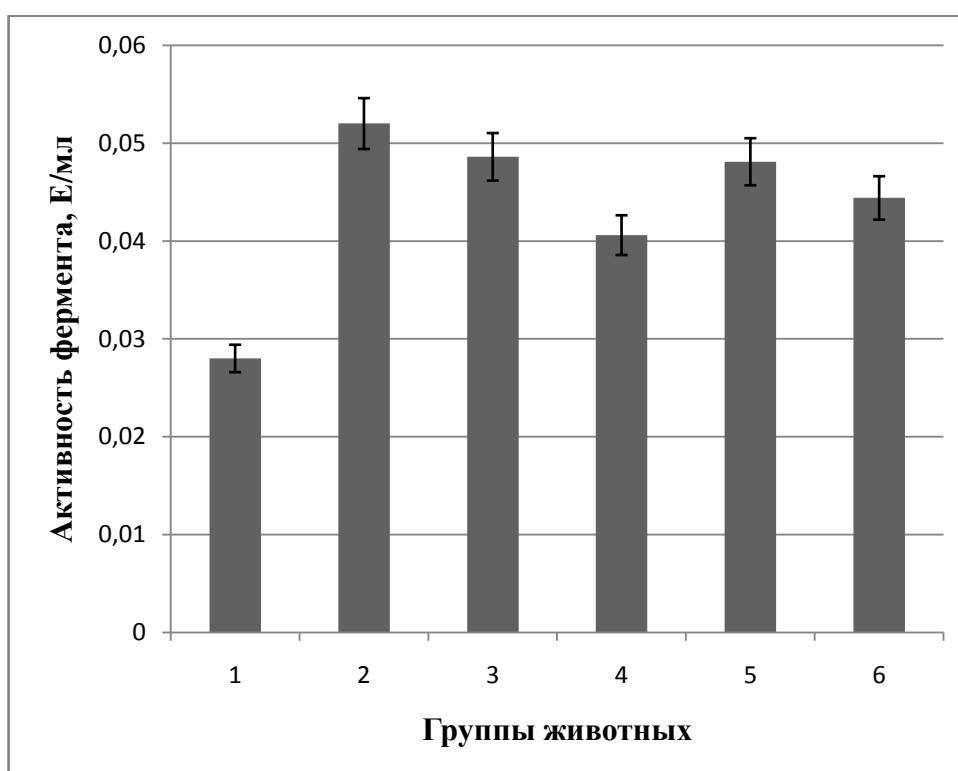
При действии 2,4-ДМФБ наблюдалось снижение активности Г6ФДГ в сердце крыс с патологией (рис. 33). В сердце крыс наибольший эффект был выявлен при внутривенном введении 2,4-ДМФБ в дозе 50 мг/кг массы тела животного. При этом активность Г6ФДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, снижалась в 1,3 раза, практически достигая показателей нормы. В данном случае удельная активность Г6ФДГ уменьшалась в сердце в 1,4 раза (рис. 14 приложения). При введении 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг/кг активность Г6ФДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, снижалась в 1,1 раза. При этом удельная активность Г6ФДГ в сердце уменьшалась в 1,3 раза.

В то же время введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к дальнейшему росту активности Г6ФДГ в сыворотке крови, выраженной в Е на мл, в 1,5 и 2,1 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 33). При этом удельная активность Г6ФДГ в сыворотке крови также увеличивалась в 1,9 и 4,0 раза соответственно (рис. 14 приложения).

Приведенные данные согласуются с результатами, полученными в ходе оценки влияния 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на активность Г6ФДГ при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина. По-видимому, в данном случае также может иметь место специфическая активация эритроцитарной формы фермента под действием бигуанидиновых производных [347].



а



б

Рис. 34. Активность NADP-изоцитратдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного активность NADP-ИДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, увеличивалась в 1,2 и 1,3 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 34). Введение исследуемого бигуанидинового производного в используемых дозах приводило к снижению активности NADP-ИДГ, выраженной в виде Е на мл сыворотки, в 1,1 и 1,3 раза соответственно (рис. 34). Те же тенденции прослеживались и при расчете удельной активности фермента. При введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела животного удельная активность фермента увеличивалась в сердце в 1,4 и 1,5 раза соответственно (рис. 15 приложения). Введение 3,5-ДКМФБ в данных дозах сопровождалось снижением удельной активности NADP-ИДГ в сыворотке крови в 1,3 и 1,6 раза соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 15 приложения).

При действии 2,4-ДМФБ наблюдалась сходная динамика изменения активности NADP-ИДГ в сердце и в сыворотке крови животных с сердечно-сосудистыми нарушениями, что и при введении 3,5-ДКМФБ. Так, при введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного происходило увеличение активности NADP-ИДГ в сердце крыс и уменьшение активности фермента в сыворотке крови, по сравнению с животными 2-й группы. При введении 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного активность NADP-ИДГ в сердце, выраженная в Е на грамм сырой массы, возрастала в 1,1 и 1,2 раза (рис. 34). При этом удельная активность фермента увеличивалась в сердце в 1,2 и 1,3 раза соответственно, по сравнению со значениями в патологическом состоянии (рис. 15 приложения). Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг веса животного сопровождалось снижением активности NADP-ИДГ, представленной в виде Е на мл сыворотки, на 8% и 17% соответственно (рис. 34). При этом удельная активность NADP-ИДГ уменьшалась в сыворотке крови на 28% и 37% соответственно, по сравнению с животными с патологией (рис. 15 приложения).

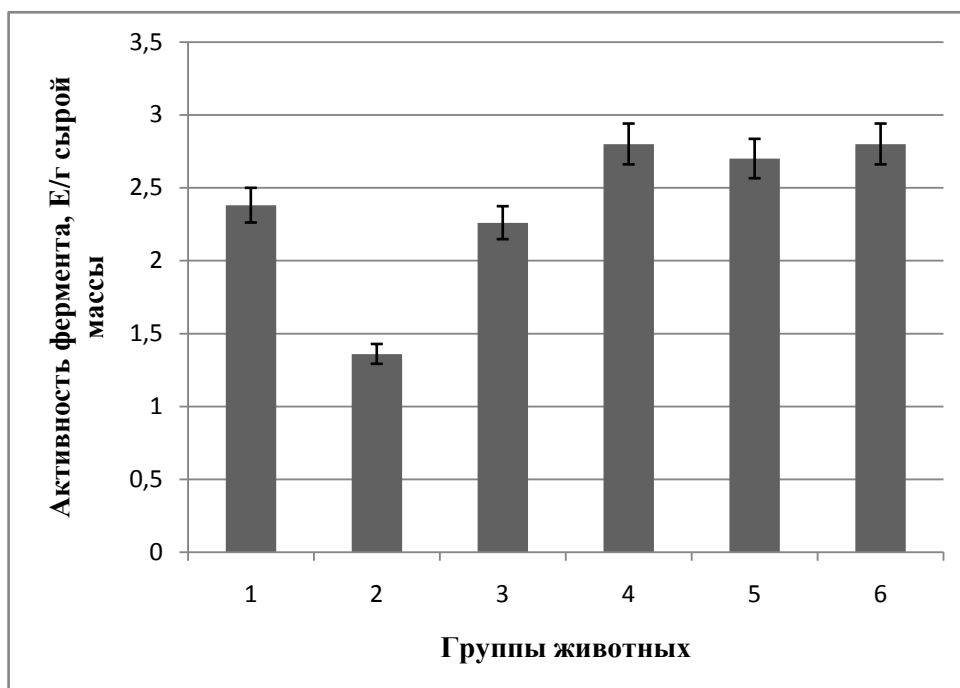
Изменение активности NADP-ИДГ в сторону контрольных значений, возможно, связано с уменьшением интенсивности СО при введении исследуемых протекторов.

4.6. Влияние протекторов на активность аконитазы и содержание цитрата в сердце и сыворотке крови крыс при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне ревматоидного артрита

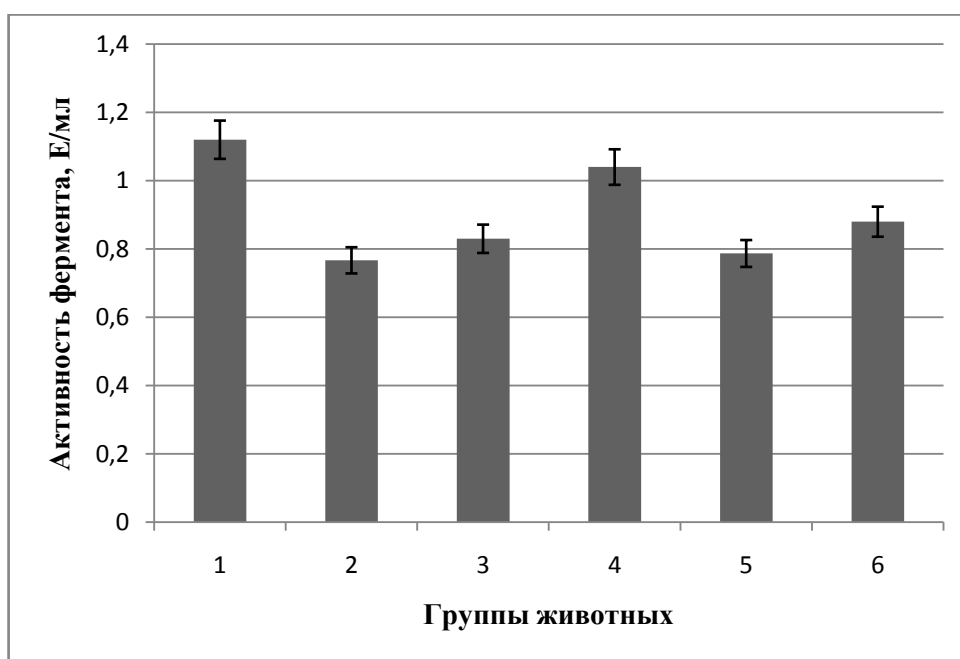
Согласно современным представлениям АГ рассматривается в качестве чувствительной и критической мишени действия активных форм кислорода в условиях окислительного стресса. Ранее было показано, что развитие РА сопровождалось снижением активности АГ и накоплением цитрата в ряде тканей крыс [60, 61]. По-видимому, причиной подавления активности фермента является разрушающее влияние АФК на его активный центр, содержащий железо-серный кластер – чувствительную мишень действия свободных радикалов [214, 288]. Увеличение содержания цитрата при этом происходило, вероятно, вследствие угнетения активности АГ, которая является основным ферментом, участвующим в метаболизме лимонной кислоты.

Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в исследуемых дозах приводило к возрастанию активности АГ по сравнению с животными с патологией (рис. 35). Наибольший эффект был выявлен при введении исследуемых бигуанидов в дозе 50 мг на кг веса животного. Так, при введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в указанной дозе наблюдалось увеличение активности АГ, выраженной в Е на г сырой массы и в Е на мл, в сердце - в 2,1 раза, в сыворотке крови - в 1,4 и 1,2 раза соответственно. При расчете удельной активности были выявлены сходные тенденции. Так, удельная активность фермента при введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в дозе 50 мг на кг веса животного возрастала в сердце в 1,7 и 1,8 раза, в сыворотке крови в 1,5 и 1,3

раза соответственно, по сравнению с животными 2-й группы (рис. 16 приложения).



а



б

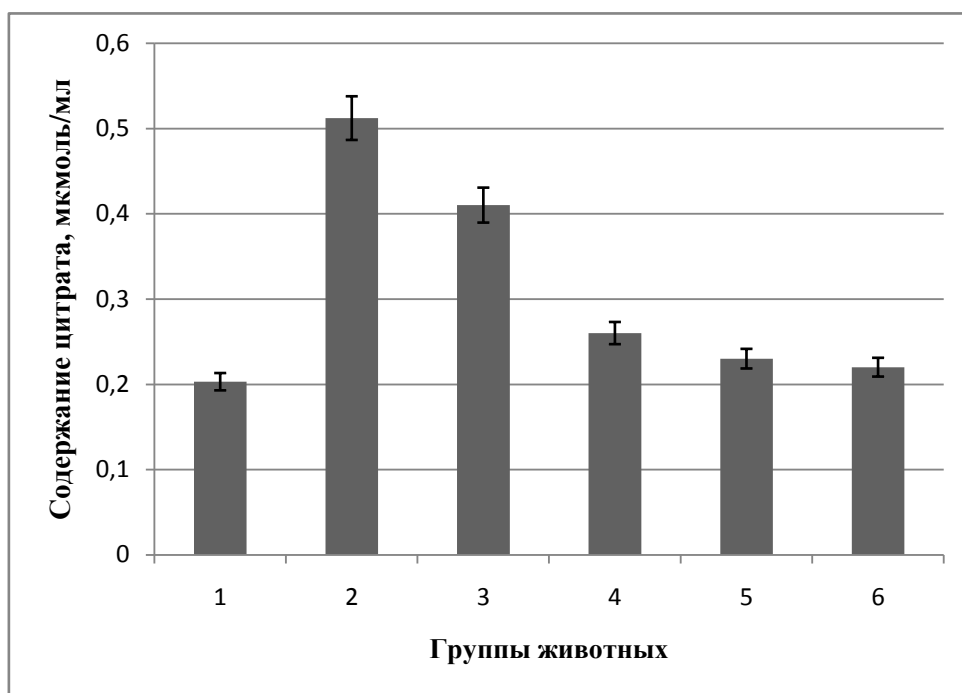
Рис. 35. Активность аконитатгидратазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

Возрастание активности фермента при введении исследуемых бигуанидов на фоне развития патологии, вероятно, обусловлено уменьшением степени повреждения молекулы АГ свободными радикалами и реконструкцией железо-серного кластера данного фермента в условиях реализации их протекторных свойств. Помимо этого, активация АГ при введении синтетических производных бигуанида может быть обусловлена активацией путей утилизации глюкозы под действием гуанидиновых производных, в том числе цикла трикарбоновых кислот, гликолиза [180, 248].

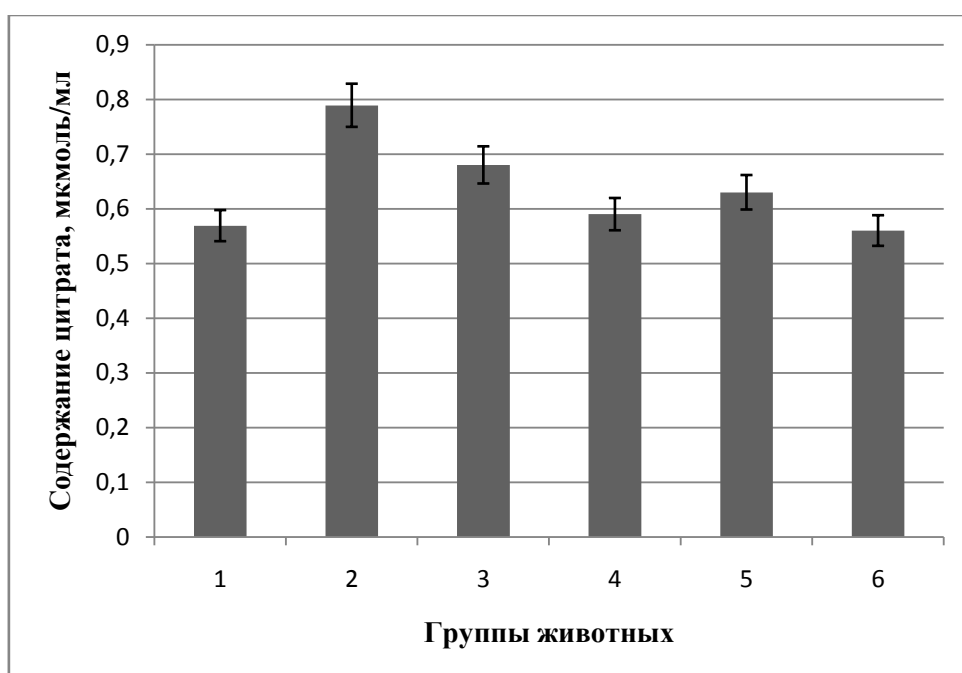
Накопление цитрата в ткани сердца и сыворотке крови животных с патологией может иметь адаптивное значение благодаря хелаторным свойствам аниона лимонной кислоты по отношению к ионам двухвалентного железа – катализаторам цепных свободнорадикальных процессов.

При введении исследуемых бигуанидов наряду с возрастанием активности АГ наблюдалось дозозависимое снижение содержания цитрата в ткани сердца и сыворотке крови животных с РА. Введение 3,5-ДКМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к снижению уровня цитрата в сердце в 1,3 и 2,0 раза соответственно, в сыворотке – в 1,2 и 1,3 соответственно. Введение 2,4-ДМФБ в дозах 25 и 50 мг/кг сопровождалось уменьшением концентрации цитрата в сердечной мышце в 2,2 и 2,3 раза соответственно, в сыворотке – в 1,3 и 1,4 соответственно (рис. 36).

Таким образом, развитие кардиоваскулярных нарушений, возникающих на фоне РА, у животных сопровождалось уменьшением активности АГ, что, по-видимому, было связано с чрезмерной генерацией АФК и интенсификацией СО при развитии патологии. Повышение содержания цитрата, по-видимому, происходило вследствие угнетения активности АГ – основного фермента, участвующего в его метаболизме. Введение синтетических производных бигуанида приводило к изменению исследуемых параметров в сторону нормы, что, по-видимому, могло быть связано с наличием у данных веществ протекторных свойств.



а



б

Рис. 36. Содержание цитрата в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кардиоваскулярные патологии, индуцированные введением адреналина и развитием РА, характеризуются усилением генерации АФК и интенсификацией СРП. При этом наблюдаются структурно-функциональные повреждения биомембран, нуклеиновых кислот и белков, то есть важнейших компонентов клетки, что впоследствии может приводить к ее гибели [70]. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о возможности коррекции нарушений метаболических процессов при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развивающейся на фоне РА, с помощью введения производных бигуанида.

В ходе работы, с помощью компьютерной программы PASS был проведен скрининг базы данных по структурам и были отобраны соединения: производные бигуанида – 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, с предполагаемой антиоксидантной и кардиопротекторной активностью, которые в дальнейшем были протестированы на экспериментальных животных.

Введение исследуемых бигуанидов крысам с кардиоваскулярными нарушениями, индуцируемыми введением адреналина и развитием РА, приводило к снижению уровня активности КК-МВ и АсАТ, увеличивающимися при патологии. Можно предположить несколько механизмов, которые лежат в основе кардиопротекторного влияния бигуанидов – это эффекты улучшения микроциркуляции и снижения скорости развития атеросклероза и тромбообразования, свойственные, например, метформину [10], а также влияние на антиоксидантный статус организма.

При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на фоне кардиоваскулярной патологии при РА происходило снижение маркерных показателей развития РА (РФ, СОЭ, толщины щиколотки лапок крыс), возрастающих при данном патологическом состоянии. Полученные данные согласуются с литературными сведениями, что в нормализации СОЭ при РА большую роль

могут играть биологические агенты, способствующие снижению активности данного заболевания. Так, установлено, что при действии препаратов адалимубаб и метатрекс при ремиссии РА у половины пациентов наблюдались улучшения биохимических и клинических показателей, в том числе нормализация СОЭ [329].

Введение животным исследуемых бигуанидов на фоне развития кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА, приводило к существенному снижению критериев, отражающих уровень СРП. В частности, имело место уменьшение параметров БХЛ – S и I_{\max} ; снижение концентрации ДК в сердце и сыворотке крови крыс. Следует отметить, что при воздействии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на фоне развития кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, уменьшался также уровень карбонильных групп модифицированных белков. При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ менялась картина фрагментации ДНК: характерные апоптозные лестницы становились менее выраженными. При воздействии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ снижался такой параметр БХЛ, как $\text{tg}\alpha_2$, отражающий общую антиоксидантную активность, что, очевидно, было сопряжено со снижением степени мобилизации АОС организма при замедлении темпов СРП.

Установлено, что при введении бигуанидиновых производных имело место изменение активности СОД и каталазы в сердце и сыворотке крови крыс, увеличивающейся на фоне кардиоваскулярной патологии, индуцируемой введением адреналина и развивающейся при РА, в сторону контрольных значений, что может свидетельствовать о реализации антиоксидантного эффекта исследуемых соединений, снижающего нагрузку на данные ферменты АОС. Воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ приводило к изменению активности ГП, ГТ и содержания GSH в направлении показателей нормы, относительно значений при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина, что, подтверждает позитивное влияние используемых протекторов, способствующее

ослаблению нагрузки на глутатионовую АОС на фоне развития окислительного стресса при данном патологическом процессе. При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ наблюдалось повышение активности ГР по сравнению с ее уровнем при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина, что, вероятно, обусловлено метаболическими изменениями, происходящими в сердечной мышце в условиях совместного действия адреналина и синтетических производных бигуанида. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, приводило к изменению активности ГП, ГР, ГТ и концентрации GSH в сердце и сыворотке крови крыс в сторону контрольных значений, по сравнению с их уровнем при патологии. При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в сердце крыс наблюдалось снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, увеличивающейся при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА. В сыворотке крови животных с сердечно-сосудистой патологией, индуцированной введением адреналина и развивающейся на фоне РА, наблюдалось возрастание активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы под действием данных протекторов, что может быть связано со специфической активацией эритроцитарной формы фермента под действием бигуанидиновых производных [347]. Воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ способствовало изменению активности NADP-ИДГ в направлении контрольных значений как в сердце, так и в сыворотке крови экспериментальных животных, относительно значений при патологии. При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ наблюдалось увеличение активности АГ в тканях крыс, снижающейся при сердечно-сосудистых нарушениях, индуцированных введением адреналина и развитием РА, что, вероятно, обусловлено уменьшением степени повреждения железо-серного кластера фермента в условиях реализации антиоксидантных свойств исследуемых веществ. Это сопровождалось снижением содержания цитрата, что также может

свидетельствовать об уменьшении уровня окислительного стресса в условиях действия исследуемых бигуанидов.

