

На правах рукописи



Крыльский Евгений Дмитриевич

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ
РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ВОЗДЕЙСТВИИ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ

Специальность 03.01.04. – Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
Попова Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: **Внуков Валерий Валентинович**
доктор биологических наук, профессор,
ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», кафедра биохимии и микробиологии, заведующий

Дерябина Юлия Ивановна
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник, ФГУ
«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория экологической и эволюционной биохимии, заведующий

Ведущая организация НИИ физико-химической биологии им.
А.Н. Белозерского Московского государственного университета

Защита диссертации состоится «08» ноября 2016 года в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского госуниверситета

Автореферат разослан «__» _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович М.Ю.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В настоящее время одной из актуальных проблем медицинской биохимии является исследование и коррекция молекулярных механизмов патогенеза ревматоидного артрита (РА) – системного аутоиммунного заболевания, характеризующегося преимущественным поражением суставов с развитием эрозивно-деструктивного полиартрита (Мазуров В.И., 2005). Частота встречаемости данного патологического состояния, согласно данным ВОЗ, составляет от 0,6 до 1,3%, что позволяет его отнести к одному из достаточно распространенных воспалительных заболеваний. РА является причиной ранней инвалидизации и существенного снижения качества жизни пациентов. Так, почти 50% больных становятся инвалидами в течение 5 лет заболевания, а 10% – в течение первых 2 лет болезни. Согласно данным проспективных исследований, при РА уменьшается продолжительность жизни в связи с поражением различных органов и систем (Scott D.L., 2000).

Значительный интерес в настоящее время вызывает изучение особенностей процессов свободнорадикального окисления (СО), протекающих при развитии РА. Некоторые данные свидетельствуют в пользу того, что в процессе патогенеза данного заболевания активизируется генерация активных форм кислорода (АФК) (Filippin L.I., 2008, Winyard P.G., 2005). Однако результаты, касающиеся исследований активности антиоксидантной системы организма (АОС), весьма противоречивы. Так, в некоторых работах было показано увеличение, а в других – уменьшение активности ряда антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (GPX), каталаза, в крови больных, страдающих РА. Кроме того, в некоторых исследованиях было выявлено разнонаправленное изменение активности СОД и каталазы у пациентов (Staroń A., 2012, Surapneni K.M., 2008, Vijayakumar D., 2006).

Известно, что АФК, образовавшиеся в процессе патогенеза РА, могут оказывать разрушающее влияние на биологические молекулы, такие как полисахариды, белки, ДНК, а также инициировать пероксидное окисление липидов (ПОЛ) (Тишенина Р.С., 2000). Результатом чрезмерной генерации АФК являются морфо-функциональные нарушения клеточных структур, деградация коллагена, повреждение соединительной ткани. Повреждающему эффекту свободных радикалов противодействует АОС.

Высокую актуальность на данный момент имеют исследования, направленные на поиск потенциальных веществ – протекторов, обладающих антиоксидантными свойствами. В качестве такого соединения может выступать тиоктовая кислота (ТК) – биологически активное вещество, участвующее в регуляции обмена липидов, углеводов, холестерина, а также выступающее в роли кофактора при окислительном декарбоксилировании пирувата и 2-оксоглутарата. В большинстве тканей ТК способна быстро превращаться в восстановленную форму – дигидролипоевую кислоту (ДГЛК), которая выполняет множество биологических функций, являясь мощным антиоксидантом, хелатором ионов металлов переменной валентности,

скавенджером АФК, восстановителем окисленных форм других антиоксидантов (Flora S.J.S., 2009, Gomes M.B., 2014, Liang J.F., 2000, Suntres Z.E., 2003).