Действие исследуемых производных бигуанидов носило дозозависимый характер. Так, наибольший протекторный эффект наблюдался при введении 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг. В то же время воздействие 2,4-ДМФБ было наиболее выражено при введении данного вещества в дозе 25 мг/кг. Возможно, в большей дозе 2,4-ДМФБ оказывал токсический или прооксидантный эффект, как это свойственно некоторым веществам-антиоксидантам [188, 261, 319, 327]. Введение данных веществ в указанных дозах сопровождалось наибольшими изменениями исследуемых параметров в направлении нормы. По-видимому, это сопряжено со способностью используемых соединений выступать в качестве антиоксидантов и участвовать в регуляции свободнорадикального гомеостаза при ОС, обусловленного сердечно-сосудистой патологией. Протекторный эффект действия производных бигуанида был более выражен в сердце крыс. В сыворотке крови антиоксидантный эффект данных протекторов был выражен в меньшей степени.

На основании проведенных исследований предложена гипотетическая схема, отражающая участие производных бигуанидов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина и развивающейся на фоне ЭРА. Согласно данной схеме, представленной на рис. 37, воздействие адреналина и адьюванта Фрейнда инициирует индукцию свободнорадикальных процессов, что сопровождается нарушением структурно-функциональных свойств биомембран, повреждением белков, а также других клеточных биомолекул, что в итоге приводит к нарушению метаболизма в целом и гибели клетки. Ряд литературных данных подтверждает значительную роль чрезмерной генерации АФК в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, приводящих к деструкции, как плазмолеммы, так и субклеточных мембран миоцитов, что усугубляет течение патологического процесса [134].

Полученные данные по изменению активности маркерных ферментов развития патологического состояния, параметров БХЛ, содержания ДК, уровня карбонильных групп белков, степени фрагментации ДНК свидетельствуют о кардиопротекторном и антиоксидантном действии 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ на фоне развития сердечно-сосудистой патологии. В основе протекторного действия может лежать хелатирование ионов Fe^{2+} , за счет наличия фенольного кольца в составе данных производных бигуанидов, что, по-видимому, также может способствовать уменьшению интенсивности протекания реакций Фентона и процессов ПОЛ в клеточных компартментах. В соответствии с нашими данными 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ, проявляя свои антиоксидантные свойства, обеспечивают ослабление нагрузки на важнейшее ферментативное звено АОЗ – СОД и каталазу. Воздействие синтетических производных бигуанида на фоне кардиоваскулярной патологии сопровождалось изменением активности ряда ферментов глутатионовой антиоксидантной системы, НАДФН-генерирующих ферментов и уровня глутатиона в сторону контрольных значений. В сыворотке крови животных с сердечно-сосудистой патологией наблюдалось возрастание активности Г6ФДГ под действием данных протекторов, что может быть связано со специфической активацией эритроцитарной формы фермента под действием бигуанидиновых производных. В условиях введения исследуемых веществ отмечено возрастание АГ, существенно снижающейся при патологии, и изменение концентрации цитрата в сторону контроля.

Резюмируя вышесказанное, можно сделать вывод о возможности коррекции нарушений метаболических процессов при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА, с помощью введения 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ. Полученные результаты исследования являются обоснованием антиоксидантного и кардиопротекторного действия 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ в определенных дозах при сердечно-сосудистой патологии, что представляет значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции метаболических

сдвигов при данном патологическом состоянии. Данные, полученные в ходе работы, могут быть применены при разработке антиоксидантных и кардиопротекторных препаратов на основе 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ для профилактики и лечения сердечно-сосудистых нарушений.

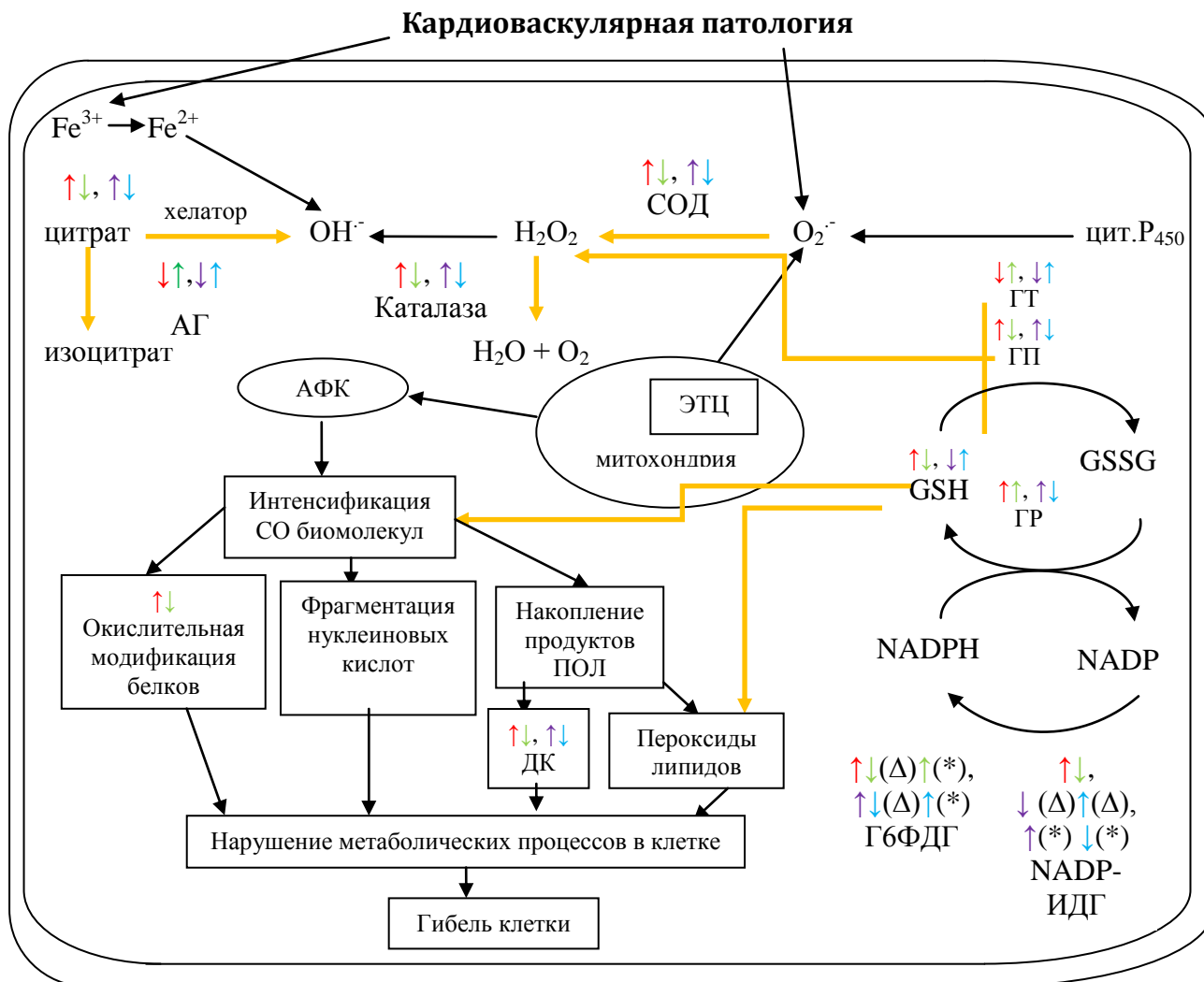


Рис. 37. Гипотетическая схема участия производных бигуанидов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развивающейся на фоне экспериментального ревматоидного артрита

Условные обозначения: \uparrow, \downarrow - увеличение и снижение значений при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина; \uparrow, \downarrow - увеличение и снижение значений при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА; \uparrow, \downarrow - увеличение и снижение значений при введении бигуанидов на фоне кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина; \uparrow, \downarrow - увеличение и снижение значений при введении бигуанидов на фоне кардиоваскулярной патологии, развивающейся при РА; (Δ) - сердце экспериментальных животных; (*) - сыворотка крови экспериментальных животных; \leftarrow - антиоксидантный эффект.

ВЫВОДЫ

1. Введение 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида (3,5-ДКМФБ) и 2,4-диметоксифенилбигуанида (2,4-ДМФБ) приводило к снижению активностей креатинкиназы-МВ и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови крыс, увеличивающихся при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развивающейся при ревматоидном артрите (РА), что отражает уменьшение степени цитолиза кардиомиоцитов и свидетельствует о наличии кардиопротекторных свойств у данных производных бигуанидов. Воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ приводило к изменению маркерных показателей развития РА, возрастающих при патологии, в направлении нормы.

2. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ при кардиоваскулярной патологии сопровождалось снижением уровня свободнорадикальных процессов, подтверждаемым уменьшением концентрации диеновых конъюгатов, содержания карбонильных групп и параметров БХЛ – S и I_{max}, в тканях экспериментальных животных, что свидетельствует о возможности проявления данными протекторами антиоксидантных свойств, направленных на подавление чрезмерного образования АФК при патологии сердечной мышцы.

3. Введение названных протекторов способствует уменьшению фрагментации ДНК, отражающей степень развития процессов апоптоза.

4. При введении бигуанидиновых производных экспериментальным животным было выявлено изменение активности СОД и каталазы в сторону контрольных значений, что может свидетельствовать о реализации антиоксидантного эффекта исследуемых соединений, снижающего нагрузку на данные ферменты антиоксидантной системы.

5. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ приводило к изменению активности глутатионпероксидазы, глутатионтрансферазы и содержания GSH в направлении показателей нормы, относительно значений при

кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина. При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ наблюдалось повышение активности глутатионредуктазы по сравнению с ее уровнем в данном патологическом состоянии.

6. Воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА, приводило к изменению активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы и содержания восстановленного глутатиона в сторону контрольных значений, по сравнению с их уровнем при патологии.

7. При введении 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ наблюдалось снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в ткани сердца крыс по сравнению с уровнем при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА. В сыворотке крови животных наблюдалось возрастание активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы под действием данных протекторов, что может быть связано со специфической активацией эритроцитарной формы фермента под действием бигуанидиновых производных.

8. Введение 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ способствовало изменению активности NADP-изоцитратдегидрогеназы в сторону контрольных значений как в сердце, так и в сыворотке крови экспериментальных животных, относительно значений при патологии.

9. Воздействие 3,5-ДКМФБ и 2,4-ДМФБ сопровождалось изменением активности аконитатгидратазы и содержания цитрата в ткани миокарда и сыворотке крови крыс в направлении нормы.

10. Наибольший протекторный эффект наблюдался при введении 3,5-ДКМФБ в дозе 50 мг/кг и 2,4-ДМФБ в дозе 25 мг на кг веса животного, что приводило к наиболее значительному изменению большинства исследуемых параметров в направлении нормы. Протекторный эффект производных бигуанида был выражен в большей степени в сердце крыс.

11. На основании проведенных исследований предложена гипотетическая схема участия производных бигуанидов в регуляции свободнорадикального гомеостаза организма при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина и развитием РА.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Активированные кислородные метаболиты в монооксидазных реакциях / В.В. Ляхович [и др.] // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 118, № 4. – С. 7-12.
2. Амосова Е.Н. Метаболическая терапия повреждений миокарда, обусловленного ишемией: Новый подход к лечению ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности / Е.Н. Амосова // Украинский кардиологический журнал. – 2000. – № 4. – С. 86 – 92.
3. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньшикова [и др.] // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, № 4. – С. 442 – 453.
4. Артериальная гипертония и системный воспалительный процесс: современное состояние вопроса / Н.П. Шилкина [и др.] // Тер. арх. – 2008. - № 5. - С. 91 – 96.
5. Артериальная гипертония у больных с системными заболеваниями соединительной ткани и геморрагическим васкулитом / Н.П. Шилкина [и др.] // Тер. арх. – 2010. - № 5. – С. 40 – 45.
6. Аруин Л.И. Апоптоз и патология печени / Л.И. Аруин // Росс. журн. гастроэнтер., гепатол., колопроктол. – 1998. – Т. 8, № 2. – С. 6 – 10.
7. Арутюнян А.В. Механизмы свободнорадикального окисления и его роль в старении / А.В. Арутюнян, Л. С. Козина // Успехи геронтол. – 2009. – Т. 22, № 1. – С. 104–116.
8. Афанасьев В.Г. К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра / В.Г. Афанасьев, В.С. Зайцев, Т.И. Вольфсон // Лаб. дело. – 1973. – № 4. – С. 115-116.
9. Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит / Р.М. Балабанова // Ревматические болезни (руководство по внутренним болезням) / Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. - М.: Медицина, 1997. - С. 257 – 295.

10. Балаболкин М.И. Бигуаниды: антигипергликемическое и вазопротективное действия / М. И. Балаболкин, В. М. Креминская, Е. М. Клебанова // Справочник поликлинического врача. Эндокринология. – 2005. – Т. 3, № 1. – (<http://consilium-medicum.com/magazines/polik/handbook/article/9777>).
11. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых отложений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 29 – 34.
12. Бобров В.О. Адаптаційні ішемічні та реперфузійні синдроми у хворих ішемічною хворобою серця: механізми, діагностика, обґрунтування терапії / В.О. Бобров, С.К. Кулішов. – Полтава: Дивосвіт, 2004. – 240 с.
13. Брусков В.И. Образование активных форм кислорода под действием тепла при восстановлении растворённого кислорода воздуха / В.И. Брусков, Ж.К. Масолимов, А.В. Черников // Доклады Академии Наук. – 2001. – Т. 381, № 2. – С. 262 – 264.
14. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты у животных / В.С. Бузлама. – СПб. : Норинт, 1997. – 41 с.
15. Букин В. Биохимия витаминов / В. Букин. – М.: Наука, 1982. – 323 с.
16. Вартамян Л.С. Образование супероксидных радикалов в мембранах субклеточных органелл регенерирующей печени / Л.С. Вартамян // Биохимия. – 1992. – Т. 57, № 5. – С. 671 – 675.
17. Васильева В.О. Роль активных форм кислорода в повреждении / В.О. Васильева, В.М. Коробов, М.М. Великий // Украинский биохимический журнал. – 1996. – Т. 68. – С. 45 – 55.
18. Васюк Ю.А. Цитокиновая модель патогенеза хронической сердечной недостаточности и возможности нового терапевтического подхода в лечении декомпенсированных больных / Ю.А. Васюк, О.П. Дударенко, Е.Н. Ющук // Рац. Фарм.в кардиологии. – 2006. - № 4. – С. 63 — 70.

19. Вершинин В.И. Аналитическая химия / В.И. Вершинин, И.В. Власова, И.А. Никифорова. – М.: Академия, 2011. – 444 с.
20. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
21. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран / Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 1987.–Т. 32, № 5. – С. 830 – 844.
22. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13-19.
23. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестник Российской Академии Медицинских Наук.– 1998.– № 7. – С. 43–51.
24. Влияние ксеногенных неонатальных кардиомиоцитов на индукцию белков теплового шока при катехоламиновом повреждении миокарда в эксперименте / А.А. Рунович [и др.] // Росс. акад. естествознания. – (http://www.rae.ru/snt/pdf/2004/03/Runovich_2.pdf).
25. Влияние мексикора на окислительный стресс при остром инфаркте миокарда / А.П. Голиков [и др.] // Кардиология. – 2005. – № 7. – С. 21 – 26.
26. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз / Н.К. Зенсков [и др.] // Усп. совр. биол. – 1999. – № 5. – С. 440.
27. Воскресенский О.Н. Биоантиоксиданты – облигатные факторы питания / О.Н. Воскресенский, М.С. Бобырев // Вопросы мед. химии. – 1992. – Т. 38, № 4. – С. 21 – 26.
28. Выделение и изучение влияния циклоартановых гликозидов циклоорбикозида g и циклосиверсиозида a на метаболические процессы в миокарде крыс / А. В. Царук [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. - № 1. – С.13 – 18.

29. Гомзикова Ю.А. Состояние свободнорадикальных процессов у больных гипертрофической кардиомиопатией / Ю.А. Гомзикова // Рос. кардиол. журнал. – 1997. – № 5. – С. 12.
30. Гуанидиновые производные. Конформация, способность к комплексообразованию, исследование в качестве обратимых ингибиторов холинэстераз разного происхождения / Е.В. Розенгарт [и др.] // Журн. эвол. биохим. физиол. – 2003. – Т. 39. – С. 315 – 322.
31. Гуляева Л.Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе / Л.Ф. Гуляева, В.А. Вавилин, В.В. Ляхович. – Новосибирск.: Наука, 2000. – 84с.
32. Гунько И.Н. Роль процессов свободнорадикального окисления в развитии эндотелиальной дисфункции и гемореологических нарушений у больных с острым коронарным синдромом / И.Н. Гунько // Украинский медицинский обзор. – 2002. – Т. 31, № 5. – С. 138 – 141.
33. Гуревич С.М. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo* / С.М. Гуревич // ДАН Москов. общество испыт. природы. – М., 1992. – С. 104 – 106.
34. Дмитриев В.А. Сравнительная характеристика фармакокинетики, клинической эффективности и безопасности генерических препаратов диклофенака и ибупрофена: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. мед. наук: 14.00.25 / Дмитриев Виктор Александрович; «Клин. фарм.» ГУ Науч. центр биомед. технол. РАМН. – Москва, 2008. – 21 с.
35. Дмитриев В.А. С-реактивный белок и артериальная гипертония: существует ли связь / В.А. Дмитриев, Е.В. Ощепкова, В.Н. Титов // Тер. арх. – 2006. - № 5. – С. 86 – 89.
36. Дубинина Е.Е. Антиоксидантная система плазмы крови / Е. Е. Дубинина // Укр. биохим. Журн. – 1992. – Т. 64, № 2. – С. 3 – 15.
37. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение).

- Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е. Е. Дубинина. – СПб.: Мед. пресса, 2006. – 400 с.
38. Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П.Евстигнеева, И.М.Волкова, В.В.Чудинова // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 119 – 137.
 39. Журавлев А.И. Биохемиллюминесценция / А.И. Журавлев. – М.: Наука, 1983. – 298 с.
 40. Зборовская И.А. Патогенетическое и клинико-диагностическое значение показателей антиоксидантной системы и содержания продуктов перекисного окисления липидов у больных ревматическими болезнями / И.А. Зборовская, М.В. Баникова // Клин. ревматол. – 1994. – № 4. – С. 13 – 16.
 41. Иванов А.Ю. Сравнительная эффективность антиоксидантов при защите бактериальной плазматической мембраны от активных форм кислорода / А.Ю. Иванов, В.И. Новосёлов, А.В. Гаврюшкин // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 660 – 665.
 42. Изменение состояния свободнорадикальных процессов в мозге и крови крыс в условиях инфаркта миокарда / О.Н. Кошелева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 4. – С. 65.
 43. Интернет-система прогноза спектра биологической активности химических соединений / А.В. Садым [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, № 10. – С. 21 – 26.
 44. Исследование антиоксидантных свойств цитопротекторного препарата триметазида / В.З. Ланкин [и др.] // Кардиология. – 2001. – Т. 41, № 3. – С. 21 – 28.
 45. Каган В. Е. Об участии свободных активных форм кислорода в ферментативном перекисном окислении липидов в биомембранах / В.Е. Каган, Л.Л. Прилипко, В.М. Саввов // Биофизика. – 1979. – Т. 44, № 3. – С. 482 – 489.

46. Калинина Е.В. Участие тио-, перокси- и глутаредоксинов в клеточных редокс-зависимых процессах / Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, А.Н. Саприн // Успехи биол. Химии. – 2005. - № 48. - С. 319-331.
47. Кальвиньш И.Я. Милдронат – механизм действия и перспективы его применения / И.Я. Кальвиньш. – Рига: ПАО "Гриндекс", 2002. – 39 с.
48. Капралов А.А. Роль витамина Е в процессах функционирования клетки. Антиоксидантные и неантиоксидантные механизмы / А.А. Капралов, Г.В. Донченко, Г.В. Петрова // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 6. – С. 573 – 589.
49. Карташева Н.В. Влияние нейроадаптивного модулятора «СКЭНАР» на обменные процессы в крови больных с острым инфарктом миокарда : автореф. дис. канд. мед. наук / Н.В. Карташева. – Ростов-на-Дону, 2007. – 19 с.
50. Карташева Н.В. Сравнительный анализ различных методов лечения острого инфаркта миокарда с их влиянием на выраженность оксидативного стресса / Карташева Н.В., Тараканов А.В., Милютин Н.П. // Нейрофармакология и биологическая фармакология. - 2007. - специальный выпуск. - С. 1721 – 1722.
51. Кахновер Н.Б. Глутатионовая антиоксидантная система в миокарде и эритроцитах крыс при острых гипоксических поражениях сердца / Н.Б. Кахновер, Н.В. Хмелевский // Украинский биохимический журнал. – 1980. – Т. 52, № 5. – С. 643 – 646.
52. Кения М.В. Роль низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе / М.В. Кения, А.И. Лукаш, Е.П. Гуськов // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 4. – С. 456 – 469.
53. Керимов Б.Ф. Глутатиондефицитное состояние нервной ткани голодавших животных интенсифицирует пероксидное окисление липидов и окисление белковых SH групп / Б.Ф. Керимов // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 108–113.

54. Кириченко А.А. Хроническая застойная сердечная недостаточность у больных после инфаркта миокарда/ А.А. Кириченко// РМЖ – 1998. – Т. 6, № 14. – С. 74.
55. Клебанов Г.И. Антиоксидантная активность сыворотки крови/ Г.И. Клебанов, О.Б. Любицкий// Вестник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 2 – 10.
56. Клиническая ревматология (руководство для врачей) / (ред.) чл.-корр. РАМН проф. В. И. Мазуров. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: ООО "Издательство ФОЛИАНТ", 2005. — 520 с.
57. Кожевников Ю.Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии / Ю.Н. Кожевников // Вопросы мед. хим. – 1985. – № 5. – С. 2 – 7.
58. Кондратьева Л.В. Бигуаниды в лечении сахарного диабета 2 типа. Современный взгляд на проблему/ Л.В. Кондратьева // Российский медицинский журнал. Эндокринология. - 2005. - Т. 13, № 6. - С. 305.
59. Корков А.С. Частная патофизиология клинических форм патологии коронарного кровообращения / А.С. Корков. – (<http://korkrov.ru/>).
60. Крыльский Е.Д. Активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите / Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова, Е.М. Кирилова // Актуальные проблемы современной науки. Актуальные вопросы науки: материалы 10-й международной научно-практической конференции. - Москва, 2013. - С. 15 - 17.
61. Крыльский Е.Д. Активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите и действии тиоктовой кислоты / Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова, Е.М. Кирилова // Интермедикал. – 2014. - № 4. - С. 102 - 105.
62. Крыльский Е.Д. Активность глутатионовой антиоксидантной системы и NADPH-генерирующих ферментов при экспериментальном ревматоидном артрите у крыс / Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова, Е.М.

- Кирилова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 7. – С. 30 – 34.
63. Крыльский Е.Д. Активность некоторых НАДФН-генерирующих ферментов при экспериментальном ревматоидном артрите / Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова // Векторы развития современной науки. Материалы международной научно-практической конференции. - Уфа, 2014. - С. 28 - 31.
64. Крыльский Е.Д. Содержание диеновых конъюгатов в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите / Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова, Е.М. Кирилова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: материалы 5-й международной научно-методической конференции "Фармообразование-2013". - Воронеж, 2013. - С. 356 - 359.
65. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 1. – С. 2-7.
66. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современ. Биологии. – 1990. –Т. 110, № 1. – С. 20-33.
67. Кулинский В.И. Система глутатиона. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомед. химия. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 255–277.
68. Кухтина Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глущенко // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 6. – С. 993 – 997.
69. Ланкин В.З. Моделирование каскада ферментативных реакций в липосомах, включающих свободнорадикальное окисление, восстановление и гидролиз полиеновых ацилов фосфолипидов для исследования влияния этих процессов на структурно-динамические

- параметры мембраны / В.З. Ланкин, А.К. Тихадзе, Ю.Г. Осис // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 5. – С. 679 – 689.
70. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков // Кардиология. – 2000. – Т. 40, № 7. – С. 48 – 61.
71. Ленинджер А. Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клетки / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1999. – 422 с.
72. Лишневская В.Ю. Метаболическая терапия в кардиологии: современные подходы к выбору препаратов / В.Ю. Лишневская, М.С. Папуга, В.А. Ельникова // Практическая ангиология. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 279 – 283.
73. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. – М.: Финансы и статистика, 1990. – 564 с.
74. Луговская С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская, В.В. Долгов. – Тверь: Триада, 2006. – 158 с.
75. Луцк В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий / В.И. Луцк // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 592 – 609.
76. Максименко А.В. Модифицированные препараты супероксиддисмутазы и каталазы для защиты сердечно-сосудистой системы и легких / А.В. Максименко // Успехи современной биологии. – 1993. – Т. 113, вып. 3. – С. 351-363.
77. Матюшин Б.Н. Активные формы кислорода: цитотоксическое действие и методические подходы к лабораторному контролю при поражении печени / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов // Клин. лабор. диагност. – 1996. – № 4. – С. 51 – 53.
78. Матюшин Б.Н., Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении / Б.Н. Матюшин, А.С.Логинов, В.Д. Ткачев // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16-19.

79. Маянский Д.Н. Активация макрофагов / Д.Н. Маянский, Д.Д. Цырендоржиев // Успехи современной биологии. – 1990. – Т. 109. – № 3 – С. 352-369.
80. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньщикова, Н. К. Зенков // Успехи современной биологии. – 1997. – Т. 117. – С. 155–171.
81. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др] // Лаб.дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
82. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. – 1992. – Т. 8, № 6. – С. 3-9.
83. Митохондрии как источники активных форм кислорода при окислительном стрессе / Д.С. Изюмов [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 2. – С. 149 – 158.
84. Мкртумян А.М. Метформин – единственный бигуанид с широким спектром действий, рекомендованный IDF как препарат первого ряда выбора / А.М. Мкртумян, Е.В. Бирюкова // РМЖ. – 2006. – № 27. – (http://www.rmj.ru/articles_4354.htm).
85. Мульдьяров П.Я. Состояние свободнорадикального окисления у больных ревматоидным артритом с анемией / П.Я. Мульдьяров, Ф.Ю. Талыбов, В.И. Николаев // Тер. Арх. – 1993. – № 5. – С. 19 – 22.
86. Мясоедов Е.Б. Структурно-функциональные особенности миокарда левого желудочка и эндотелиальная дисфункция при ревматоидном артрите в зависимости от наличия артериальной гипертензии / Е.Б. Мясоедов, С.Е. Мясоедова, С.В. Обжерина // Науч-практич. ревматол. – 2007. - № 3. – С. 15 – 20.
87. Нарушения содержания альдостерона и инсулина при ишемическом повреждении миокарда в эксперименте / А.Р. Антонов [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2009. - № 9. – С. 180 – 181.

88. Насонов Е.Л. Проблема атеротромбоза в ревматологии / Е.Л. Насонов // Вестник РАМН. – 2003. - № 7. – С. 6 — 10.
89. Неверов И.В. Место антиоксидантов в комплексной терапии пожилых больных ИБС / И.В. Неверов // Русский Медицинский Журнал. – 2001. – Т. 9, № 18. – С. 767 – 769.
90. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии / В.В. Вапиров [и др.]. - Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. – 68 с.
91. Никитина Н.М. Артериальная гипертензия у больных ревматоидным артритом / Н.М. Никитина, А.П. Ребров // Рационал. фармакотер. в кардиол. – 2009. - № 3. – С. 66 – 70.
92. Новикова Д.С. Артериальная гипертензия при ревматоидном артрите / Д.С. Новикова, Т.В. Попкова, Е.Л. Насонов // Научно-практическая ревматология. – 2011. - № 3. – С. 52 – 68.
93. Новикова Д.С. Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний при ревматоидном артрите. / Д.С. Новикова, Т.В. Попкова, Е.Л. Насонов // Тер. арх. – 2009. - № 5. – С. 88 – 96.
94. Новикова Д.С. Современные представления о патогенезе и особенности лечения артериальной гипертензии при ревматоидном артрите / Д.С. Новикова, Т.В. Попкова, Е.Л. Насонов // Тер. арх. – 2011. - № 5. – С. 24 – 32.
95. Норман Г.Э. Активные формы кислорода и люстра Чижевского / Г.Э. Норман // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 1. – С. 123 – 126.
96. Одинаев Ф.И. Некоторые патогенетические аспекты ревматоидного артрита / Ф.И. Одинаев, З.И. Сухонова, З.Е. Краснокутская // Сборник трудов ТНИИПМ. – 2000. – С. 150 – 152.
97. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24 – 26.

98. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 1. – С. 74-78.
99. Осипов А.Н. Активные формы кислорода и их роль в организме / А.Н. Осипов, О.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // Успехи биологической химии. – 1990. – Т. 31, № 2. – С. 180 – 208.
100. Патологическая физиология: Учебник для студентов мед. Вузов / Н.Н. Зайко [и др.]. - К.: Логос, 1996. – 647 с.
101. Патофизиологические аспекты формирования «оглушенного миокарда» при метаболическом инфаркте миокарда / А.Р. Антонов [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2009. - № 9. – С. 181 – 182.
102. Перекисное окисление липидов и а-токоферол у больных диффузным токсическим зобом / Р.С. Тишенина [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 26 – 28.
103. Пероксидное окисление липидов и стресс / В.А. Барабой [и др.]. – СПб. : Наука, 1992. – 148 с.
104. Петрович Ю.А. Глутатионпероксидазы в системе антиоксидантной защиты мембран / Ю.А. Петрович, Д.В. Гуткин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1981. – № 5. – С. 76 – 78.
105. Петрович Ю. А. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса / Петрович Ю. А., Гуткин Д. В. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1986. - № 5. - С. 85 - 92.
106. Плетюшкина О.Ю. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке / О.Ю. Плетюшкина // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 1. - С. 75 - 84.
107. Попкова Т.В. Атеросклероз при ревматических заболеваниях / Т.В. Попкова, Д.С. Новикова, Е.Л. Насонов // Ревматология: клинические рекомендации. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 678 – 702.

108. Противоаритмическая активность нового отечественного антигипоксанта этоксида / Д.С.Блинов [и др.] // Вестник аритмологии. – 2008. - № 53. - С. 41 – 43.
109. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляторного звена системы гемостаза (обзор литературы) / А. Е. Викторovich [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2007. – Т. 3, № 3. – С. 39 - 44.
110. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2000. – № 2. – С. 54 - 59.
111. Рослякова Л.В. Бигуаниды: интерес возрождается / Л.В. Рослякова, А.С. Аметов // РМЖ. – 1998. – Т. 6, № 12. – С. 65 – 68.
112. Рябов Г.А. Активированные формы кислорода и их роль в некоторых патологических состояниях / Г.А. Рябов, И.Н. Палечник, Ю.М. Азизов // Анестезиология и реанимация – 1991. – № 1. – С. 63 – 69.
113. Санина О.Л. Биохимическая роль церулоплазмينا и возможности его химического применения / О.Л. Санина, Н.К. Бердинских // Вопросы медицинской химии. – 1986. – Т. 32, № 5. – С. 7 – 14.
114. Сафонова О.А. Влияние цитрата на активность каталазы и супероксиддисмутазы в сыворотке крови крыс при ишемии миокарда и головного мозга / О.А. Сафонова, В.В. Тарасова // Научное творчество XXI века: Сборник трудов Ежегодной Всероссийской научной конференции учащихся, студентов и молодых ученых «Научное творчество XXI века». – Красноярск: Научно-информационный издательский центр, – 2009. – Т. 2 – С. 288.
115. Сафонова О.А. Функционирование глутатионпероксидазной/глутатионредуктазной системы в тканях крыс при действии цитрата на фоне развития тиреотоксикоза / О. А. Сафонова, Т. Н. Попова, Л. Саиди // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 1. – С. 144-148.

116. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко [и др.] – К.: Морион, 2004. – 160 с.
117. Сердечно-сосудистые заболевания. / Информационный бюллетень ВОЗ. – 2015. - № 317. – (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/ru/>).
118. Система антиоксидантной защиты организма и старение / А.А. Подколзин [и др.] // Профилактика старения. – 2000. – Т. 90, вып. 3. – С. 24 – 29.
119. Скулачев В.П. Законы биоэнергетики / В.П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. – 1997. – № 1. – С. 9 - 14.
120. Скулачев В.П. Кислород в живой клетке: Добро и зло / В.П. Скулачев // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 3. – С. 4 - 16.
121. Скулачев В.П. Снижение внутриклеточной концентрации O_2 как особая функция дыхательных систем клетки / В.П. Скулачев // Биохимия. – 1994. – Т. 59, № 12. – С. 1910 – 1912.
122. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачев // Соросовский Образовательный Журнал. – 2001. – Т. 7, № 6. – С. 4 - 10.
123. Соколовский В. В. Тиловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальные воздействия / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1988. – Т. 34, № 6. – С. 2 – 11.
124. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В.Н.Бобырев [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 1994. – Т. 57, № 1. – С. 47 – 54.
125. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С. 63-64.
126. Старостина Е.Г. Бигуаниды в лечении сахарного диабета / Е.Г. Старостина, А.В. Древаль. – М. : Мед. практика, 2000. – 144 с.

127. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснопольский. – М.: Наука, 1991. – 136 с.
128. Сыркин А.Л. Антиишемические препараты метаболического действия / А.Л. Сыркин, А.В. Добровольский // Consilium Medicum. – 2002. – Т. 4, № 11. – С. 572 – 575.
129. Толпыгина О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты (обзор) / О.А. Толпыгина // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – Т.84, № 12. – С. 178-181.
130. Трансплантация ксеногенных кардиомиоцитов при экспериментальном адреналиновом повреждении миокарда: ферментативная активность и морфологические параметры / С.Л. Богородская [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2008. - № 3. – С. 132 – 135.
131. Усиление процессов перекисного окисления липидов и компенсаторная реакция сывороточного альбумина у больных в восстановительном периоде ишемического инсульта / М.Г. Узбеков [и др.] // Российский медико – биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. – 2010. – № 1. – С. 49 – 55.
132. Фатенков В.Н. Нарушения в структуре мембран эритроцитов у больных инфарктом миокарда / В.Н. Фатенков, Е.Г. Зарубина, М.Н. Милякова // Кардиология. – 2002. - № 6. – С. 54 – 57.
133. Феномен предотвращения острого адреналинового некроза миокарда искусственной вентиляцией легких в эксперименте / С.А. Сисакян [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2007. - № 1. – С. 71 – 73.
134. Ферменты детоксикации активных форм кислорода и липоперекисей при экспериментальной ишемии и инфаркте миокарда / В.З. Ланкин. [и др.] // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 1982. – № 5. – С. 58 - 60.
135. Хемилюминесцентные методы в оценке свободнорадикальных реакций / В.А. Косолапов, О.В. Островский, А.А. Спасов // Клиническая и лабораторная диагностика. – 1999. – Т. 9. – С. 41.

136. Хочачка П. Биохимическая адаптация / П. Хочачка, Дж. Сомеро. – М.: Мир, 1988. – 568 с.
137. Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов и системы, регулирующие его интенсивность / Н.Г. Храпова // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. – 1981. – Т. 3. – С. 147 – 155.
138. Хусаинов Д.К. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия у больных ревматоидным артритом / Д.К. Хусаинов, Ю.Э. Терегулов, И.Г. Салихов // Науч-практич. ревматол. – 2006. - № 3. – С. 27 – 31.
139. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 29-36.
140. Чеснокова Н.П. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 37-41.
141. Шувалова Е.П. Прогностическое значение функционального состояния и интенсивности липопероксидации мембран эритроцитов при вирусных гепатитах / Е.П. Шувалова, Т.В. Антонова // Росс. журн. гастроэнтер., гепатол., колопроктол. – 1997. – Т. 7, № 2. – С. 46 – 50.
142. Эластические свойства сосудистой стенки при ревматоидном артрите и динамика уровней артериального давления / Н.С. Повасарис [и др.] // Науч-практич. ревматол. – 2010. - № 6. – С. 50 – 54.
143. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патол. физиол. эксп. терап. – 1998. – Т. 2. – С. 38 - 48.
144. A review of thiazolidinediones and metformin in the treatment of type 2 diabetes with focus on cardiovascular complications / B. Molavi [et al.] // Vascular health and risk management. – 2007. – V. 3, № 6. – P. 967 – 973.

145. A two-photon fluorescent probe for thiols in live cells and tissues / J. H. Lee [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132, № 4. – P. 1216–1217.
146. Aaseth J. Rheumatoid arthritis and metal compounds - perspectives on the role of oxygen radical detoxification / J. Aaseth, M. Haugen, O. Forre // *Analyst.* – 1998. - № 123. – P. 3 – 6.
147. Abdominal adiposity in rheumatoid arthritis: Association with cardiometabolic risk factors and disease characteristics / J.T. Giles [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2010. - № 62. – P. 3173– 3182.
148. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species / M.H. Zou [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 279. – P. 43940–43951.
149. Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: effects of contraction, phenformin, and AICAR / K. Sakamoto [et al.] // *Am j. physiol endocrinol metab.* – 2004. – V. 287. – P. 310 – 317.
150. Amelioration of antigeninduced arthritis in rats by transfer of extracellular superoxide dismutase and catalase genes / L. Dai [et al.] // *Gene. Ther.* – 2003. - № 10. – P. 550 – 558.
151. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling / D.R. Bolster [et al.] // *J. Biol. chem.* – 2002. – V. 277. – P. 23977 – 23980.
152. An epidemiological study of rheumatoid arthritis in the U.S. population / C. Han [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* - 2006. - V.65, № 2. - P. 172.
153. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice / K.S. Moulton [et al.] // *Circulation.* – 1999. - № 99. – P. 1726 — 1732.
154. Anisimov V.N. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2neu transgenic mice / V.N. Anisimov [et al.] // *Experimental Gerontology.* – 2005. – V. 40. – P. 685 – 693.

155. Anti-oxidant intake, plasma anti-oxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis / L. Hagfors [et al.] // *Nutr. J.* – 2003. - № 2. – P. 5.
156. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women / J.R. Cerhan [et al.] // *Am. J. Epidemiol.* – 2003. - № 157. - P. 345 – 354.
157. Antioxidant status & lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis / F. Karatas [et al.] // *Indian J. Med. Res.* - 2003. - V. 118. - P. 178 - 181.
158. Antioxidant status in experimental hyperthyroidism: effect of vitamin E supplementation / A. Seven [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 1996. – V. 256. – P. 65 – 74.
159. Anti-pneumocystis carinii activity of PS-15, a new biguanide folate antagonist / W.T. Hughes [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 1993. – V. 37, №. 7. – P. 1417 – 1419.
160. Antirheumatic drug use and the risk of acute myocardial infarction / S. Suissa [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2006. - № 55. – P. 531 — 536.
161. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis / E. Baecklund [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2006. - № 54. – P. 692 — 701.
162. Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes / S. Matthaei [et al.] // *Diabetes.* – 1999. – V. 40, № 7. – P. 850 – 857.
163. Attach investigators randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α , in patients with moderate-to-severe heart failure. Results of the anti-TNF therapy against congestive heart failure (attach) trial / E.S. Chung [et al.] // *Circulation.* – 2003. - № 107. - P. 3133 — 3140.

164. Bailey C.J. Metformin / C.J. Bailey, R.C. Turner // *Engl j. med.* – 1996. – V. 334. – P. 574 – 579.
165. Bar-Shai M. Peroxynitrite induces an alternative NF-kappa B- activation pathway in L8 rat myoblasts / M. Bar-Shai, A.Z. Reznick // *Anti-oxid. Redox. Signal.* – 2006. - № 8. – P. 639 – 652.
166. Bar-Shai M. Reactive nitrogen species induce nuclear factor-kappa B-mediated protein degradation in skeletal muscle cells / M. Bar-Shai, A.Z. Reznick // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. - № 40. – P. 2112 – 2125.
167. Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development / M.A. Karsdal [et al.] // *Biomarkers.* – 2009. - № 14. – P.181 – 202.
168. Brodde O.E. Drug–drug interactions of beta–adrenoceptor blockers/ O.E. Brodde, H.K. Kroemer// *Arzneimittelforschung.* – 2003. – V. 12, № 53. – P. 814 – 822.
169. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity / A. Mesquita [et al.] // *Current Issue.* – 2010. – V. 107, № 34. – P. 15123 - 15128.
170. Cardiac mitochondrial NADP(p)-isocitrate dehydrogenase is inactivated through 4-hydroxynonenal adduct formation. An event that precedes hypertrophy development / M. Benderdour [et al.] // *Biol. Chem.* - 2003. - № 278. – P. 45154 – 45159.
171. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study / H. Maradit-Kremers [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2005. – V. 52, № 3. – P. 722 – 732.
172. Cell damage by oxygen free radicals / G. Belomo [et al.] // *Cytotechnology.* – 1991. – V. 5, № 1. – P. 571 – 573.
173. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart / T. Yokoyama [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1993. - № 92. - P. 2303 — 2312.