Таким образом, в связи с тяжестью протекания и широкой распространенностью РА актуальной задачей представляется анализ возможности применения препаратов на основе ТК в разработке новых лекарственных средств, применяемых при терапии данного заболевания.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование свободнорадикального гомеостаза при РА и воздействии ТК на фоне патологии в эксперименте на животных.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Анализ динамики развития РА на основе маркерных показателей и некоторых параметров окислительно-восстановительного гомеостаза.
2. Оценка воздействия ТК на маркерные показатели развития РА в крови лабораторных животных.
3. Исследование влияния ТК на интенсивность процессов СО, степень фрагментации ДНК и активность каспаз в тканях крыс при РА.
4. Изучение воздействия ТК на активность СОД и каталазы у крыс с индуцированным РА.
5. Анализ активности глутатионовой АОС, включающей GPX, глутатионредуктазу (GSR), глутатионтрансферазу (GST) и восстановленный глутатион (GSH), в условиях развития РА и введения ТК.
6. Оценка уровня транскриптов генов ферментов: СОД, каталазы, GPX и GSR, в тканях крыс при РА и введении ТК.
7. Исследование активности НАДФН-генерирующих ферментов – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ), при развитии РА и воздействии ТК.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование интенсивности протекания СО, апоптотических процессов, активности ферментативного звена (СОД, каталаза, GPX, GSR, GST) и содержания ферментативных (GSH, цитрат) компонентов АОС, уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов, активности некоторых ферментов окислительного метаболизма (Г6ФДГ, НАДФ-ИДГ, аконитатгидратаза (АГ)), при развитии РА и воздействии ТК в эксперименте на животных. Показано, что введение протектора приводило к снижению интенсивности СО и нормализации функционирования антиоксидантных ферментов, выражавшейся изменением показателей их активности и уровня транскриптов генов в сторону контрольных значений. Исследовано воздействие ТК на работу некоторых НАДФН-генерирующих ферментов, поставляющих восстановительные потенциалы для глутатионовой АОС. Предложена гипотетическая схема, отражающая роль ТК в регуляции свободнорадикального гомеостаза при развитии РА.

Практическая значимость. Результаты проведенного исследования могут выступать в качестве основы для разработки новых способов метаболической коррекции состояния окислительного стресса (ОС), развивающегося при РА. Кроме этого, полученные в ходе работы данные способствуют углублению фундаментальных представлений о путях реализации протекторного и антиоксидантного действия ТК, а также пониманию

механизмов, лежащих в основе нарушений метаболизма при развитии данного заболевания.

Материалы исследования применяются в учебной работе на медико-биологическом факультете Воронежского государственного университета при чтении курсов «Медико-биологические аспекты социально-значимых патологий», «Свободнорадикальные процессы в биосистемах», «Патобиохимия», «Молекулярные механизмы адаптации к стрессовым факторам», «Физико-химические основы патологических процессов». Кроме этого, полученные результаты используются при проведении практикумов, выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ студентами Воронежского государственного университета.

Апробация работы. Основные результаты, полученные в ходе выполнения исследования, представлены на III Международной научно-практической конференции «Тенденции и инновации современной науки» (Краснодар, 2012), IX международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» (Томск, 2012), II Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни» (Воронеж, 2013), 5 международной научно-практической конференции «Современная наука: тенденции развития» (Краснодар, 2013), 10 международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы науки» (Москва, 2013), 5 международной научно-методической конференции «Создание новых физиологически активных веществ» (Воронеж, 2013), международной научно-практической конференции «Векторы развития современной науки» (Уфа, 2014), XII Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы науки» (Москва, 2014).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 14 публикациях, из них 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ и включенных в системы Web of Science и Scopus.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Реализация протекторных свойств тиоктовой кислоты при ревматоидном артрите сопровождается изменением маркерных показателей патологии, параметров интенсивности свободнорадикального окисления и активности апоптотических процессов в направлении контрольных значений.

2. Установлено корригирующее действие тиоктовой кислоты на основные компоненты антиоксидантной системы, мобилизованные в условиях окислительного стресса, развивающегося на фоне ревматоидного артрита.

3. Под воздействием тиоктовой кислоты происходило уменьшение уровней транскриптов генов ферментов антиоксидантной системы, возростающих в условиях развития ревматоидного артрита.

4. Воздействие тиоктовой кислоты приводило к нормализации активности ряда ферментов окислительного метаболизма, изменяющейся при развитии ревматоидного артрита.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 216 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части,

обсуждения результатов (3 главы), заключения, выводов, списка литературы (420 источников). Иллюстративный материал включает 9 таблиц, 1 схему и 37 рисунка, а также 10 рисунков в Приложении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и материалы исследования: Для проведения исследований использовали гомогенат сердца, печени и мышц, а также сыворотку крови белых лабораторных крыс-самцов массой 150-200 г. Животные в ходе работы были разделены на пять экспериментальных групп: крысы 1-ой группы (n=24) содержались на стандартном режиме вивария; животным 2-ой группы (n=32) индуцировали РА; 3-я группа (n=8) – животные, которым с 7 дня развития РА внутрибрюшинно вводили ТК (Sigma-Aldrich, США) в 0,9% хлориде натрия, в дозе 16 мг/кг каждые 24 часа в течение последующих 8 дней; в 4-й (n=12) и 5-й (n=10) группах крысам после индуцирования патологии вводили внутрибрюшинно ТК в дозе 35 и 70 мг/кг веса животного по вышеуказанной схеме. РА вызывали путём подкожного введения в подушечку лапки полного адьюванта Фрейнда – комплекса соединений, вызывающего развитие данной патологии, в объёме 100 мкл (Yamagishi Y., 2012). На 15 день после начала эксперимента у животных забирали материал для проведения исследований.