174. Chance B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris // *Physiol. revs.* – 1979. – V. 59, № 3. – P. 527 – 605.
175. Changes in phagocyte activity in patients with ischaemic stroke / M. L. Alexandrova [et al.] // *Luminescence.* – 2001. – V. 16, № 6. – P. 357 – 365.
176. Chatziargyriou V. The role of selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) against oxidative and genotoxic effects of mercury in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) / V. Chatziargyriou, S. Dailianis // *Toxicology in Vitro.* – 2010. – V. 24, № 5. – P. 1363 - 1372.
177. Classical cardiovascular disease risk factors associate with vascular function and morphology in rheumatoid arthritis: a six-year prospective study / A. Sandoo [et al.] // *Arthritis Res. Ther.* – 2013. – V.15, № 6. – P. 203.
178. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties / J.F. Moran [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – № 22. – P. 861 - 870.
179. Corticosteroids: do they damage the cardiovascular system? / S.R. Maxwell [et al.] // *Postgrad. Med. J.* – 1994. - № 70. – P. 863 – 870.
180. Cusi K. Metformin: a review of its metabolic effects / K. Cusi, R.A De Fronzo // *Diabetes rev.* – 1998. – № 6. – P. 89 – 131.
181. Cytochrom P-450-mediated differential oxidative modification of proteins: albumin, apolipoprotein E and CYP2E1 as targets / D.W. Choi [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health A.* – 2004. – V. 67. – P. 2061 - 2071.
182. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in *Arabidopsis* leaves / A. Mhamdi [et al.] // *Plant Cell Environment.* – 2010. – V. 33, № 7. – P. 1112 – 1123.
183. Davidoff F. Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function / F. Davidoff // *J. of clinical investigation.* – 1968. – V. 47. – P. 2331 – 2343.
184. Davidoff F. Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. The mechanism of phenethylbiguanide accumulation and its relationship to in

- vitro respiratory inhibition / F. Davidoff // *J. Boil. chem.* – 1971. – V. 246. – P. 4017 – 4027.
185. Davidson M.B. An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus / M.B. Davidson, A.L. Peters // *Am. J. Med.* – 1997. – № 102. – P. 99 – 110.
186. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure / K.J. Davies, M.E. Delsignore // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262, № 20. – P. 9908 – 9913.
187. Dean R.T. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins / R.T. Dean, J.V. Hunt, A.J. Grant // *Free Rad. Biol. Med.* – 1991. – V. 11, № 12. – P. 161 - 165.
188. Decker E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? / E.A. Decker // *Nutr. Rev.* – 1997 – № 55. – P. 396 - 398.
189. Deneke S. Regulation of cellular glutathione / S. Deneke, B. Fanburg // *Amer. j. physiol.* – 1989. – V. 257, № 4. – P. 163 – 173.
190. Design, synthesis and biological evaluation of novel nitroaromatic compounds as potent glutathione reductase inhibitors / R. Çakmak [et al.] // *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters.* – 2011. – V. 21, № 18. – P. 5398 – 5402.
191. Dhaunsi G. S. Peroxisomal participation in the cellular response to oxidative stress of endotoxin / G. S. Dhaunsi, I. Singh, C. D. Hanevold // *Molec. Cell. Biochem.* – 1993. – V. 126, № 1. – P. 25 – 35.
192. Dhawan S.S. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease / S.S. Dhawan, A.A. Quyyumi // *Curr. Atheroscler. Rep.* – 2008. – V. 10, № 2. – P. 128 - 33.
193. Diabetes mellitus and insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis: risk reduction in a chronic inflammatory disease / MC. M. Wasko [et al.] // *Arthritis Care Res.* – 2011. – V. 83, № 4. – P. 512 – 521.

194. Differential of glyburide (glibenclamidi) and metformin on QT dispersion a potential adenosine triphosphate sensitive K^+ channel effect / S.A. Najeed [et al.] // *Am. J. Cardiol.* – 2002 – V. 90, № 10. – P. 1103 – 1106.
195. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I / M.Y. El-Mir [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 223 – 228.
196. Effect of folate derivatives on the activity of antifolate drugs used against malaria and cancer / E. Nduati [et al.] // *Parasitol. res.* – 2008. – № 102. – P. 1227 – 1234.
197. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems / A.J. Bain [et al.] // *Applied and environmental microbiology.* – 2003. – V. 69, № 8. – P. 4770 – 4776.
198. Effects of glibenclamide and metformin (alone or in combination) on insulin release from isolated human pancreatic islets / R. Lupi [et al.] // *Acta. diabetol.* – 1997. – V. 34. – P. 46 – 48.
199. Effects of hyperthyroidism on rat liver glutathione metabolism: related enzymes' activities, efflux, and turnover / V. Fernandez [et al.] // *Endocrinology.* 1991. – V. 129, № 1. – P. 85 - 91.
200. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine / K. Larsena [et al.] // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* – 2012. – V. 34, № 3. – P. 811 – 818.
201. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure / B. Levine [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1990. - № 323. – P. 236 — 241.
202. EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other types of inflammatory arthritis – TASK FORCE «Cardiovascular risk management in

- RA» / M.J. Peters [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – V. 69, № 2. – P. 325 – 331.
203. Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients / L. Dai [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2000. - № 32. – P. 479 – 486.
204. Explaining how «high-grade» systemic inflammation accelerated vascular risk in rheumatoid arthritis / N. Sattar [et al.] // *Circulation.* – 2003. - № 108. – P. 2957 — 2963.
205. Feldt J. M. High-density lipoprotein: does it have a dark side? / J. M. Feldt // *Arthritis Research & Therapy.* – 2008. - № 10. – P. 121.
206. Firestein G.S. Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis / G.S. Firestein // *J. Clin. Invest.* – 1999. - № 103. – P. 3 — 4.
207. Flohe L. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects. / L. Flohe, D. Dolphin // *J. wiley and sons.* – 1989. – V. 3. – P. 643 – 647.
208. Forman H. J. On the stability to bovine superoxide dismutase / H. J. Forman, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1973. – V. 248, № 8. – P. 2645 - 2649.
209. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart / P. Eaton [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1999. - № 276. – P. 935 – 943.
210. Free radicals and reactive species. In: Ulbra, ed. Free radicals and the cellular response to the oxidative stress / M. Garcez [et al.] // *Canoas: Porto Alegre.* – 2004. – P. 13 – 34.
211. Frei B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma / B. Frei, R. Stocker, B.N. Ames // *Proc. natl. acad. sci.* – 1988. – V. 85 – P. 9748 – 9752.
212. Fridovich I.J. The biology oxygen radicals / I.J. Fridovich // *Sciens.* – 1978. – V. 201. – P. 875 – 880.

213. Gabriel S.E. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985 / S.E. Gabriel, C.S. Crowe, W.M. O'Fallon // *Arthritis Rheum.* – 1999. – V.42, № 3. – P. 415 - 420.
214. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs / P.R. Gardner, D.M. Nguyen, C.W. White // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1994. – V. 91, № 25. – P. 12248 - 12252.
215. Gerald M.R. Diabetes / M.R. Gerald // *Metabolism Reviews.* – 1995. - № 11. – P. 97 – 108.
216. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projection for 2030 / S. Wild [et al.] // *Diabetes Care.* – 2004. – V. 27, № 5. – P. 1047 – 1053.
217. Glucocorticoids and the risk for initiation of hypoglycemic therapy / J.H. Gurwitz [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 1994. - № 154. – P. 97 – 101.
218. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons / S. P. Raps [et al.] // *Brain Research.* – 1989. – V. 493, № 2. – P. 398 – 401.
219. Gutteridge J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage / J.M.C. Gutteridge // *Clin. chem.* – 1995. – V. 41, № 12. – P. 1819 – 1828.
220. Hall F.C. Disease modification and cardiovascular risk reduction: two sides of the same coin? / F.C. Hall, N. Dalbeth // *Rheumatology (Oxford).* – 2005. – V. 4, № 12. – P. 1473 – 1482.
221. Halliwell B. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // *Lancet.* – 1984. – V. 12. – P. 1396 – 1398.
222. Ham A.J. Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation / A.J. Ham, D.C. Liebler // *Arch. biochem. biophys.* – 1997. – V. 339. – P. 157 – 164.

223. Hardie D.G. Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease / D.G. Hardie // *FEBS Lett.* – 2008. – № 582. – P. 81 – 89.
224. Henrotin Y.E. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage / Y.E. Henrotin, P. Bruckner, J.P. Pujol // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2003. - № 11. – P. 747 – 755.
225. Hitchon C.A. Oxidation in rheumatoid arthritis / C.A. Hitchon, H.S. El-Gabalawy // *Arthritis Res.Ther.* - 2004. - V. 6, № 6. - P. 265 - 278.
226. Hogg N. Nitric oxide and lipid peroxidation / N. Hogg, B. Kalyanaraman // *Biochim. et biophys. act. bioeneng.* – 1999. – V. 1411, № 2. – P. 378 – 384.
227. Hydroxychloroquine and risk of diabetes in patients with rheumatoid arthritis / MC. M. Wasko [et al.] // *JAMA.* – 2007. – V. 298, № 2. – P. 187 – 193.
228. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases / P. G. Board [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275, № 32. – P. 24798 - 24806.
229. Ikeda T. New polymeric biocides: synthesis and antibacterial activities of polycations with pendant biguanide groups / T. Ikeda, H. Yamaguchi, S. Tazuke // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 1984. – V. 26, № 2. – P. 139 – 144.
230. Immunosuppressive medications and hospitalization for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis / D.H. Solomon [et al.] // *Arthr. Rheum.* – 2006. - № 54. – P. 3790 — 3798.
231. Impaired glutathione reductase activity and levels of collagenase and elastase in synovial fluid in rheumatoid arthritis / L. Bazzichi [et al.] // *Clin. Exp. Rheumatol.* - 2002. - V. 20, № 6. - P. 761 - 766.
232. Incidence and predictors of severe extra-articular disease manifestations in an early rheumatoid arthritis inception cohort / C. Turesson [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* - 2007. - № 66. – P. 1543 — 1544.

233. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis / O. Altindag [et al.] // Clin. Biochem. – 2007. - № 40. – P. 167 – 171.
234. Increased matrix metalloproteinase plasma levels in patients with congestive heart failure: relation to cytokine activation / H.R. Gunasinghe [et al.] // Circulation. – 2000. - № 102. – P. 403.
235. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis / Y. Kumeda [et al.] // Arthr. Rheum. – 2002. - № 46. – P. 1489 — 1497.
236. Increased yield of high-purity and active tetrameric recombinant human ECSOD by solid phase refolding / K. Ryu [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 18, № 10. – P. 1648 - 1654.
237. Influence of glucocorticoids and disease activity on total and high density lipoprotein cholesterol in patients with rheumatoid arthritis / M. Boers [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2003. - № 62. – P. 842 – 845.
238. Insight into cytoprotection with metabolic agents / A. Cargnoni [et al.] // Eur Heart J. – 1999. – V. 1. – P. 40 – 48.
239. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients / J. Cedergren [et al.] // J. Rheumatol. – 2007. - № 34. – P. 2162 – 2170.
240. Jayson M.I. Intra-articular pressure in rheumatoid arthritis of the knee 3. Pressure changes during joint use / M.I. Jayson, A.S. Dixon // Ann. Rheum. Dis. – 1970. - № 29. – P. 401 – 408.
241. Jones G.C. Contraindications to the use of metformin / G.C. Jones, J.P. Macklin, W.D. Alexander // Br Med J. – 2003. – V. 326. – P. 4 – 5.
242. Jones K. Biguanide-atovaquone synergy against plasmodium falciparum in vitro / K. Jones, S. A. Ward // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – V. 46, № 8. – P. 2700 – 2703.

243. Josephy P. D. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology / P. D. Josephy // *Human Genomics Proteomics*. – 2010. – V. 2, № 1. – P. 876 - 940.
244. Kaplan M.J. Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis / M.J. Kaplan // *Rheumatology*. – 2006. – V. 18, № 3. - P. 289 — 297.
245. Kashyap A.S. Haemolytic anaemia due to metformin / A.S. Kashyap // *Postgrad. Med. j.* – 2000. – V. 76. – P. 125 – 126.
246. Keele B. B. Superoxide dismutase of escherichia coli / B. B. Keele, J.M. McCord, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1970. – V. 245, № 22. – P. 6176 - 6181.
247. Keen H. The uses of biguanides in diabetes mellitus / H. Keen, R.J. Jarrett // *Postgrad. med. j.* – 1968. – V. 44, № 6. – P. 466 – 471.
248. Kirpichnikov D. Metformin: An Update / D. Kirpichnikov, S.I. Mc. Farlane, J.R. Sowers // *Ann. Intern. Med.* – 2002. – № 137 – P. 25 –33.
249. Kitas G.D. Tackling ischemic heart disease in rheumatoid arthritis / G.D. Kitas, N. Erb // *Rheumatology (Oxford)*. – 2003. – V. 42, № 5. – P. 607 – 613.
250. Klareskog L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases / L. Klareskog, L. Padyukov, L. Alfredsson // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2007. – V. 19, № 1. – P. 49 – 54.
251. Klepser T.B. Metformin hydrochloride: an antihyperglycemic agent / T.B. Klepser, M.W. Kelly // *Am j. health syst. pharm.* – 1997. – V. 54. – P. 893 – 903.
252. Klip A. Cellular mechanism of action of metformin / A. Klip, L.A. Leiter // *Diabetes Care*. – 1990. – V. 13, № 6. – P. 696 – 704.
253. Krinsky N.L. Membrane antioxidants / N.L Krinsky // *Ann. NY. acad. sci.* – 1988. – V. 551. – P. 17 – 33.
254. Kulich W. Effect of the NSAID nimesulide on the radical scavenger glutathione S-transferase in patients with osteoarthritis of the knee / W.

- Kulich, N. Fagerer, H. Schwann // *Current Medical Research and Opinion*. - 2007. - V. 23, № 8. – P. 1981 - 1986.
255. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction / H.M. Lander // *FASEB J.* – 1997. – V. 11, № 2. – P. 118 - 124.
256. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease / R.L. Levine // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 32, № 9. – P. 790 – 796.
257. Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease / E. Myasoedova [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. - № 69. – P. 495.
258. Lipid peroxidation, some extracellular anti-oxidants, and anti-oxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis / S. Taysi [et al.] // *Rheumatol. Int.* – 2002. - № 21. – P. 200 – 204.
259. Lopaschuk G.D. AMP-activated protein kinase control of energy metabolism in the ischemic heart / G.D. Lopaschuk // *Int. J. Obes. (Lond.)* – 2008. – № 32. – P. 29 – 35.
260. Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarians / H. R. Anderson [et al.] // *Age and ageing*. – 1998. – V. 27, № 5. – P. 643 – 648.
261. Low concentrations of flavo-noids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis / W. Watjen [et al.] // *J. Nutr.* – 2005. – № 135. – P. 525 - 531.
262. Manzi S. Inflammationmediated rheumatic disease and atherosclerosis / S. Manzi, M.C. Wasko // *Ann. Rheum. Dis.* – 2000. - № 59. – P. 321 — 325.
263. Mapp P.I. Hypoxia, oxidative stress, and rheumatoid arthritis / P.I. Mapp , M.C. Grootveld, D.R. Blake // *Br. Med. Bull.* – 1995. – V. 51. – P. 419 – 436.
264. Marklund S. Distribution of Cu, Zn-superoxide dismutase and Mn-superoxidedismutase in human tissues and extracellular fluids / S. Marklund // *Acta Physiol.Scand. Suppl.* – 1980. – V. 492. – P. 19 - 23.

265. Mc. Cord J.M. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase / J.M. Mc. Cord // *Science*. – 1974. - № 185. – P. 529 – 531.
266. Mc. Gettigan P. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase. A systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2 / P. Mc. Gettigan, D. Henry // *JAMA*. – 2006. – V. 296, № 13. – P.1633 — 1644.
267. Mc. Innes I.B. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / I.B. Mc. Innes, G. Schett // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. - № 7. – P. 429 – 442.
268. *Medicina interna básica* / Andreoli T.E. [et al.] // *Livro*. – 1998. - № 1. – P. 568 – 570.
269. Meister A. Glutathione / A. Meister, E. M. Anderson // *Ann. Rev. Biochem.* – 1983. – V. 52. – P. 711 - 760.
270. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage / C. Szabo [et al.] // *Biolog. Chem.* – 1997. – V. 272, № 14. – P. 9030 - 9036.
271. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patient / J.M. Evans [et al.] // *BMJ*. – 2005. – V. 330. – P. 1304 – 1305.
272. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells / N. Ouslimani [et al.] // *Metabolism*. – 2005. – V. 54, № 6. – P. 829 - 834.
273. Metformin improves cardiac functional recovery after ischemia in rats / R.J. Legtenberg [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 2002. – № 34. – P. 182 – 185.
274. Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women / D. Giugliano [et al.] // *Diabetes Care*. – 1993. – V. 16, № 10. – P. 1387 - 1390.
275. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes / N. Musi [et al.] // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – P. 2074 – 2081.

276. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells / G. Patane [et al.] // *Diabetes*. – 2001. – V. 49, № 5. – P. 735 – 740.
277. Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion / I. Leclerc [et al.] // *Am j. physiol endocrinol metab.* – 2004. – V. 286. – P. 1023 – 1031.
278. Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis / B.A. Kefas [et al.] // *Biochem pharmacol.* – 2004. – V. 68. – P. 409 – 416.
279. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study / H.K. Choi [et al.] // *Lancet*. – 2002. – № 9. – P. 1173 — 1177.
280. Methyl succinate antagonises biguanide-induced AMPK-activation and death of pancreatic b-cells through restoration of mitochondrial electron transfer / S.A. Hinke [et al.] // *British journal of pharmacology*. – 2007. – № 150. – P. 1031 – 1043.
281. Microstructure and magnetic properties of Al-doped barium ferrite with sodium citrate as chelate agent / D. Chen [et al.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2013. – V. 337 - 338. – P. 65 - 69.
282. Mild reductions in mitochondrial NAD-dependent isocitrate dehydrogenase activity result in altered nitrate assimilation and pigmentation but do not impact growth / A. Sienkiewicz-Porzucek [et al.] // *Molecular. Plant*. – 2010. – V. 3, № 1. – P. 156 - 173.
283. Moore E.N. Acute animal models for the study of antiarrhythmic drugs for the prevention of sudden coronary death / E.N. Moore, J.F. Spear // *Clin. Pharmacol. Antiarrhythmic Therapy*. - 1984. – № 24. - P. 31 – 46.
284. Mortality in early inflammatory polyarthritis. Cardiovascular mortality is increased in seropositive patients / N.J. Goodson [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2002. – V. 46, № 8. – P. 2010 – 2019.

285. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization / R. J. Folz [et al.] // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 1997. – V. 17, № 4. – P. 393 - 403.
286. Moynagh P.N. The NF-kappa B pathway / P.N. Moynagh // *J. Cell. Sci.* – 2005. - № 118. – P. 4589 – 4592.
287. Muller K. Gpl20 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine / Muller K. // *Eur. J. Pharmacol.* - 1992. - V. 226, № 6. - P. 209 - 214.
288. Murakami K. Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress / K. Murakami, M. Yoshino // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1997. – V. 41, № 3. – P. 481 – 486.
289. Nagi D.K. Effects of metformin on insulin resistance, risk factors for cardiovascular disease, and plasminogen activator inhibitor in NIDDM subjects. A study of two ethnic groups / D.K. Nagi, J.S. Yudkin // *Diabetes Care.* – 1993. – V. 16, № 4. – P. 621 – 629.
290. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress/ I.S. Wittstein [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2005. - № 352. – P. 539 — 548.
291. Nohl H. Generation of activated oxygen species as side products of cell respiration / H. Nohl // *Free radic. biol. and med.* – 1990. – V. 3, № 1. – P. 141 – 146.
292. Novel role for mitochondria: protein kinase c-dependent oxidative signaling organelles in activation-induced t-cell death / M. Kamin [et al.] // *Molecular and cellular biology.* – 2007. – № 10. – P. 3625 – 3639.
293. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis / C. Turesson [et al.] // *J. Rheumatol.* – 2002. - № 29. - P.62 — 67.

294. Okamoto T. Oxidative stress in rheumatoid arthritis / T. Okamoto // Surh Y-J, Packer L, eds. Oxidative stress, inflammation and health. California, CA: Taylor & Francis. – 2005. – P. 245 – 270.
295. Olinescu R. Glutathione as possible mediator of hydrogen peroxide decomposition in erythrocytes / R. Olinescu // Rev. roum. biochem. – 1974. – V. 11, № 1. – P. 49 – 59.
296. Oppenheimer-Marks N. Adhesion molecules in rheumatoid arthritis / N. Oppenheimer-Marks, P.E. Lipsky // Springer Semin. Immunopathol. – 1998. – № 20. – P. 95 — 114.
297. Owen M.R. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain / M.R. Owen, E. Doran, A.P. Halestrap // Biochem. J. – 2000. – V. 348, № 3. – P. 607 – 614.
298. Oxidant—antioxidant imbalance in blood of children with juvenile rheumatoid arthritis / V. Araujo [et al.] // Biofactors. - 1998. - № 8. – P. 155 - 159.
299. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy / M. Grootveld [et al.] // Biochem. J. – 1991. - № 273. – P. 459 – 467.
300. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases / S. Bashir [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 1993. - № 52. – P. 659 – 666.
301. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo / I.R. Garrett [et al.] // J. Clin. Invest. – 1990. - № 85. – P. 632 – 639.
302. Packer M. Role of the sympathetic nervous system in chronic heart failure: a historical and philosophical perspective / M. Packer // Circulation. – 1990. - № 82. – P. 1 — 6.

303. Pahl H.L. Oxygen and the control of gene expression / H.L. Pahl, P.A. Baererle // *Bio. Essays.* – 1994. - № 16. – P. 497 – 502.
304. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin / P. Marchetti [et al.] // *J. clin. Endocrinol. metab.* – 2004. – V. 89. – P. 5535 – 5541.
305. Pasceri V. A tale of two diseases. Atherosclerosis and rheumatoid arthritis / V. Pasceri, E.T.H. Yeh // *Circulation.* – 1999. - № 100. – P. 2124 — 2126.
306. Perfusion of hearts with triglyceride-rich particles reproduces the metabolic abnormalities in lipotoxic cardiomyopathy / P. Pillutla [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2005. - № 288. – P. 1229–1235.
307. Pharmacological activators of AMP-activated protein kinase have different effects on Na⁺ transport processes across human lung epithelial cells / A.M. Woollhead [et al.] // *British journal of pharmacology.* – 2007. – № 151. – P. 1204 – 1215.
308. Phenformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) activation of AMP-activated protein kinase inhibits transepithelial Na⁺ transport across H441 lung cells / A.M. Woollhead [et al.] // *J. physiol.* – 2005. – V. 566, № 3. – P. 781 – 792.
309. Piracetam improves mitochondrial dysfunction following oxidative stress / U. Keil [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – 147, № 2. – P. 199–208.
310. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis / A. Kamanli [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* - 2004. - V. 22, № 1. - P. 53 - 57.
311. Platelet surface glutathione reductase – like activity / D. W. Essex [et al.] // *Blood.* – 2004. – V. 104, №5. – P. 1383 - 1385.
312. Poorly controlled elderly Type 2 diabetic patients: the effects of increasing sulphonylurea dosages or adding metformin / F. Gregori [et al.] // *Diabet. Med.* –1999. – V. 16, № 12. – P. 1016 – 1024.