Подготовка материала для исследования. Для извлечения печени после вскрытия брюшной полости её промывали через портальную вену ледяным изотоническим раствором. После этого органы забирали и гомогенизировали с помощью гомогенизатора Daihan HG-15A в 4х-кратном объеме охлаждённой среды выделения следующего состава: 50 ммоль/л трис-HCl-буфер, pH 7,6, 10 ммоль/л ЭДТА, 0,5 ммоль/л β-меркаптоэтанол.

Сердце извлекали у животных после многократного промывания ледяным физиологическим раствором, после чего осушали фильтровальной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в 3х-кратном объеме охлаждённой среды выделения.

Участок икроножной мышцы извлекали у животных и помещали в ледяной физиологический раствор. После этого ткань осушали фильтрованной бумагой, взвешивали и гомогенизировали в 5-кратном объеме охлаждённой среды выделения.

Полученную вытяжку после гомогенизации тканей фильтровали через слой капрона с квадратными ячейками (0,1 мм) и центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин с целью осаждения неразрушенных тканевых элементов. Супернатант использовали в дальнейших исследованиях.

Венозную кровь набирали из сердца животных в чистую стеклянную пробирку без антикоагулянта и помещали на 0,5 часа в термостат при температуре 37 °С, после расслаивания фаз собирали супернатант и центрифугировали его при 4000g в течение 10 мин. Полученную сыворотку использовали для дальнейшего исследования.

Развитие РА оценивали с помощью следующих показателей: анализ содержания ревматоидного фактора (РФ) в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом (Вершинин В.И., 2011), измерение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) крови крыс по методу Панченкова (Луговская С.А., 2006), определение содержания циркулирующих иммунных комплексов

(ЦИК) в сыворотке крови животных методом преципитации с полиэтиленгликолем молекулярной массы 6000, оценка содержания иммуноглобулинов (Ig) классов А, М и G в сыворотке крови животных с помощью иммуноферментного анализа, измерение толщины лапок крыс в области воспаления штангенциркулем.

Определение интенсивности СО. Интенсивность СО оценивали с помощью метода железоиндуцированной биохемиллюминесценции с использованием биохемиллюминометра 07М с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемиллюминесценции регистрировали в течение 30 секунд и анализировали такие параметры, как интенсивность вспышки (I_{max}), светосумму (S), и величину тангенса угла наклона касательной к нисходящей ветви кривой ($tg\alpha_2$). Концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) определяли спектрофотометрически при длине волны 233 нм.

Оценку степени развития апоптотических процессов осуществляли на основе анализа степени фрагментации ДНК и активности каспазы-3 и каспазы-8. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия). Степень фрагментации ДНК определяли методом агарозного гель-электрофореза с окрашиванием бромистым этидием. Определение активности каспаз проводили с помощью набора реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США).

Определение активности ферментов. Активность ферментов исследовали на спектрофотометре Hitachi U – 1900. О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм. Скорость реакций, катализируемых Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, оценивали по возрастанию оптической плотности за счет восстановления НАДФ. Скорость протекания GSR-реакции анализировали по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДФН. О скорости GPX-реакции судили по снижению оптической плотности при окислении НАДФН, происходящем в процессе восстановления под действием GSR окисленного глутатиона – продукта GPX-реакции. Анализ активности GST осуществляли по увеличению оптической плотности при 340 нм в результате превращения 1-хлор, 2,4-динитробензола в глутатион-2,4-динитробензол. Активность АГ определяли по увеличению оптической плотности при 233 нм, сопряженному с образованием двойной связи в молекуле цис-аконитата. Активность каталазы определяли методом, основанном на способности H_2O_2 и молибдата аммония образовывать стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при 410 нм. Активность ферментов в тканях крыс выражали в Е на грамм сырой массы, Е на мл сыворотки и в виде удельной активности. За единицу ферментативной активности (Е) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Активность СОД оценивали по ингибированию скорости восстановления тетразолия нитросинего в неэнзиматической системе феназинметасульфата и НАДН при 540 нм (Матюшин Б.Н., 1991). Содержание общего белка определяли унифицированным биуретовым методом.

Измерение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов.

Уровень транскриптов генов антиоксидантных ферментов оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Выделение суммарной клеточной РНК производили с использованием набора «РНК-Экстран» (Синтол, Россия). Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК использовали рекомбинантную обратную транскриптазу вируса мышинного лейкоза Молони – M-MuLV. Для амплификации интересующих участков генов был разработан комплект генспецифических праймеров, с использованием программного обеспечения «Genamics Expression». Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Россия). Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR GreenI использовали набор реактивов фирмы «Синтол» (Россия). Исследование проводили на приборе АНК – 32 по следующей схеме: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, состоящих из этапов денатурации (95°C – 15 секунд), отжига праймеров (60°C – 15 секунд) и элонгации (72°C – 30 секунд). Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода (Livak K.J., 2001).

Анализ содержания низкомолекулярных антиоксидантов.

Концентрацию GSH определяли методом, основанном на способности сульфгидрильной группы GSH вступать в реакцию с 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана), с образованием в эквимольных количествах тионитрофенильного аниона, имеющего желтую окраску и максимум поглощения при 412 нм (Брусков В.И., 2001). Концентрацию цитрата оценивали по методу Нательсона при длине волны 430 нм (Афанасьев В.Г., 1973).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Опыты проводили в 8-32-кратных биологических повторностях. Аналитические повторы были проведены дважды для каждой пробы. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариант нормальному распределению использовали критерий Колмогорова - Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с использованием показателей описательной статистики.

Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. В таблицах и на рисунках представлены данные как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Результаты эксперимента анализировали с использованием t-критерия Стьюдента с расчетом среднего значения, стандартного отклонения. Достоверно различающимися считали значения, для которых $p < 0,5$ (Ллойд Э., 1990).

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА И ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ИНДУКЦИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

На первой стадии исследования осуществлялся подбор длительности эксперимента, обеспечивающей наиболее активное протекание патологического процесса на момент извлечения материала у лабораторных животных для

проведения эксперимента. Из литературных данных известно, что при создании модели адьювантного артрита патологический процесс достигает пика своего развития ориентировочно на 15-17 сутки после введения полного адьюванта Фрейнда в подушечку лапки крыс. Таким образом, животные выводились из эксперимента на 13, 15 и 17 день после индукции РА (Wang D., 2011), а также на 6 день, соответствующий развитию максимальной припухлости конечности животного.

Исходя из полученных в ходе работы данных, содержание РФ и СОЭ максимально увеличивалось на 15 день эксперимента – в 1,5 и 3,0 раза соответственно. Вместе с тем, разница между толщиной нормальной и опухшей лапок крыс на 6 день исследования составила $1,4 \pm 0,1$ мм, в то время как на 15 день данный показатель снижался до $0,7 \pm 0,1$ мм, что может быть связано с активацией компенсаторных механизмов в ответ на развитие патологии.

Динамику изменения интенсивности СО в тканях крыс исследовали на основании параметров биохемилюминесценции, содержания ДК – первичных продуктов ПОЛ, и активности АГ – фермента, представляющего собой критическую мишень действия АФК благодаря наличию в структуре чувствительного железо-серного кластера. Исходя из полученных данных, показатели биохемилюминесценции у лабораторных животных наиболее явно возрастали на 15 день эксперимента. Так, значения I_{\max} , S и $\text{tg}\alpha_2$ увеличивались в сыворотке крови крыс в 1,5, 1,3 и 1,7 раза; в сердце животных – в 1,3, 1,5 и 1,2 раза относительно контрольной группы. В печени крыс показатели I_{\max} и S возрастали в 1,2 раза, а $\text{tg}\alpha_2$ – в 1,3 раза; в мышцах крыс в 1,4 раза увеличивались значения I_{\max} и $\text{tg}\alpha_2$, в то время как S возрастала в 1,3 раза. Помимо этого, развитие РА у крыс сопровождалось накоплением в тканях ДК. Так, содержание данных продуктов максимально увеличивалось на 15 день эксперимента в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс в 2,4, 1,8, 3,2 и 1,3 раза соответственно. У животных с индуцированным РА наблюдалось также угнетение активности АГ, проявляющееся наиболее интенсивно на 15 день после введения полного адьюванта Фрейнда. Так, активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, снижалась в 1,5 раза, а активность АГ, представленная в виде Е/г сырой массы, уменьшалась в сердце, печени и мышцах крыс соответственно в 1,8, 1,4 и 1,2 раза.