313. Poroikov V.V. PASS: Prediction of Biological Activity Spectra for Substances / V.V. Poroikov, D.A. Filimonov // Predictive Toxicology; ed. By C. Helma. – N.-Y.: Taylor & Francis, 2005. – P. 459 – 478.
314. Prevalence and associations of hypertension and its control in patients with rheumatoid arthritis / V.F. Panoulas [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2007. - № 46. – P.1477 – 1482.
315. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin / M.B. Schneider [et al.] // Gastroenterology. – 2001. – V. 120. – P. 1263 – 1270.
316. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients / Mc. Innes I.B. [et al.] // J. Exp. Med. – 1996. - № 184. – P. 1519 – 1524.
317. Prognostic importance of low body mass index in relation to cardiovascular mortality in rheumatoid arthritis / M. Kremers [et al.] // Arthritis Rheum. – 2004. - № 50. – P.3450 – 3457.
318. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD) / G. Torre-Amione [et al.] // J. Amer. Coll. Cardiol. – 1996. - № 27. – P. 1201 — 1206.
319. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties / S. Azam [et al.] // Toxicol. In Vitro. – 2004. – № 18. – P. 555 - 561.
320. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress/ I. Dalle-Donne [et al.] // Clin. Chim. Acta. – 2003. - № 329. – P. 23 – 38.
321. Protein measurement with the Folin-phenol reagent / O. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – P. 265 - 275.
322. Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis / J. Watanabe [et al.] // Arthritis Rheum. – 2012. - № 64. – P.1828 – 1837.

323. Quercetin can act either as an inhibitor or an inducer of the mitochondrial permeability transition pore: A demonstration of the ambivalent redox character of polyphenols / U. De Marchi [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – № 1787. – P. 1425 - 1432.
324. Rall T.W. Glutathione reductase of animal tissues / T.W. Rall, A.L. Lehninger // *The J. of Biol. Chem.* – 1952. – V. 194, № 1. – P. 119 - 130.
325. Ramipril attenuates lipid and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis / Q. Shi [et al.] // *Arthritis Research & Therapy.* - 2012. - P. 3 - 14.
326. Ramsay R.R. Molecular forms of aconitase and their interconversions / R.R. Ramsay, N.P. Signer // *Biochem. J.* – 1984. – V. 221, № 2. – P. 489 – 497.
327. Raza H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments / H. Raza, A. John // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2005. – № 207. – P. 212 - 220.
328. Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF- α / R. Aikawa [et al.] // *Cytokine.* – 2002. - № 18. - P. 179 — 183.
329. Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes / A.C. Van der Wal [et al.] // *Heart.* - 1998. - V. 80. – P. 14—18.
330. Redox biochemistry / R. Banerjee [et al.]. - New Jersey.: John Wiley S.V. Sons, 2008. – 318 p.
331. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis / L.I. Filippin [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology.* – 2008. - № 152. – P. 415 – 422.
332. Redox-dependent increases in glutathione reductase and exercise preconditioning: role of NADPH oxidase and mitochondria / C. R. Frasier [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2013. – V. 98, № 1. – P. 47 - 55.
333. Relationship between anti-CCP antibodies and oxidant and anti-oxidant activity in patients with rheumatoid arthritis / L. Ediz [et al.] // *Int. J. Med. Sci.* - 2011. - V. 8, № 2. - P. 139 - 147.

334. Results of targeted antitumor necrosis factor therapy with etanercept (ENBREL) in patients with advanced heart failure / B. Bozkurt [et al.] // *Circulation*. – 2001. - № 103. – P. 1044 — 1047.
335. Retsky K.L. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification / K.L. Retsky, M.W. Freeman, B. Frei // *J. biol. chem.* – 1993. – V. 268. – P. 1304 – 1309.
336. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease / C.S. Crowson [et al.] // *Am. Heart J.* – 2013. – V. 166, № 4. – P. 622 – 628
337. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases / P.P. Tak [et al.] // *Immunol. Today*. – 2000. - № 21. – P. 78 – 82.
338. Rheumatoid arthritis versus type 2 diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study / V.P. Van Halm [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2009. - № 68. – P. 1395 – 1400.
339. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative metaanalysis / P. Juni [et al.] // *Lancet*. – 2004. - № 364. – P. 2021 — 2029.
340. Risk of diabetes among patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and psoriasis / DH Solomon [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – V. 69, № 12. – P. 2114 – 2117.
341. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis / S.R. Salpeter [et al.] // *Arch Intern Med.* – 2003. – V. 163, № 21. – P. 2594 – 2602.
342. Risk of hospitalization for myocardial infarction among users of rofecoxib, celecoxib, and other NSAIDs: a populationbased case-control study / S.P. Johnsen [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2005. - № 165. – P. 978 — 984.
343. Rodevand E. Rheumatoid arthritis and heart disease / E. Rodevand, J. Bathen, M. Qstensen // *Nor. Laegeforen.* – 1999. –V. 19, № 2. - P. 223 - 225.
344. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action / G.J. Zhou [et al.] // *Journal of clinical investigation*. – 2001. – V. 108, № 8. – P. 1167 – 1174.

345. Role of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in ischemia-reperfusion injury in mouse kidney / J. Kim [et al.] // *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. – 2009. – V. 296, № 3. – P. F622 - F633.
346. Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease / R. Ross // *N. Engl. J. Med.* – 1999. - V. 340. - P. 115 — 126.
347. Schatz H. The effect of dimethylbiguanide on glucose tolerance, serum insulin and growth hormone in obese patients / H. Schatz, S. Doci, R. Hofer // *Diabetologia*. – 1972. – V. 8. – P. 1 – 7.
348. Serum concentrations of alpha tocopherol, beta carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / G.W. Comstock [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 1997. - № 56. – P. 323 – 325.
349. Short duration exhaustive running exercise does not modify lipid hydroperoxide, glutathione peroxidase and catalase / S. Revan [et al.] // *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. – 2010. – V. 50, № 2. – P. 235 - 240.
350. Silman A.J. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins / A.J. Silman, J. Newman, A.J. Mac. Gregor // *Arthritis Rheum.* – 1996. – V. 39, № 5. – P. 732 – 735.
351. Simard J.F. Prevalent rheumatoid arthritis and diabetes among NHANES III participants aged 60 and older / J.F. Simard, M.A. Mittleman // *J. Rheumatol.* – 2007. – V. 34, № 3. – P. 469 – 473.
352. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium / G.S. Firestein [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1997. – V. 94, № 20. – P. 10895 - 10905.
353. Stafford J.M. Treatment update: thiazolidinediones in combination with metformin for the treatment of type 2 diabetes / J.M. Stafford, T. Elasy // *Vascular Health and Risk Management*. – 2007. – V. 3, № 4. – P. 503 – 510.

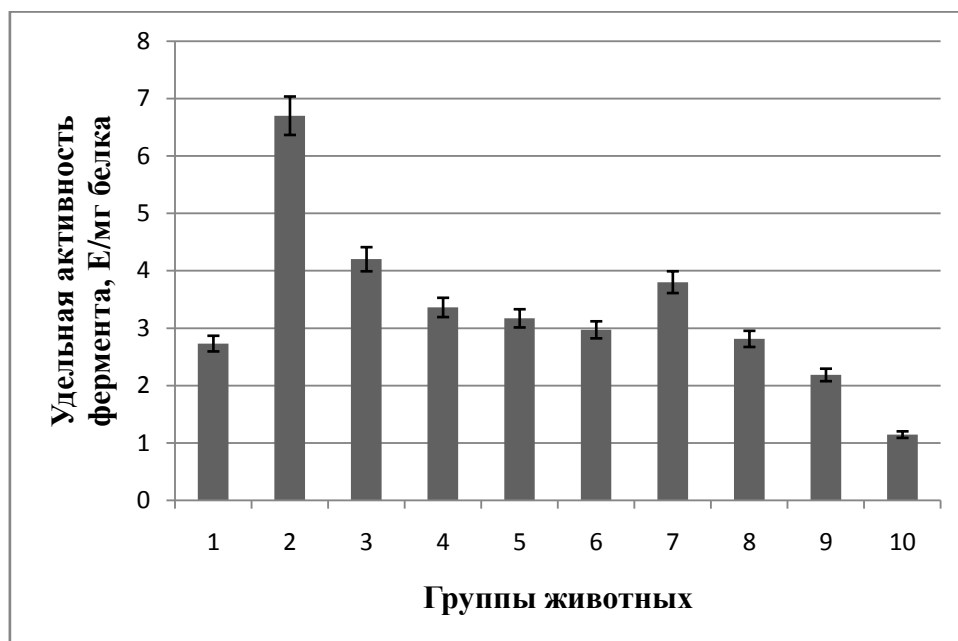
354. Stanley W.C. Metabolic link between is chemia and cardiac dysfunction / W.C. Stanley // Heart. Metab. – 2005. - № 27. – P. 30 – 33.
355. Staron A. Oxidative stress in erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis / A. Staron, G. Makosa, M. Koter-Michalak // Rheumatol. Int. - 2012. - V. 32, №. 2. - P. 331 - 334.
356. Steiner D.F. Respiratory inhibition and hypoglycemia by biguanides and decamethylenediguanidine / D.F. Steiner, R.H. Williams // Biochim. Biophys. Act. – 1998. – V. 30. - P. 329 – 340.
357. Surapneni K.M. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis / K.M. Surapneni, V.S. Chandrasada Gopan // Indian J. Clin. Biochem. - 2008. - V. 23, №. 1. - P. 41 - 44.
358. Suzuki Y.J. Free Radical / Y.J.Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian // Biol. Med. – 1996. – V. 22, № 1. – P. 269 - 285.
359. Synthesis and antifilarial activity of N-[44 [4-Alkoxy-3-(dialkylamino)methyl]phenyl]amino]-2-pyrimidiny]-N~phenylguanidines / M. Angela [et al.] // J. med. chem. – 1983. – № 26. – P. 1258 – 1267.
360. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX) - 2: the human pharmacology of a selective inhibitors of COX-2 / B.F. Mc. Adam [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. - № 96. – P. 272 — 277.
361. Takenaka Y. The effect of α -tocoferol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein hiols induced by free radicfls generated in different sites / Y. Takenaka, M. Miki, H. Yasuda // Arch. biochem. and biophys. – 1991. – V. 285, № 2. – P. 344 – 350.
362. Ten year outcome in a cohort of patients with early rheumatoid arthritis: health status, disease process, and damage / E. Lindqvist [et al.] // Ann. Rheum. Dis. – 2002. - № 61. - P. 1055 — 1059.
363. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism / S.A. Hawley [et al.] // Diabetes. – 2002. – V. 51. – P. 2420 – 2425.

364. The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures / S. V. Petersen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100, № 24. – P. 13875 - 13880.
365. The mortality of rheumatoid vasculitis compared with rheumatoid arthritis / A.E. Voskuyl [et al.] // *Arthr. Rheum.* - 1996. - № 39 – P. 266 — 271.
366. The response of rat liver lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and glutathione concentration to the thyroid hormone / P. Morini [et al.] // *International Journal of Biochemistry.* – 1991. – V. 23, № 10. – P. 1025 - 1030.
367. The specific β 2AR blocker, ICI 118,551, actively decreases contraction through a G_i-coupled form of the β 2AR in myocytes from failing human heart / H. Gong [et al.] // *Circulation.* – 2002. - № 105. – P. 2497 — 2503.
368. The use of phenformin and metformin / J.A. Hunt [et al.] // *CMA Journal.* – 1977. – V. 117, № 9. – P. 429 – 430.
369. Therapeutic effects of TACI-Ig on rat with hadjuvant arthritis / D. Wang [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology.* – 2010. - № 163. – P. 225 – 234.
370. Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis / T. Jikimoto [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2002. - № 38. – P. 765 – 772.
371. Toms T.E. Dyslipidaemia in rheumatoid arthritis: the role of inflammation, drugs, lifestyle and genetic factors / T.E. Toms, D.P. Symmons, G.D. Kitas // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2010. - № 8. – P. 301 – 326.
372. Torre-Amione G. Role of tumour necrosis factor alpha in the progression of heart failure: therapeutic implications / G. Torre-Amione, M.T. Voelkel, J.A. Farmer // *Drugs.* – 2000. - № 59. – P. 745 — 751.
373. Transitory activation of AMPK at reperfusion protects the ischaemic-reperfused rat myocardium against infarction / M.A. Paiva [et al.] // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2010. – V. 24, № 1. – P. 25 – 32.

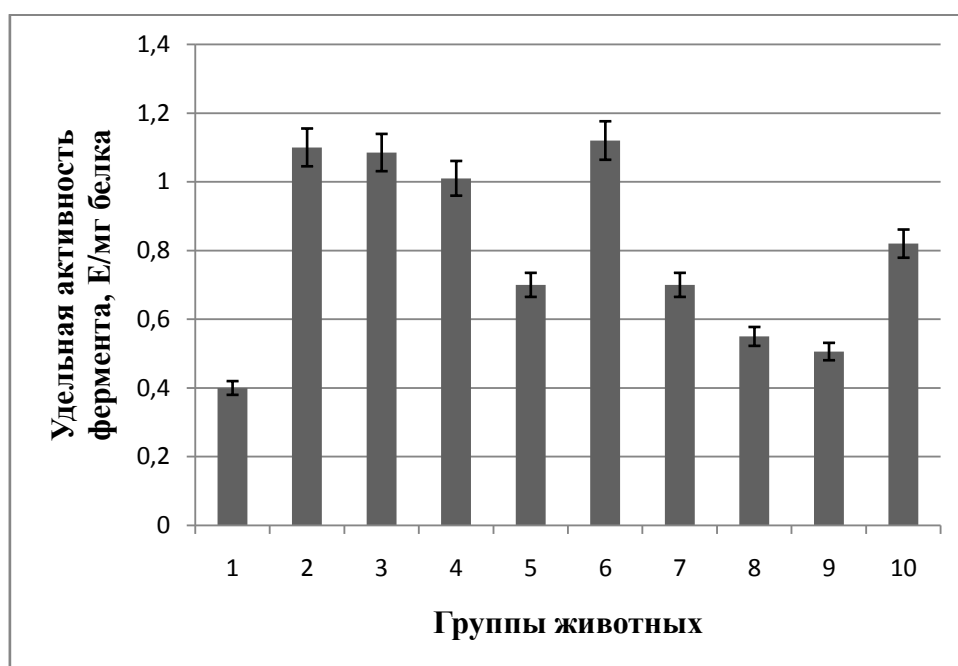
374. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer / S. Iyama [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2001. - № 44. – P. 2160 – 2167.
375. Trends in cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis over 50 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies / C. Meune [et al.] // *Rheumatology.* – 2009. – V. 48, № 10. – P. 1309 – 1313.
376. Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective / W.S. Bradham [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2002. - № 53. – P. 822 — 830.
377. Turesson C. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis / C. Turesson, L.T.H. Jacobsson // *Scand. J. Rheumatol.* – 2004. - № 334. - P. 65 — 72.
378. Upton J. R. The effects of dietary oxidized fat and selenium source on performance, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity in broiler chickens / J. R. Upton, F. W. Edens, P. R. Ferket // *Appl. Poult. Res.* – 2009. - V. 18, № 2. – P. 193 - 202.
379. Ussher J. R. Clinical implications of energetic problems in cardiovascular disease / J. R. Ussher, G.D. Lopaschuk // *Heart. Metab.* – 2006. - № 32. – P. 9 – 17.
380. Van Dorem S. Accelerated atherosclerosis: an extra articular feature of rheumatoid arthritis / S. Van Dorem, G. Mc. Coll, I.P. Wicks // *Arthritis Rheum.* - 2002. – V. 46, № 4. - P. 862 – 875.
381. Van Halm V.P. Disease-modifying antirheumatic drugs are associated with a reduced risk for cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: a case control study / V.P. Van Halm, M.T. Nurmohamed, J.W. Twisk // *Arthr. Res. Ther.* – 2006. – V. 8, № 5. – P. 151 — 156.
382. Vijayakumar D. Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of rheumatoid arthritis patients / D. Vijayakumar, K. Suresh, S. Manoharan // *Indian J. Clin. Biochem.* - 2006. - V. 21, №. 1. - P. 104 - 108.

383. Vitamin E uncouples joint destruction and clinical inflammation in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis / M. De Bandt [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2002. - № 46. – P. 522 – 532.
384. Wamelink M.M. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review / M. M. Wamelink, E.A. Struys, C. Jakobs // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2008. – V. 31, №6. – P. 703 - 707.
385. Weisiger R. A. Superoxide dismutase / R. A. Weisiger, I. Fridovich // *The J. of Biol. Chem.* – 1973. – V. 248, № 10. – P. 3582 - 3592.
386. Wong K.A. A revised model for AMP-activated protein kinase structure: the alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits / K.A. Wong, H.F. Lodish // *J. Biol. Chem.* – 2006. – № 281. – P. 36434 – 36442.
387. Yamazaki Y. Metalation states versus enzyme activities of Cu, Zn-superoxidedismutase probed by electrospray ionization mass spectrometry / Y. Yamazaki, T. Takao // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80, № 21. – P. 8246 - 8252.
388. Yost F.J. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli* / F. J. Yost, I. Fridovich // *The J. of Biol.Chem.* – 1973. – V. 248, № 11. – P. 4905 - 4906.
389. Zhang L. Metformin and phenformin activate AMP-activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration / L. Zhang, H. He, J.A. Balschi // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – № 293. – P. 457 – 466.

ПРИЛОЖЕНИЕ

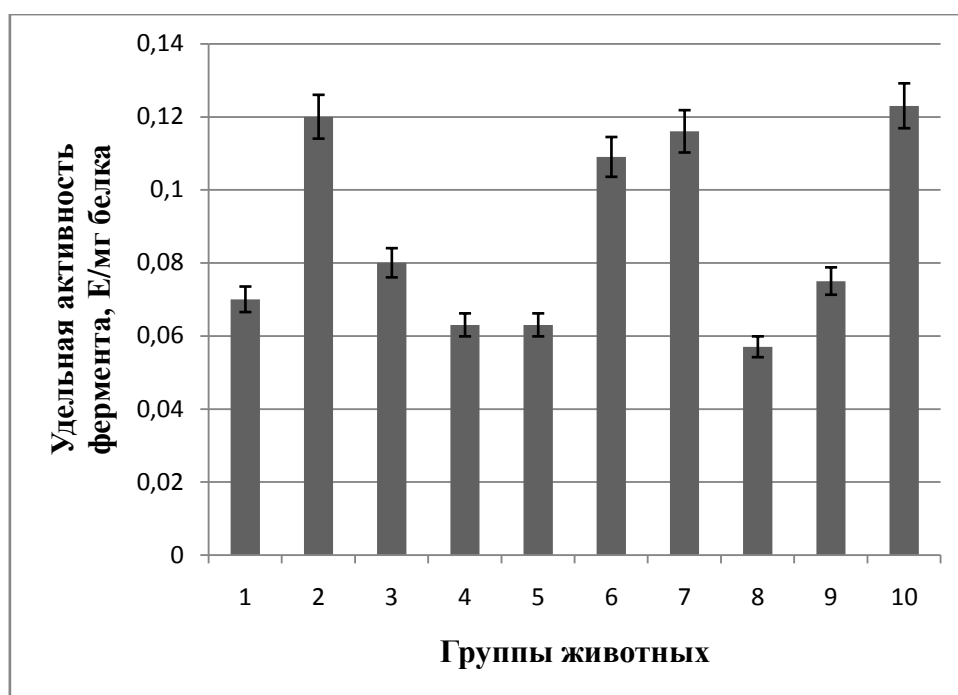


а

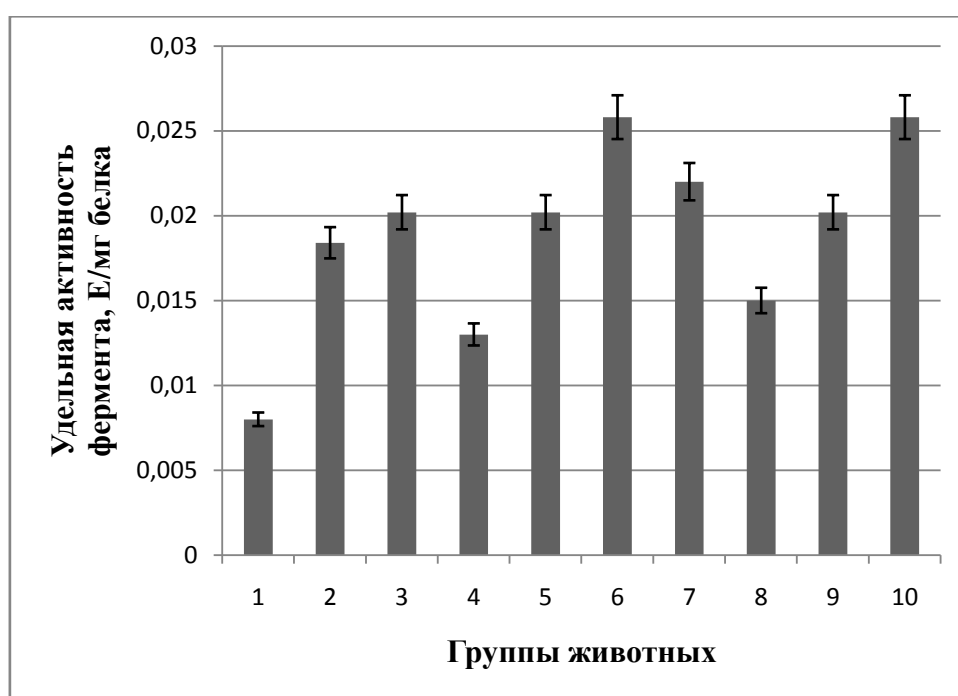


б

Рис. 1. Удельная активность СОД в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

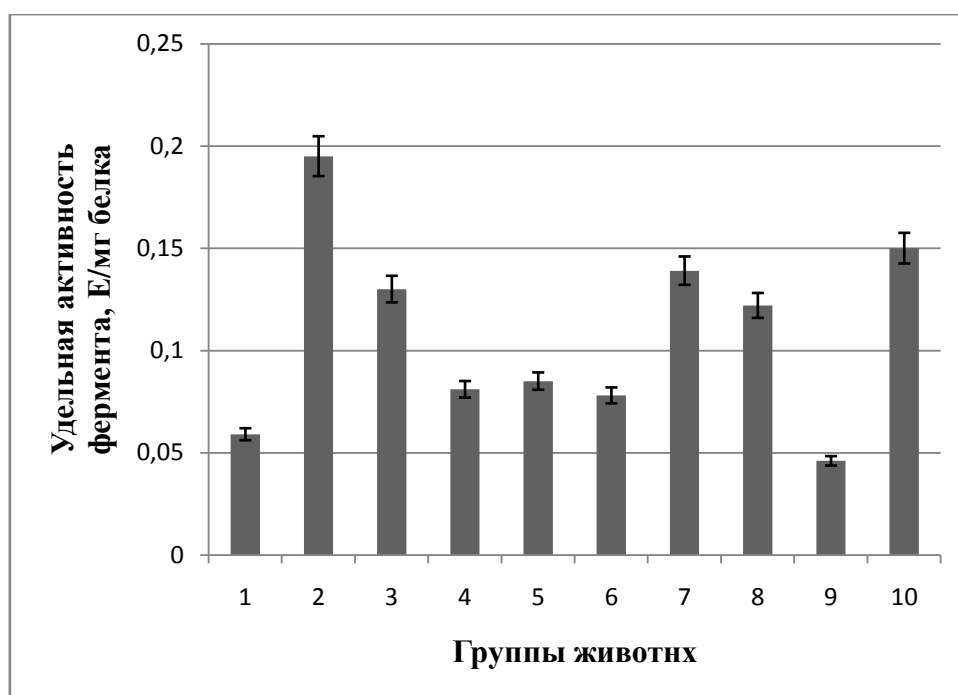


а

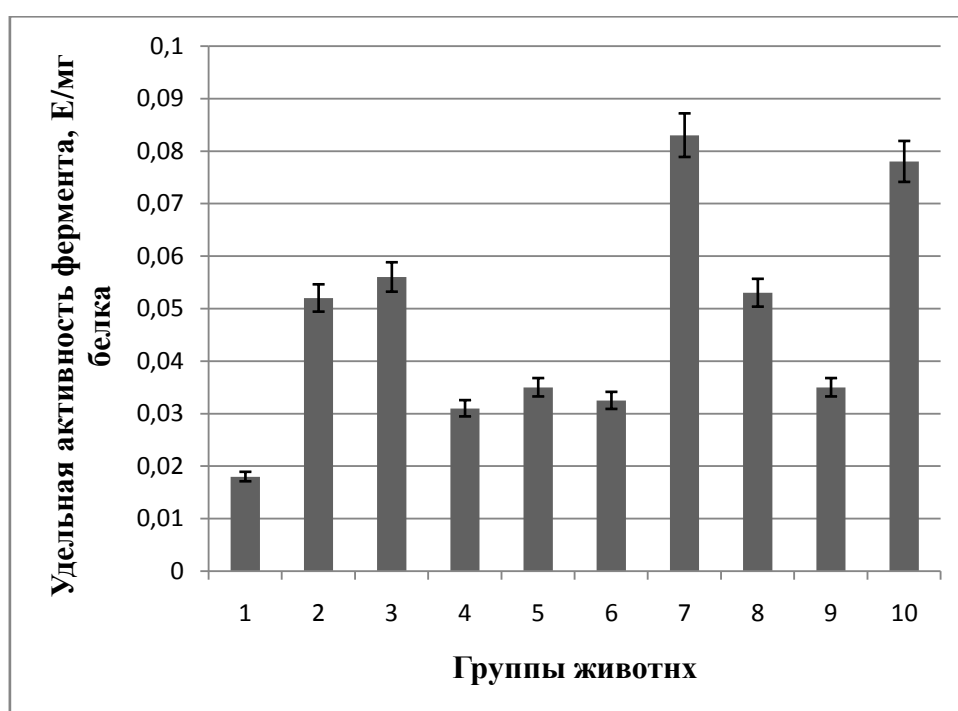


б

Рис. 2. Удельная активность каталазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

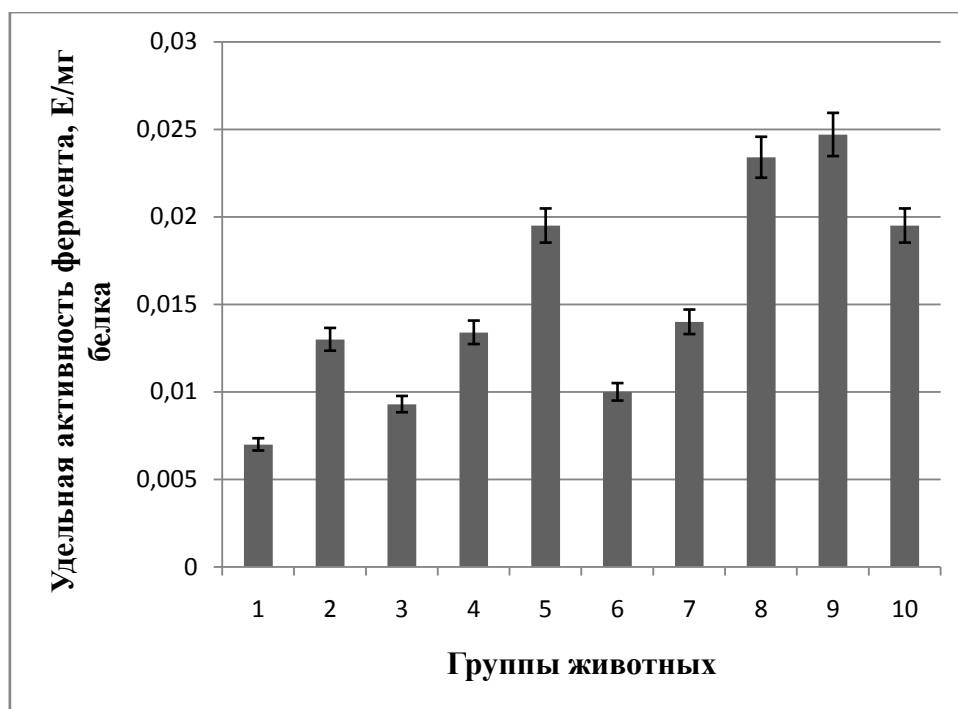


а

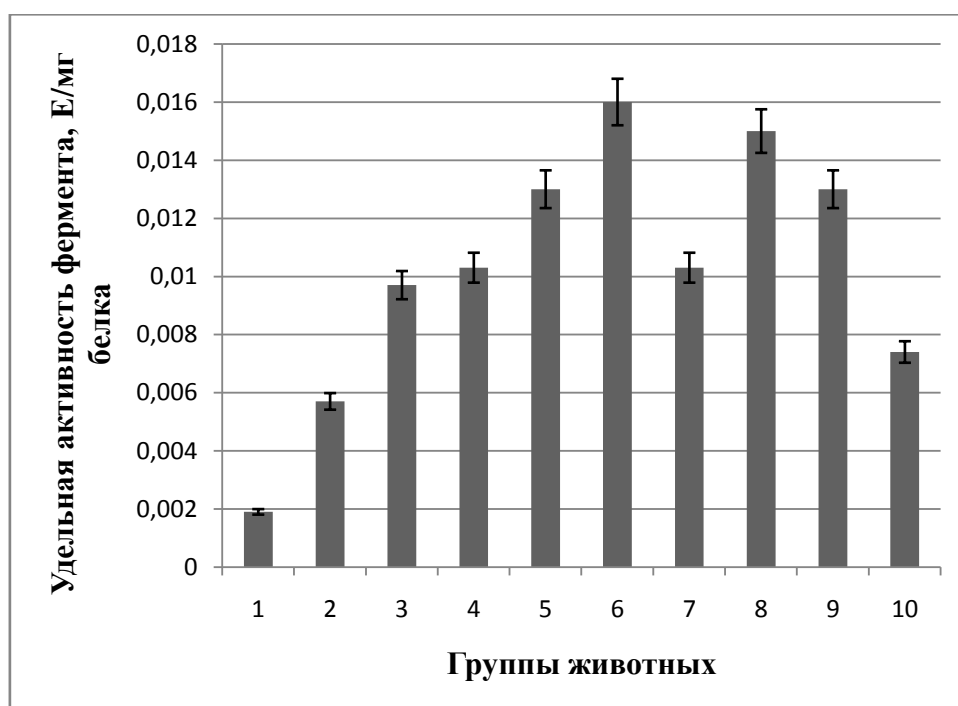


б

Рис. 3. Удельная активность глутатионпероксидазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

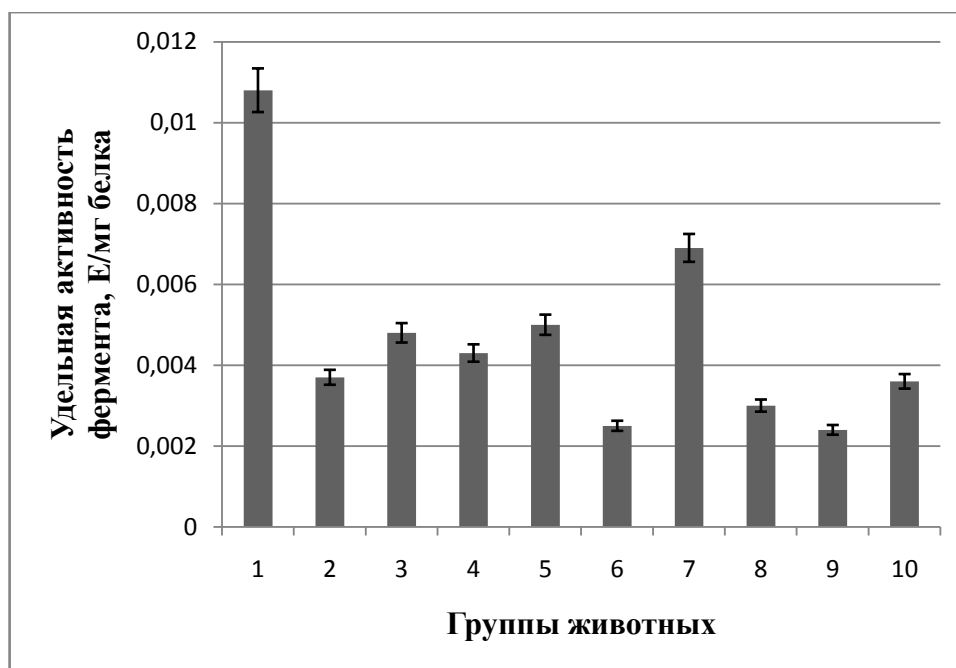


а

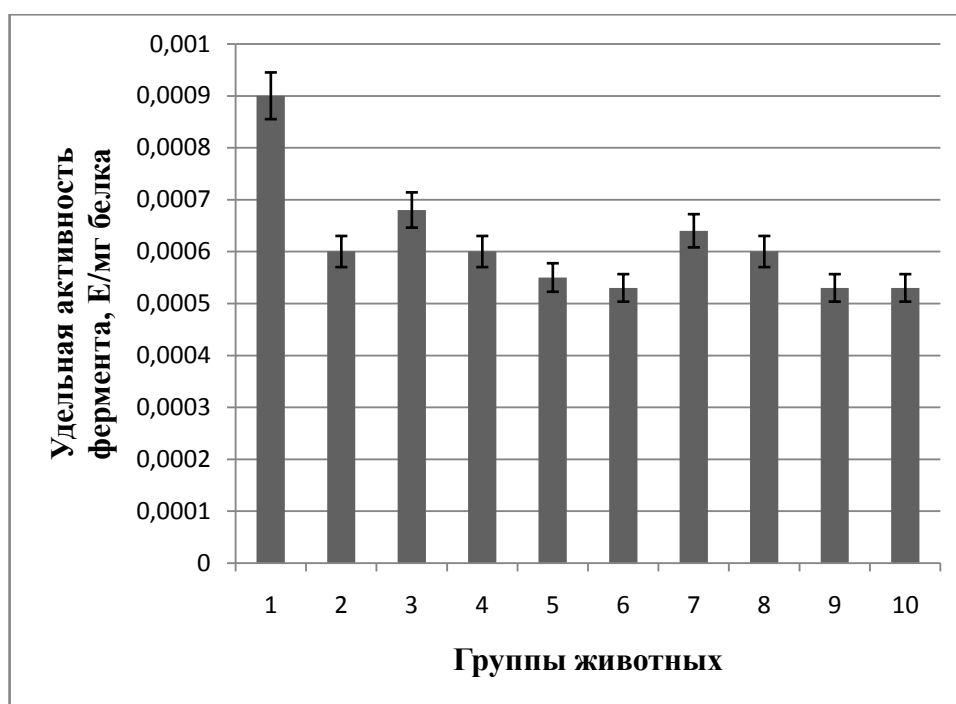


б

Рис. 4. Удельная активность глутатионредуктазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

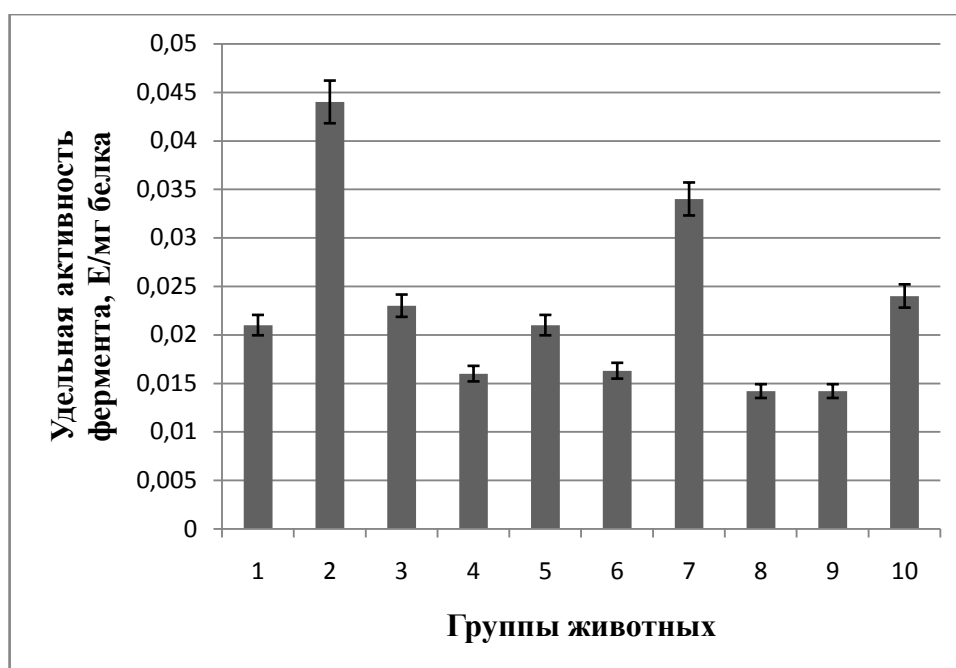


а

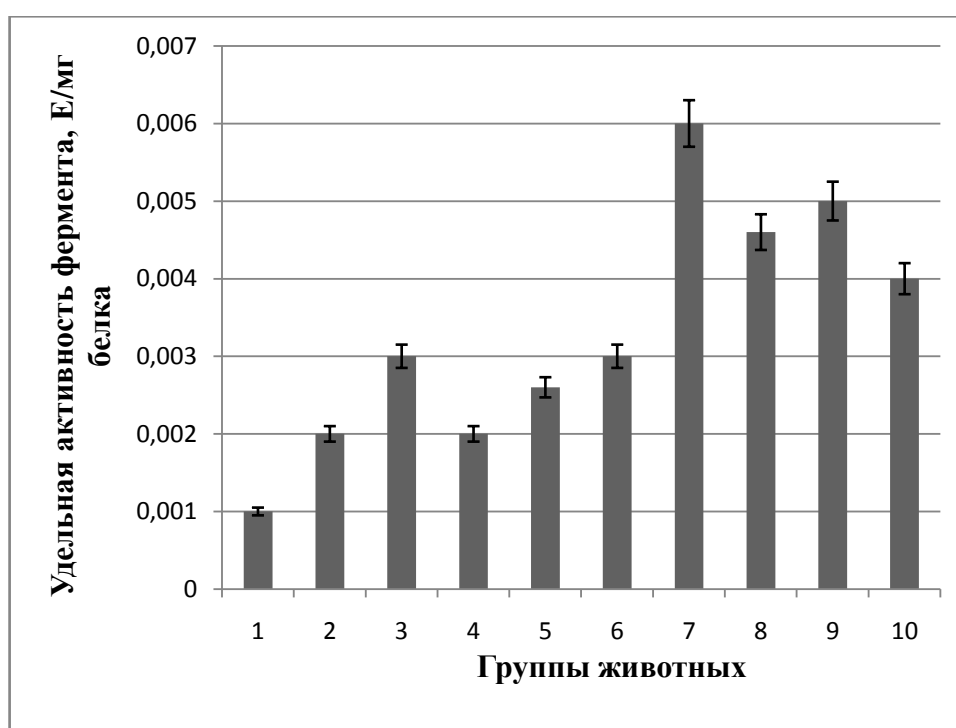


б

Рис. 5. Удельная активность глутатионтрансферазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

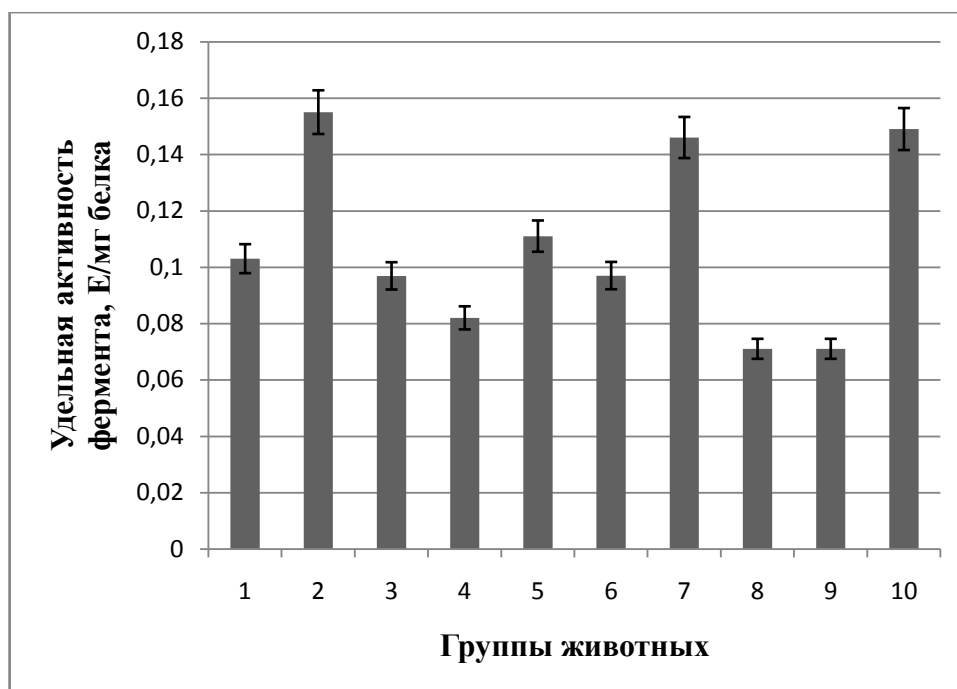


а

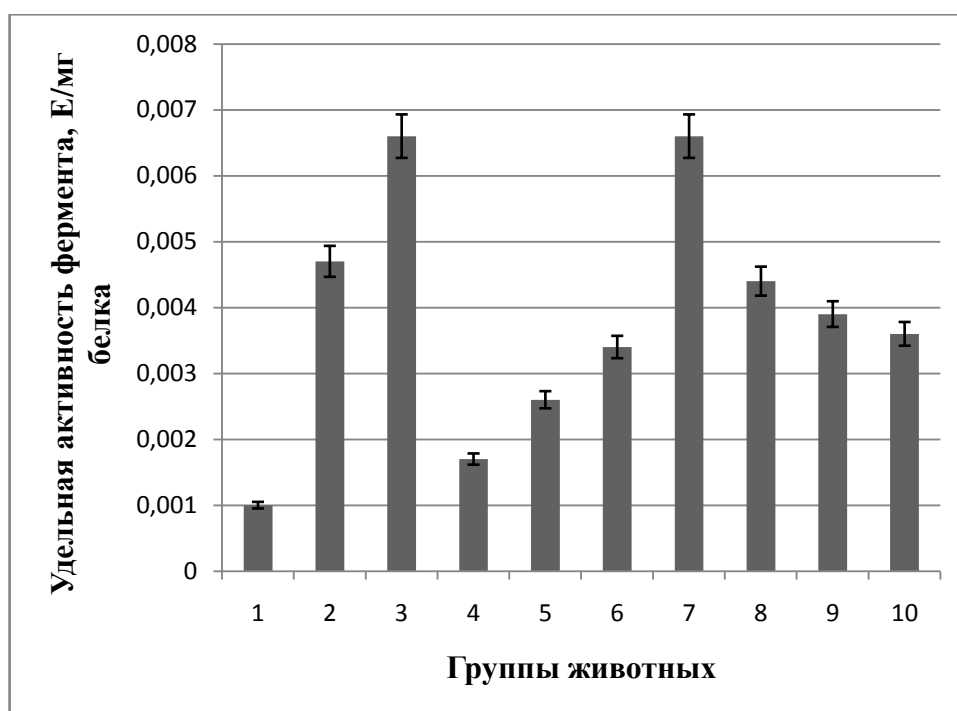


б

Рис. 6. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг(9) и 75 мг (10)