В ходе работы было проведено исследование динамики изменения активности каталазы – одного из ключевых антиоксидантных ферментов, участвующих вместе с СОД в элиминации первичных АФК. Исходя из полученных данных, активность каталазы, выраженная в Е/мл и Е/г сырой массы, наиболее интенсивно увеличивалась на 15 день эксперимента в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс – в 1,7, 1,4, 1,2 и 1,3 раза соответственно. В ходе исследования был также проведен анализ динамики изменения концентрации в тканях животных GSH – одного из важнейших соединений, относящегося к неферментативному звену АОС и участвующего в работе глутатионовой системы. Было показано, что у животных с РА наблюдалось снижение содержания данного тиола во всех исследуемых тканях, связанное, по-видимому, с его расходом в процессе детоксикации АФК, и выраженное в максимальной степени на 15 день развития патологии. Таким

образом, наиболее явные изменения маркерных показателей РА, интенсивности СО, активности каталазы и содержания GSH происходили на 15 сутки после индукции патологии. Исходя из полученных результатов, оценка состояния свободнорадикального гомеостаза при развитии РА и воздействии ТК в тканях крыс проводилась на 15 день после индукции патологии.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИКТОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ И АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Результаты исследования показали, что развитие РА у крыс помимо увеличения показателей РФ и СОЭ сопровождалось возрастанием содержания в сыворотке крови ЦИК, IgG, IgM и IgA – иммунологических факторов, играющих одну из ключевых ролей в развитии патологии, в 1,2, 1,5, 1,7 и 1,4 раза соответственно. Введение ТК крысам с РА сопровождалось изменением маркерных показателей развития патологического процесса в сторону контрольных значений. Наибольший протекторный эффект при этом наблюдался при использовании тестируемого соединения в дозе 70 мг/кг. По-видимому, данные изменения происходили благодаря наличию у молекулы ТК способности обезвреживать свободные радикалы. Кроме того, снижение маркерных параметров и показателей иммунного статуса можно объяснить наличием у ТК способности уменьшать тяжесть аутоиммунных заболеваний и понижать интенсивность воспалительного процесса на уровне транскрипции (Gomes M.B., 2014, Salintho S., 2010, Pattison D.J., 2004).

Согласно полученным данным, введение ТК на фоне РА приводило к снижению показателей биохемилюминесценции, содержания ДК и возрастанию активности АГ. Наиболее эффективной при этом оказалась доза протектора 70 мг/кг. Так, в сыворотке крови, сердце и мышцах крыс значения I_{max} , снижались в 1,3 раза, в печени – в 1,2 раза относительно животных второй группы. В условиях воздействия ТК на фоне РА было также выявлено снижение общей антиоксидантной активности в тканях животных. Так, показатель $tg\alpha_2$ при введении протектора в дозе 70 мг/кг уменьшался в сыворотке крови и сердце крыс в 1,5 и 1,2 раза, в то время как в печени и мышцах животных снижение данного параметра происходило в 1,3 раза. Применение ТК в дозах 16, 35 и 70 мг/кг веса тела животного сопровождалось повышением в сыворотке крови крыс активности АГ, выраженной в Е/мл, на 16, 19 и 38 %. Активность фермента, выраженная в Е/г сырой массы ткани, повышалась в этих условиях в сердце крыс на 14, 35 и 57 %; в мышцах – на 16, 18 и 23% соответственно (рис. 1). Вместе с возрастанием активности АГ введение ТК приводило к уменьшению содержания цитрата в тканях лабораторных животных. Концентрация данного метаболита при использовании протектора в дозе 70 мг/кг снижалась в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс в 1,4, 2,4, 1,2 и 1,3 раза. Наблюдаемые изменения показателей биохемилюминесценции, содержания ДК и активности АГ в тканях крыс под воздействием протектора могут свидетельствовать о реализации защитных и антиоксидантных свойств тестируемого соединения в условиях развития РА.