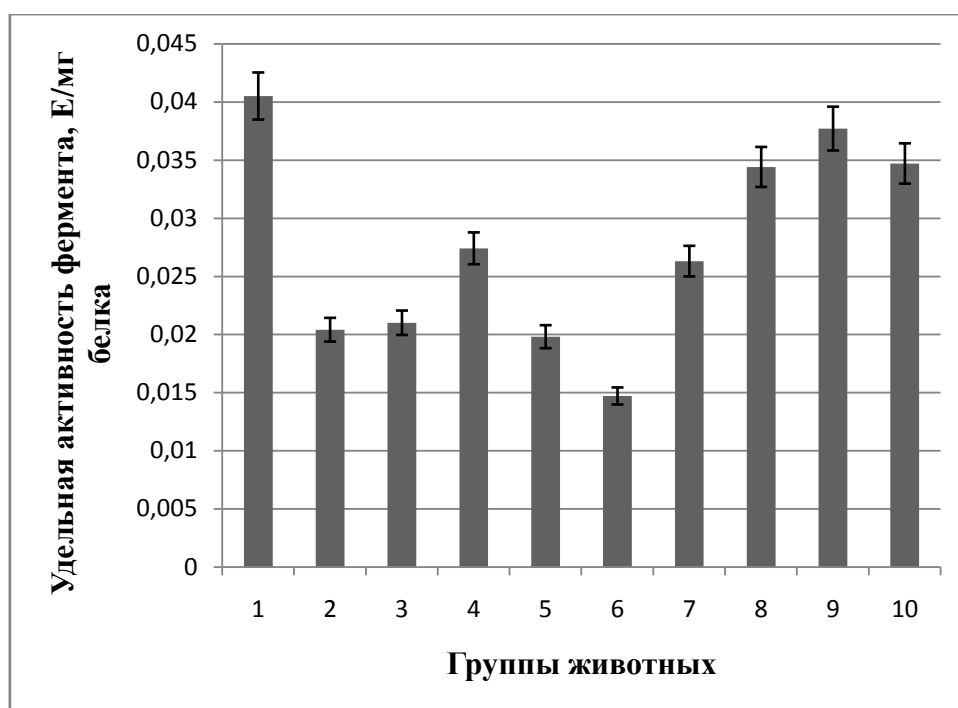


а

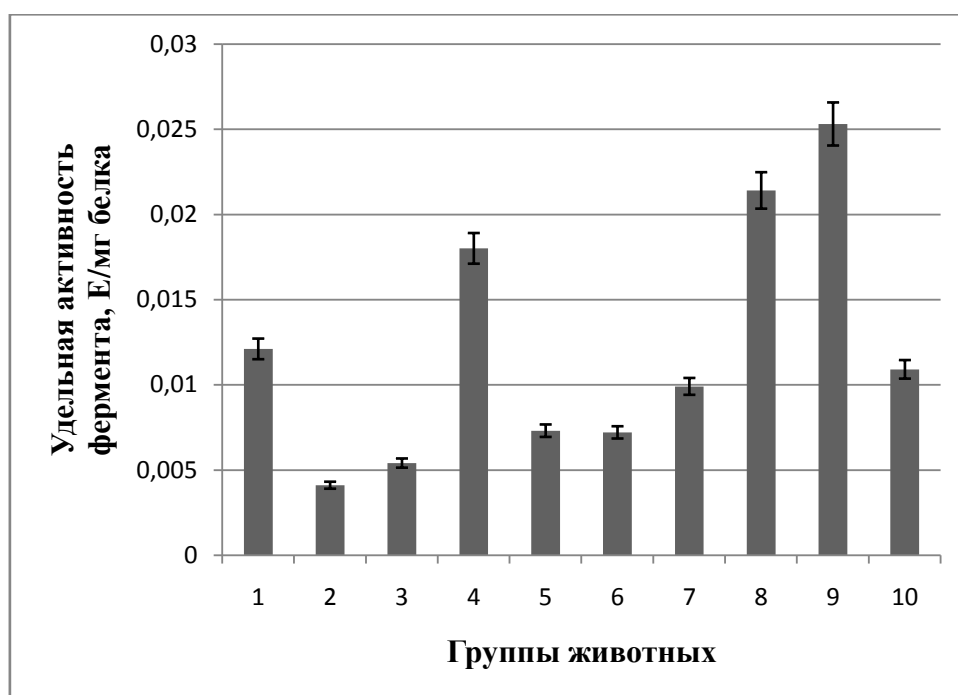


б

Рис. 7. Удельная активность NADPH-изоцитратдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

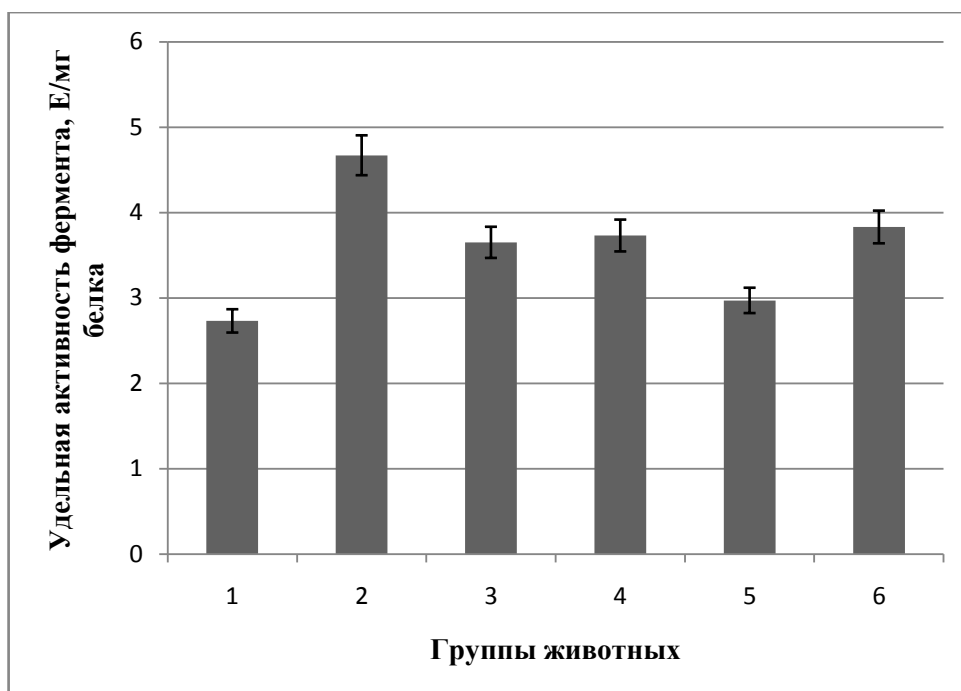


а

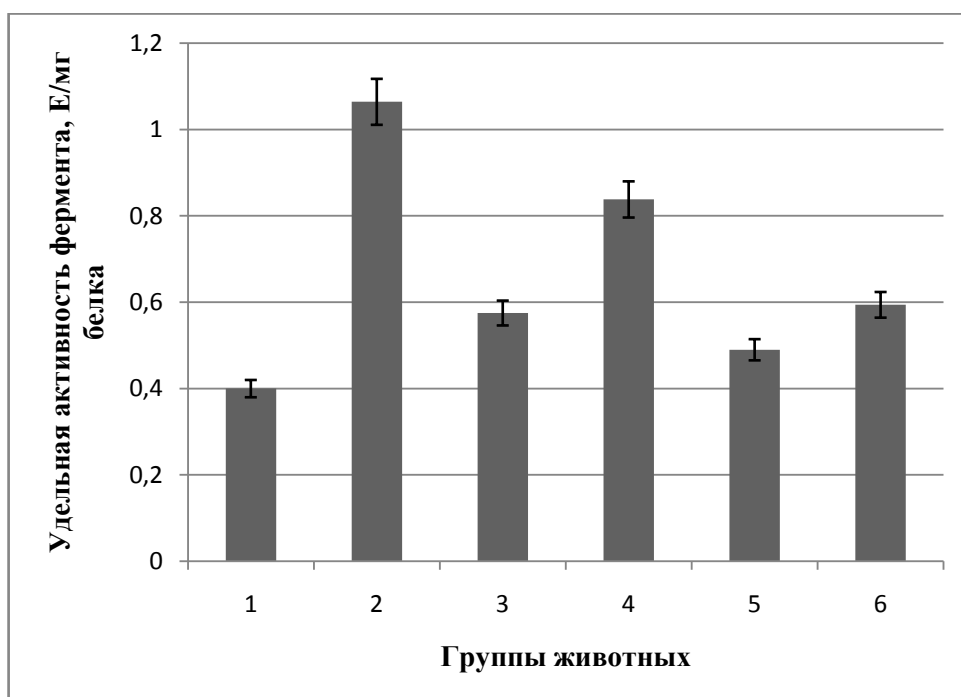


б

Рис. 8. Удельная активность аконитатгидратазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярных нарушениях, индуцированных введением адреналина (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 12,5 мг (3), 25 мг (4), 50 мг (5) и 75 мг (6) и 2,4-ДМФБ в дозах 12,5 мг (7), 25 мг (8), 50 мг (9) и 75 мг (10)

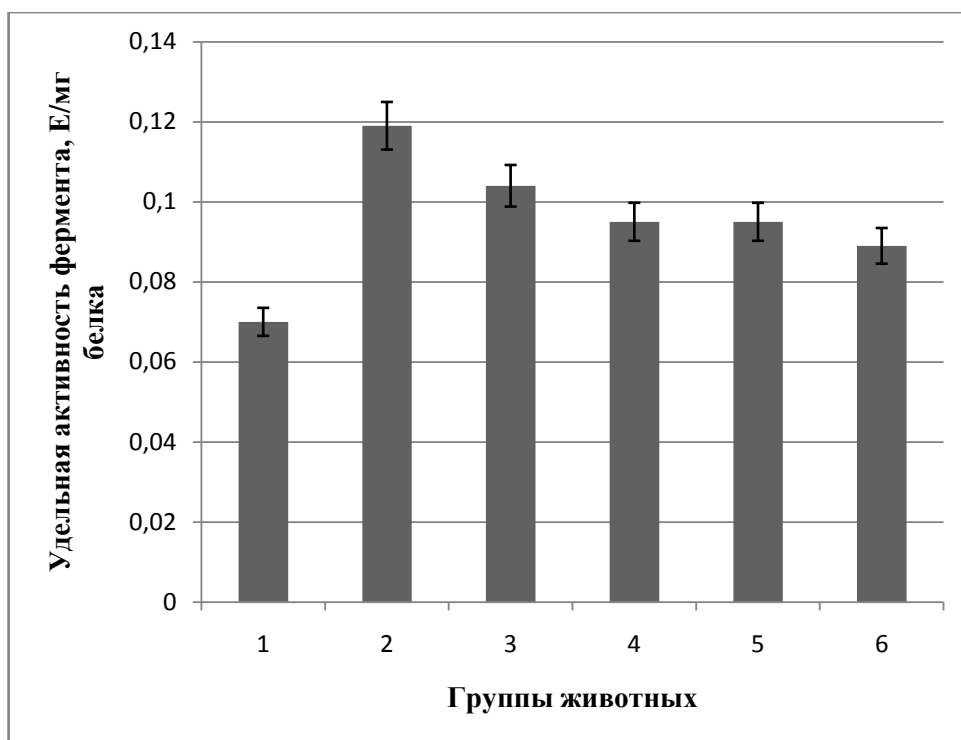


а

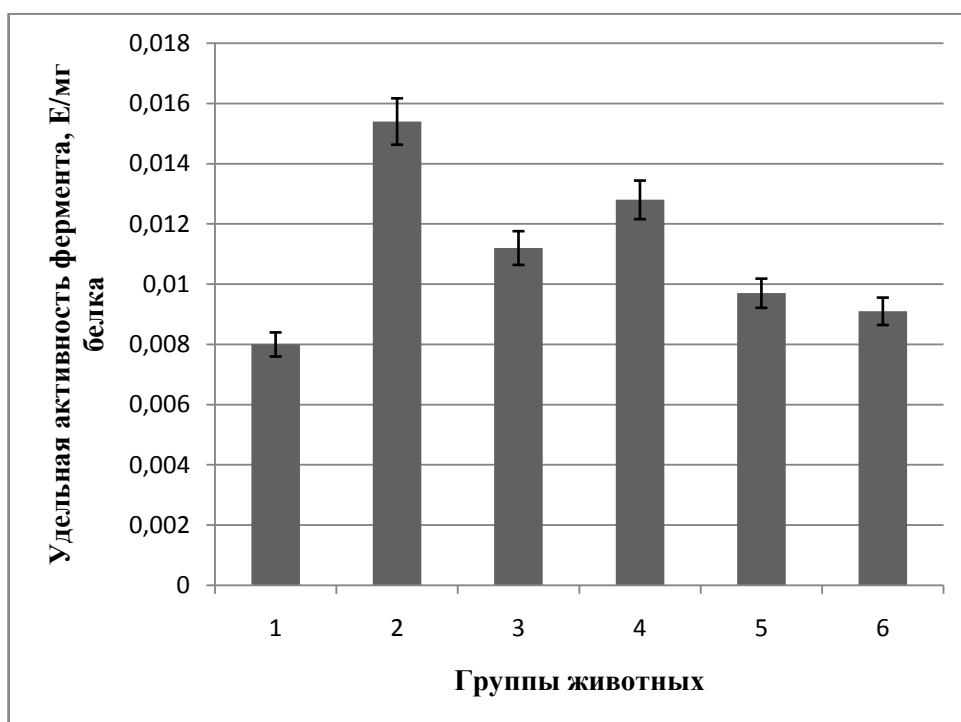


б

Рис. 9. Удельная активность супероксиддисмутазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

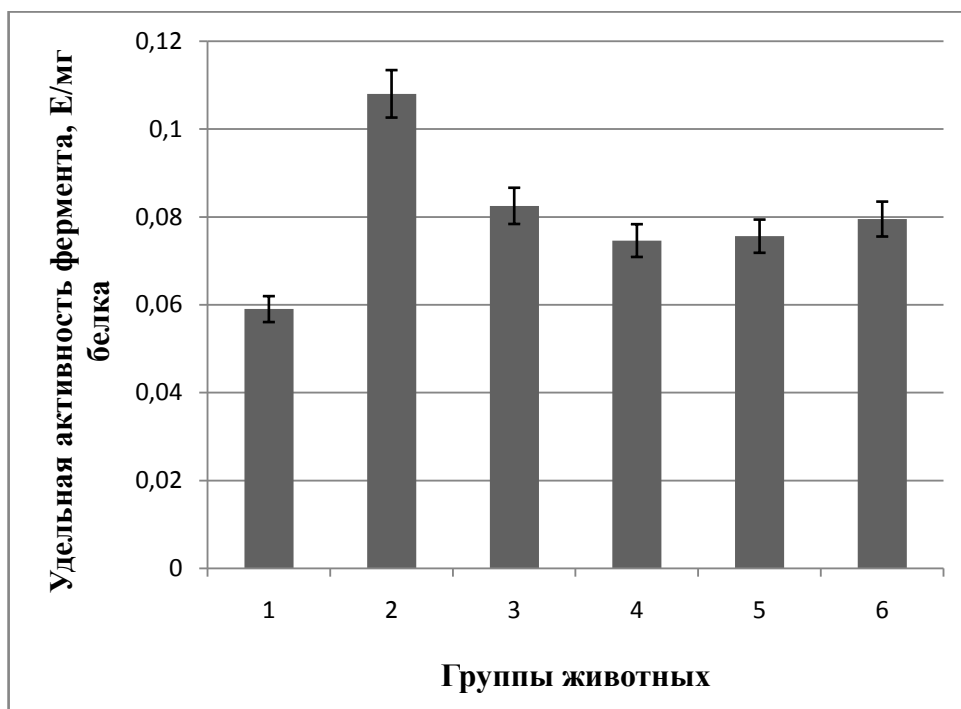


а

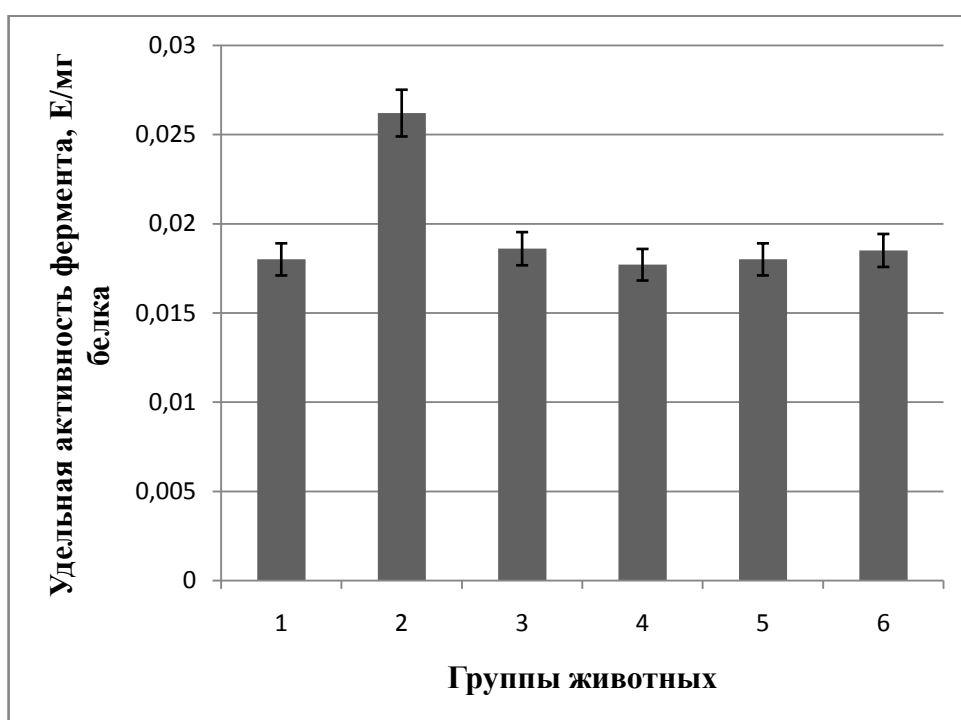


б

Рис. 10. Удельная активность каталазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

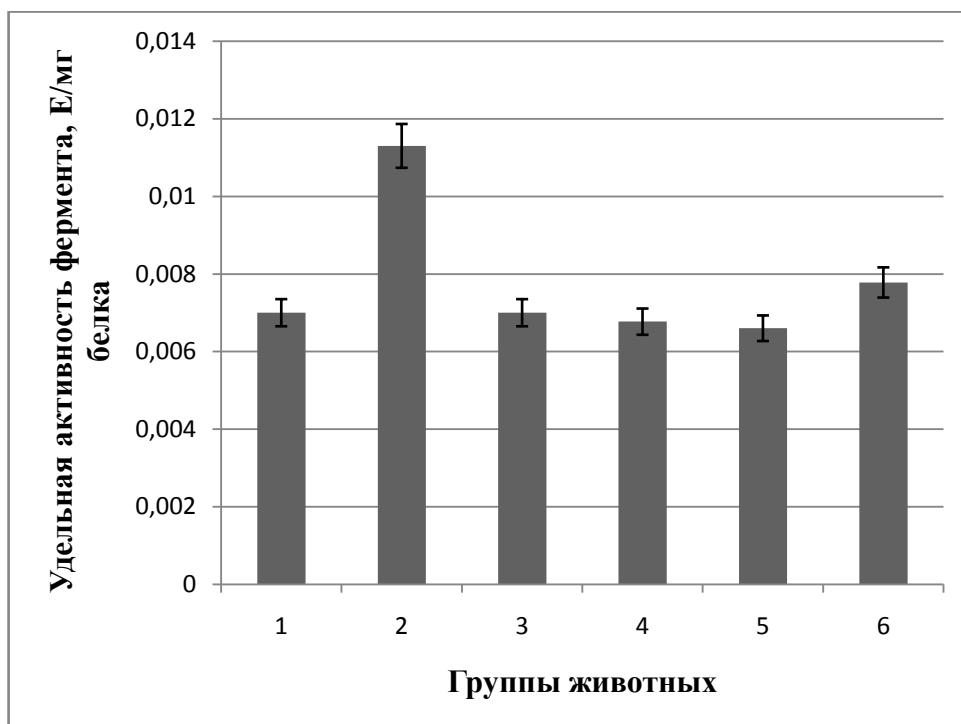


а

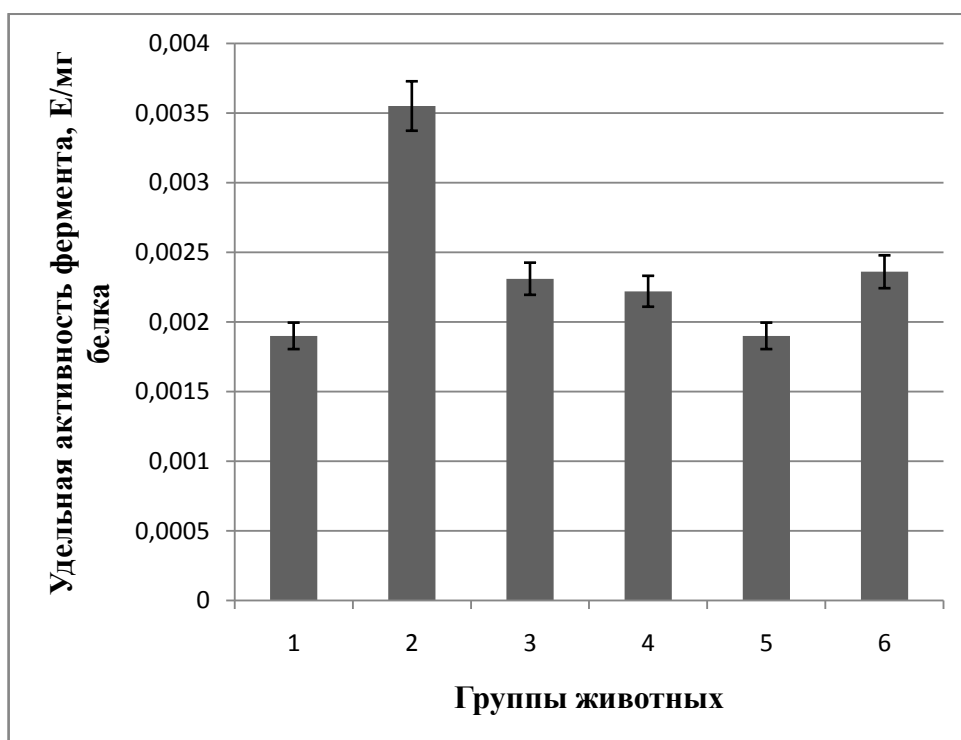


б

Рис. 11. Удельная активность глутатионпероксидазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при сердечно-сосудистой патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

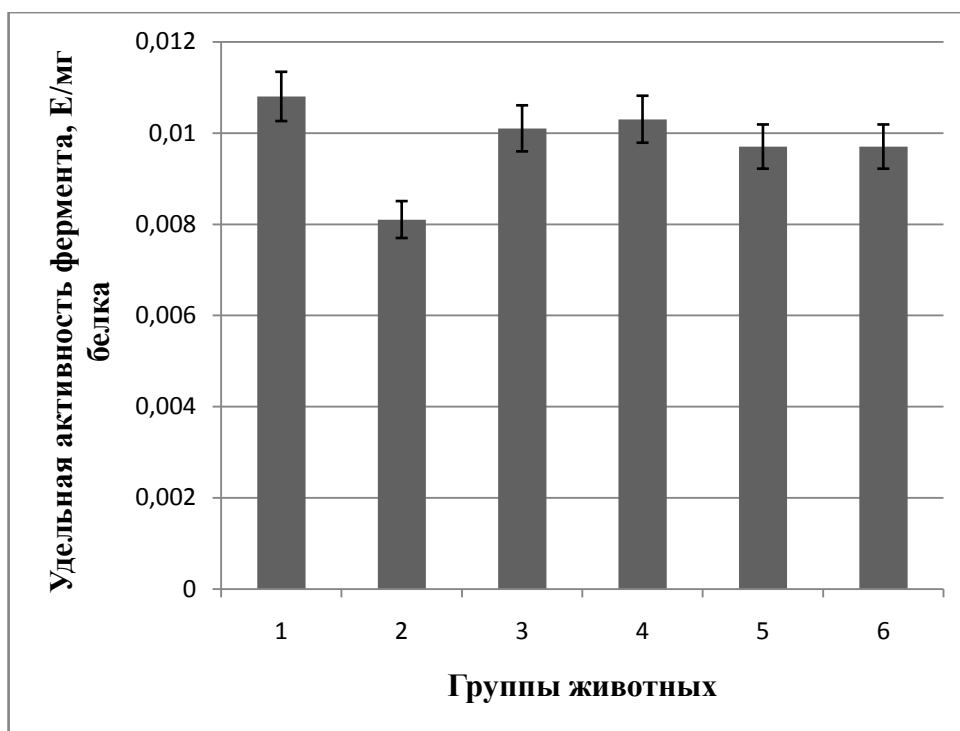


а

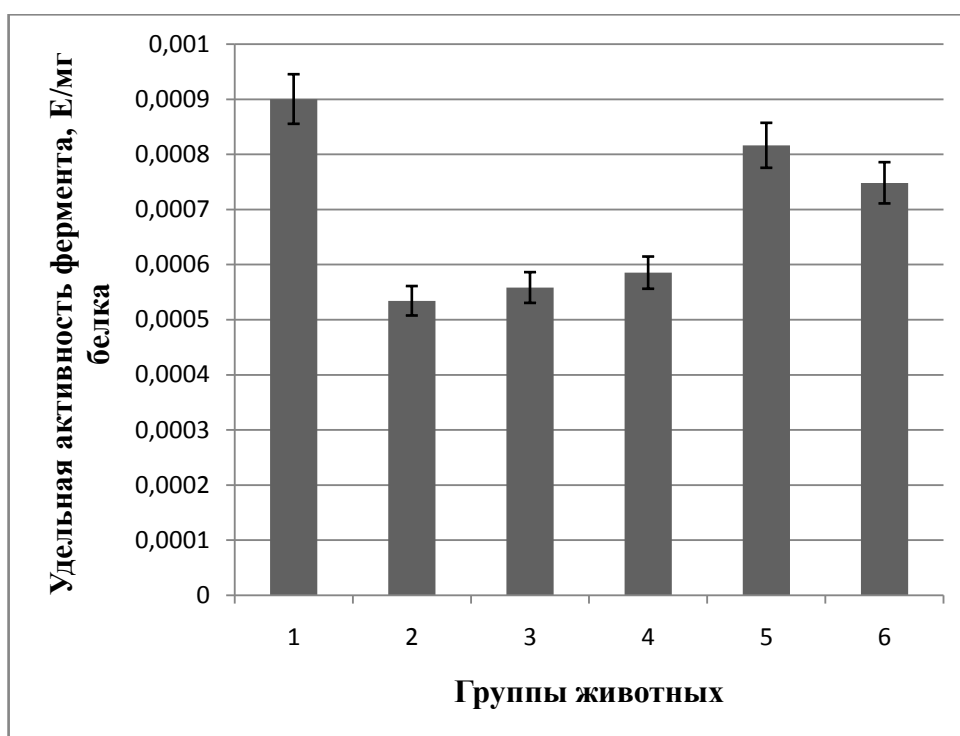


б

Рис. 12. Удельная активность глутатионредуктазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

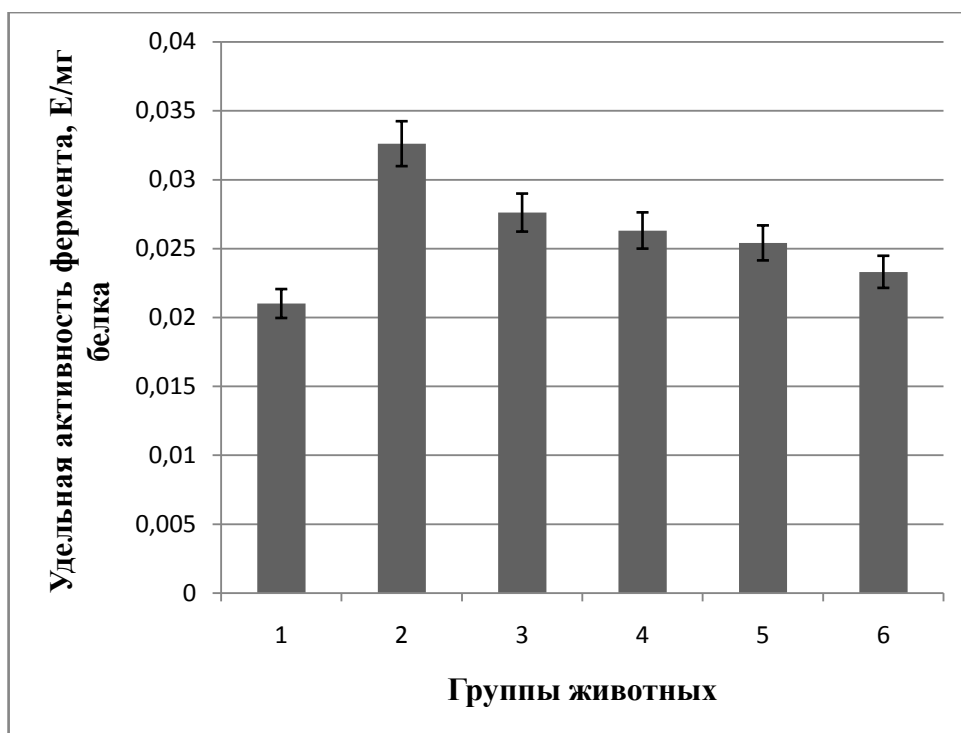


а

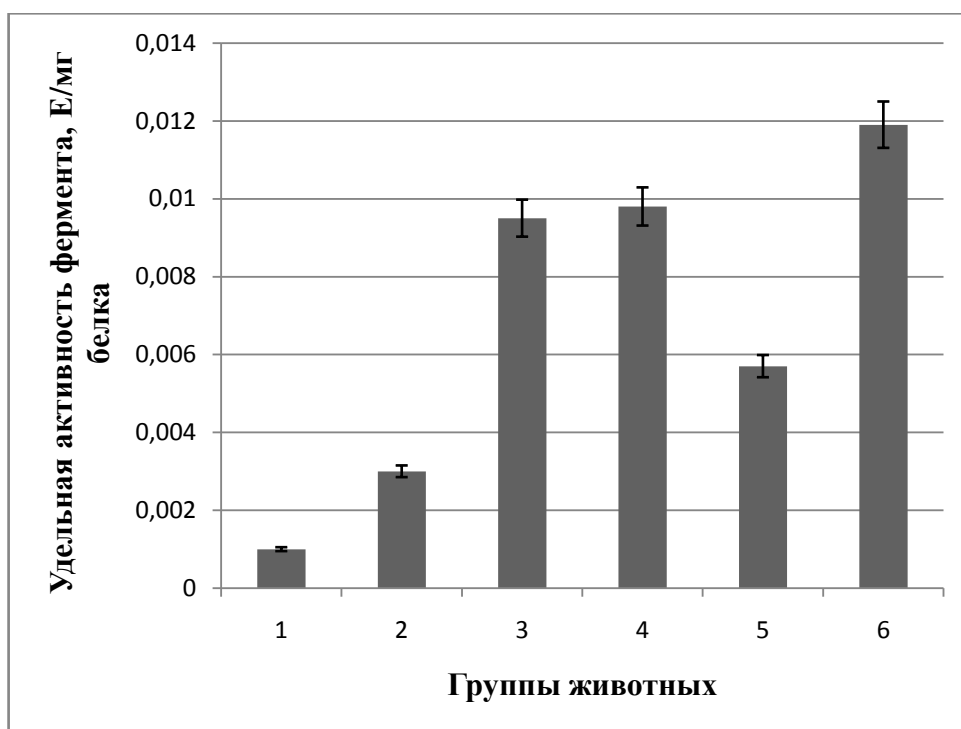


б

Рис. 13. Удельная активность глутатионтрансферазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

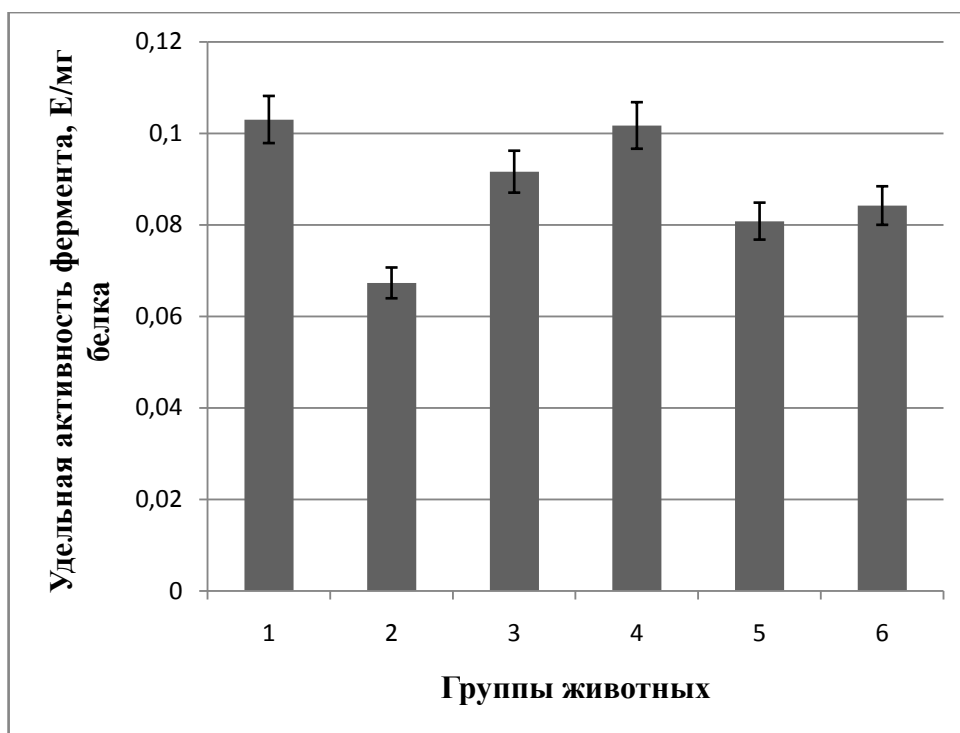


а

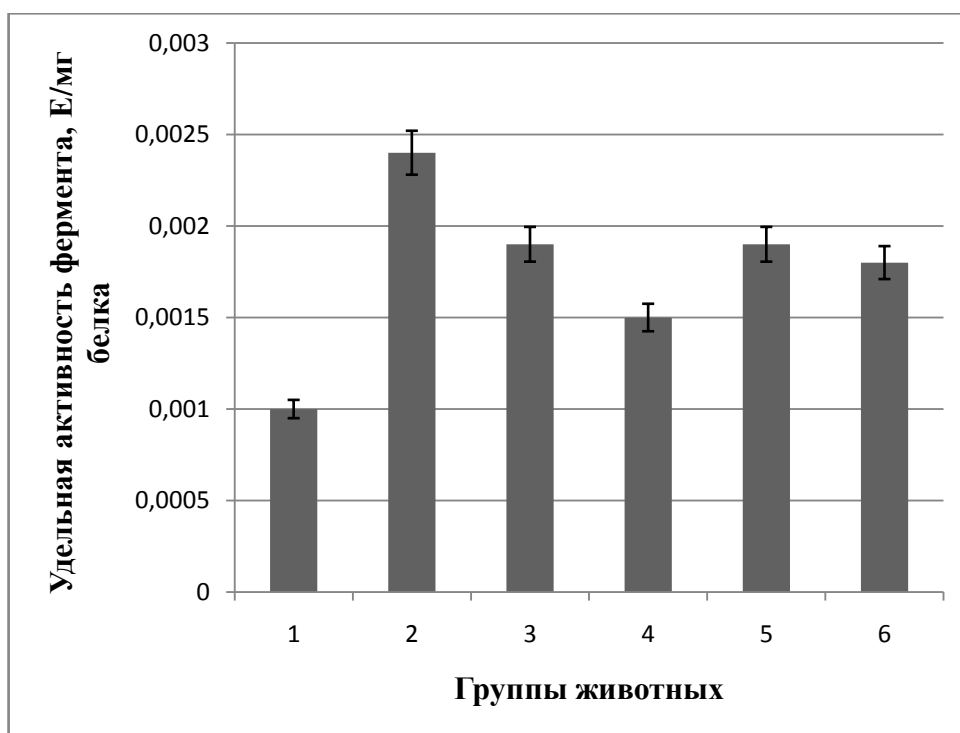


б

Рис. 14. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)

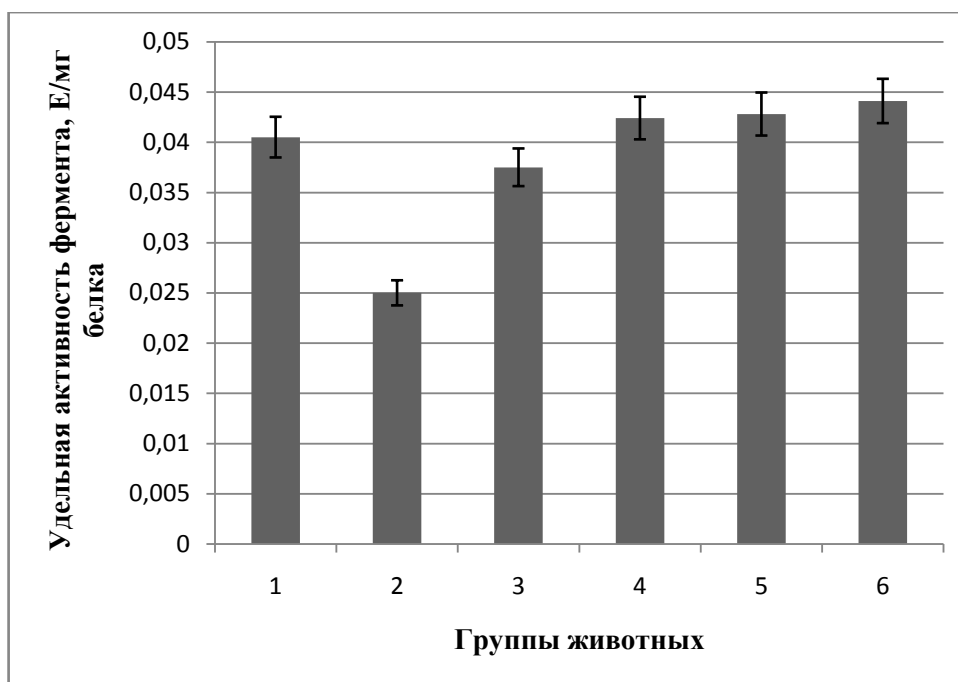


а

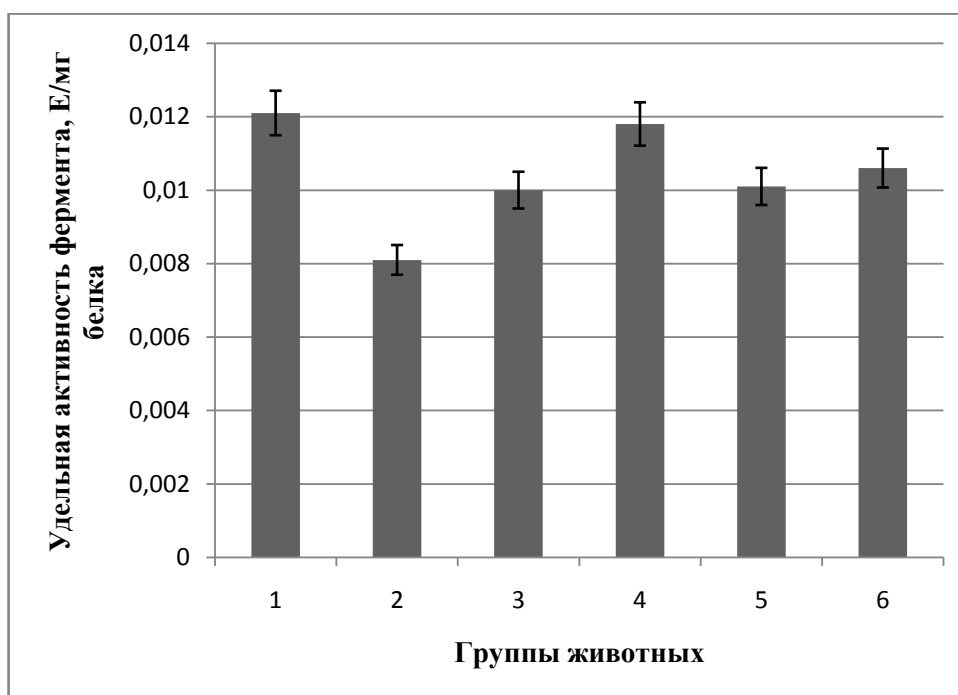


б

Рис. 15. Удельная активность NADP-изоцитратдегидрогеназы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, развивающейся на фоне РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)



а



б

Рис. 16. Удельная активность аконитатгидратазы в сердце (а) и сыворотке крови (б) животных контрольной группы (1), при кардиоваскулярной патологии, индуцированной развитием РА, (2) и при введении 3,5-ДКМФБ в дозах 25 мг (3) и 50 мг (4) и 2,4-ДМФБ в дозах 25 мг (5) и 50 мг (6)