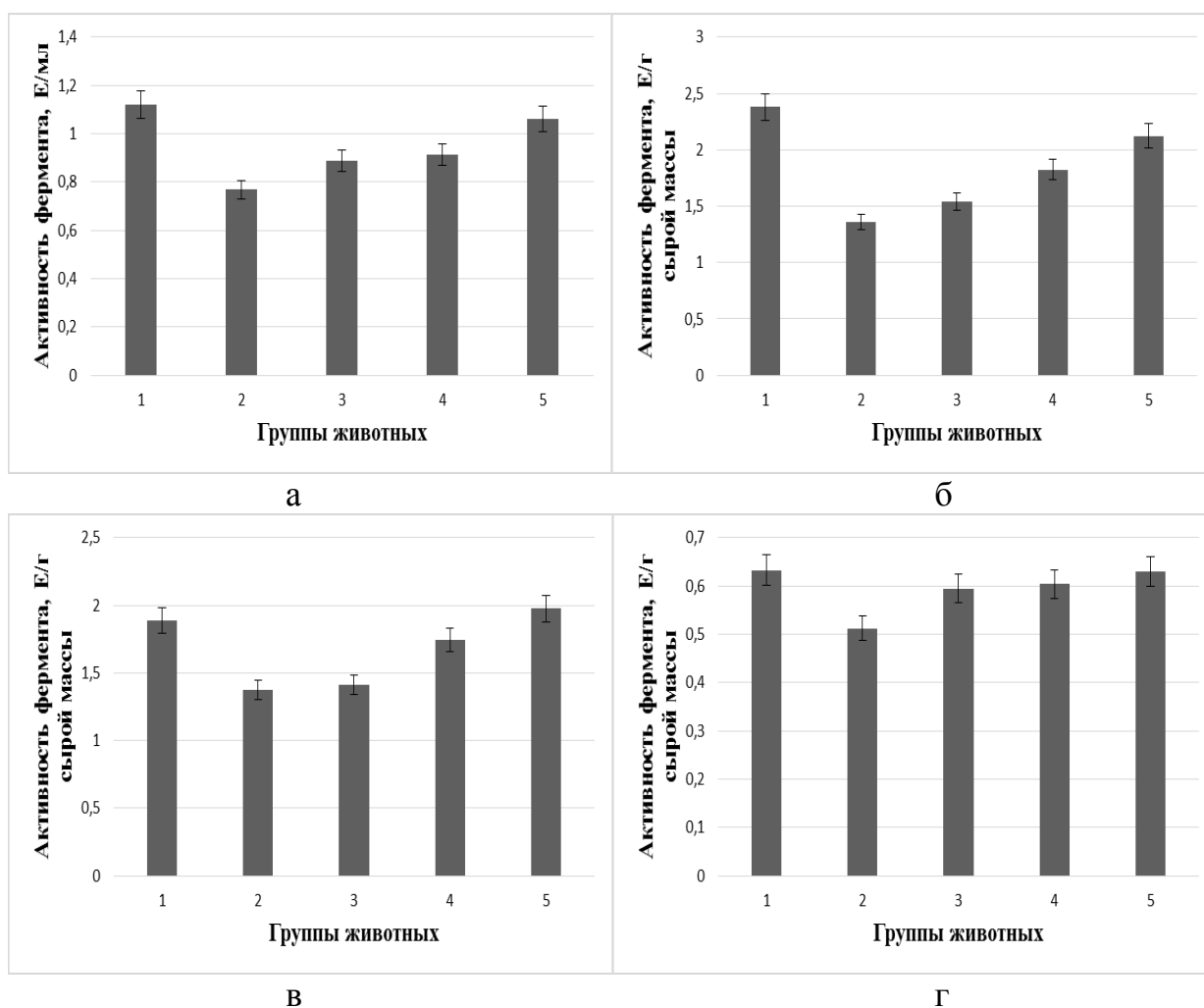


Рис. 1. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

Согласно полученным результатам, в ДНК, выделенной из сердца, скелетных мышц и печени крыс с РА, визуализировалась фрагментация по сравнению с ДНК животных первой группы (рис. 2). Фрагменты ДНК из данных тканей при патологии образуют характерную «апоптотическую лестницу».

Результаты по оценке степени фрагментации ДНК из сердца, скелетных мышц и печени животных соотносятся с данными, полученными при измерении активности каспаз. Так, было показано увеличение активности каспазы -3 и -8 при развитии РА в сердце крыс в 3,2 и 1,8 раза, в печени – в 2,4 и 2,1 раза, в мышцах животных – в 3,1 и 2,6 раза относительно контрольной группы. Показано, что введение ТК в дозах 35 и 70 мг/кг крысам с РА снижает степень фрагментации ДНК в сердце, скелетных мышцах и печени животных (см. рис. 2), что может быть свидетельством антиапоптотического действия исследуемого протектора. Эти результаты соотносятся с данными по снижению активности каспаз в условиях действия данного соединения на фоне развития патологии. Так, при введении ТК в дозе 70 мг/кг на фоне РА было показано снижение активности каспазы -3 и -8 в сердце крыс в 3,3 и 1,9 раза, в печени – в 2,5 и 2,2 раза, в мышцах – в 1,4 и 1,3 раза по сравнению с животными второй группы.

Снижение уровня апоптотических процессов в мышцах крыс может быть связано с уменьшением интенсивности СО под действием исследуемого соединения (Deneke S.M., 2000, Self W.T., 2000). Кроме того, было показано, что введение ТК в культуру клеток, подвергаемую воздействию ФНО- α , вызывающего программированную гибель гепатоцитов и клеток Купфера, тормозило активацию апоптотических процессов (Pierce R.H., 2000).

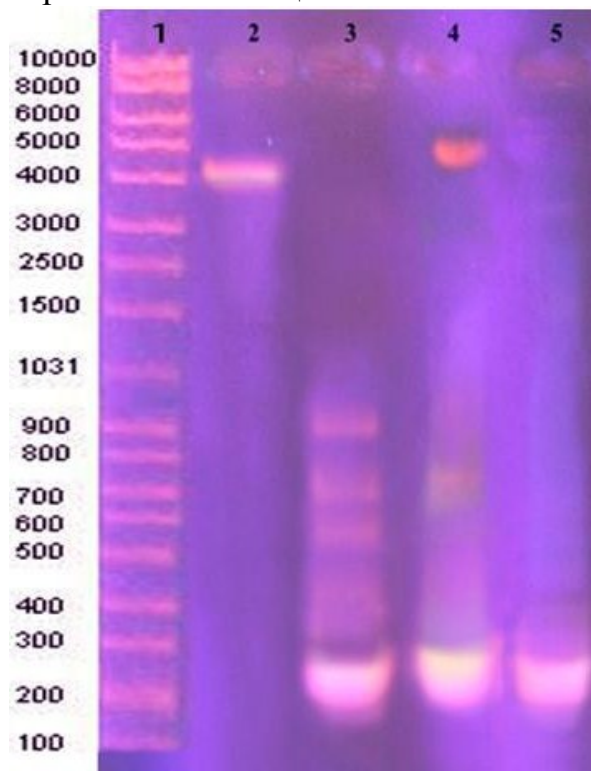


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов ДНК из сердца крыс. 1 – маркеры молекулярной массы; группы животных: 2 – контроль, 3 – экспериментальный ревматоидный артрит; 4 – введение на фоне развития патологии тиоциановой кислоты в дозе 35 мг/кг, 5 – введение на фоне развития патологии тиоциановой кислоты в дозе 70 мг/кг

Таким образом, наблюдалось снижение интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов при воздействии ТК в условиях развития РА, что может быть обусловлено реализацией антиоксидантной и протекторной активности тестируемым соединением.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ТИОЦИАНОВОЙ КИСЛОТЫ НА АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

Было показано, что развитие РА у крыс сопровождалось возрастанием активности СОД и каталазы в исследуемых тканях. Можно предположить, что наблюдаемые изменения являлись следствием активизации защитных функций организма адаптационного характера на чрезмерное образование АФК и интенсификацию ОС при развитии патологии (Бобырев В.Н., 1994). Введение ТК на фоне развития РА приводило к изменению активности СОД и каталазы в направлении контрольных значений, причем наибольший эффект протектора достигался при его использовании в дозе 70 мг/кг. Так, в данных условиях в 1,4 раза уменьшалась активность СОД, выраженная в Е/мл сыворотки крови животных, и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца крыс. В печени и мышцах животных при этом снижение данного параметра происходило в 2,2 и 1,3 раза относительно второй экспериментальной группы (рис. 3). По-видимому, наблюдаемый эффект был обусловлен снижением нагрузки на исследуемые защитные системы вследствие наличия у молекулы ТК антиоксидантных свойств, в том числе способности усиливать биосинтез

GSH путем транслокации в ядро транскрипционного фактора Nrf-2 (Flora S.J.S., 2009). Кроме этого, имеются сведения о способности ТК снижать экспрессию белков p22phox и p47phox – субъединиц НАДФН-оксидазы, играющей важную роль в генерации АФК при иммунном ответе (Feng B., 2013).

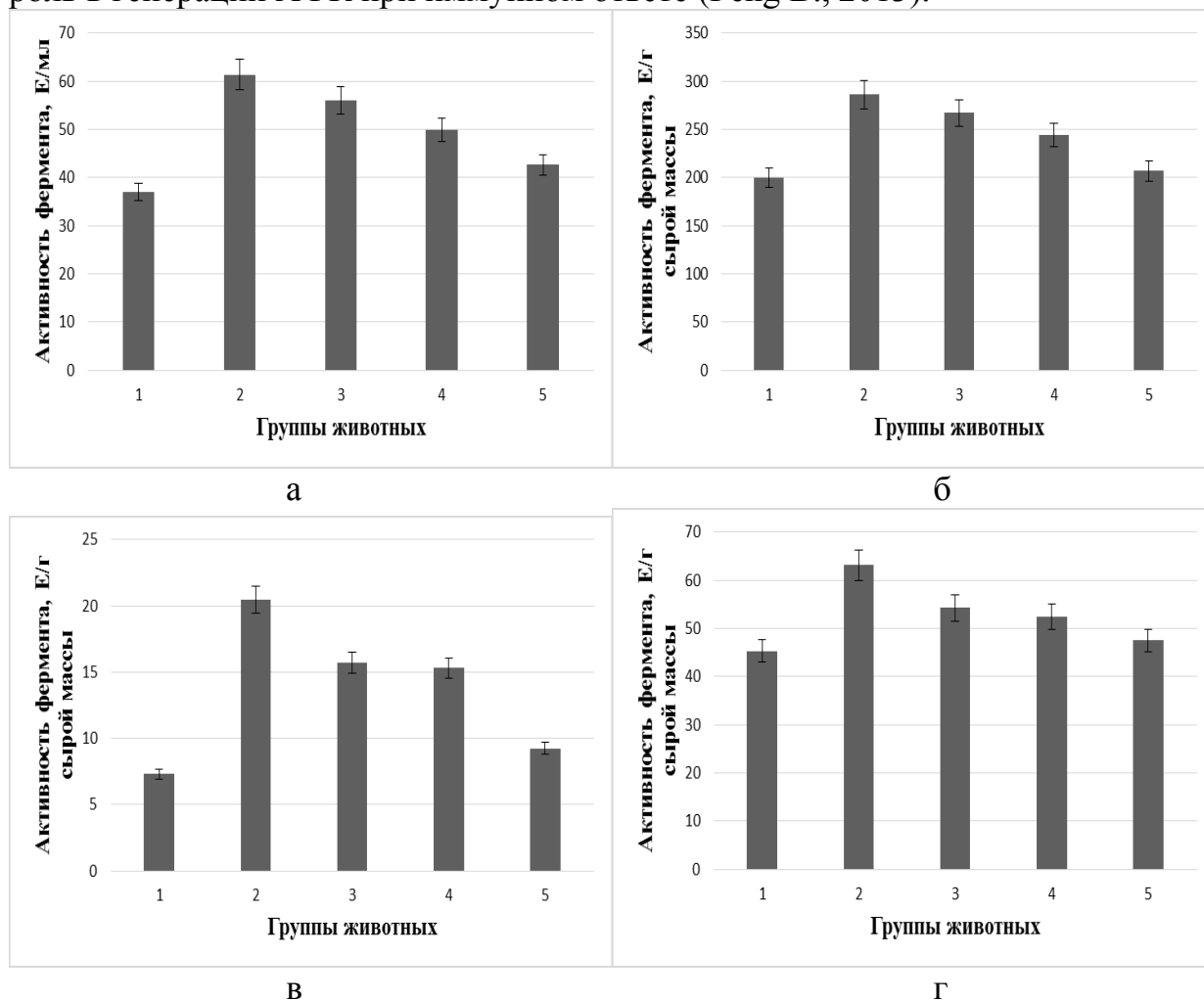


Рис. 3. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в виде Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

В ходе работы было показано, что развитие РА сопровождалось повышением активности GPX и GSR в исследуемых тканях лабораторных животных. При этом, введение ТК на фоне патологии приводило к изменению активности анализируемых ферментов в направлении контрольных значений, наибольший эффект тестируемое соединение оказывало в дозе 70 мг/кг веса тела животного. Так, в этих условиях активность GPX и GSR, представленная в виде Е/мл сыворотки крови, снижалась на 14 и 24%, а активность ферментов, выраженная в Е/г сырой массы, уменьшалась в сердце крыс на 37 и 20 %, в печени – на 27 и 24%, в мышцах животных – на 18 и 35 % относительно контроля (рис. 4). Наблюдаемые изменения функционирования исследуемых ферментов согласуются с данными по интенсивности СО и содержания в тканях крыс первичных продуктов ПОЛ, что может быть объяснено наличием у тестируемого соединения антиоксидантных и протекторных свойств. Таким

образом, ТК благодаря своему позитивному воздействию на свободнорадикальный гомеостаз в организме животных, снижала, по-видимому, нагрузку на ферменты глутатионового редокс-цикла.

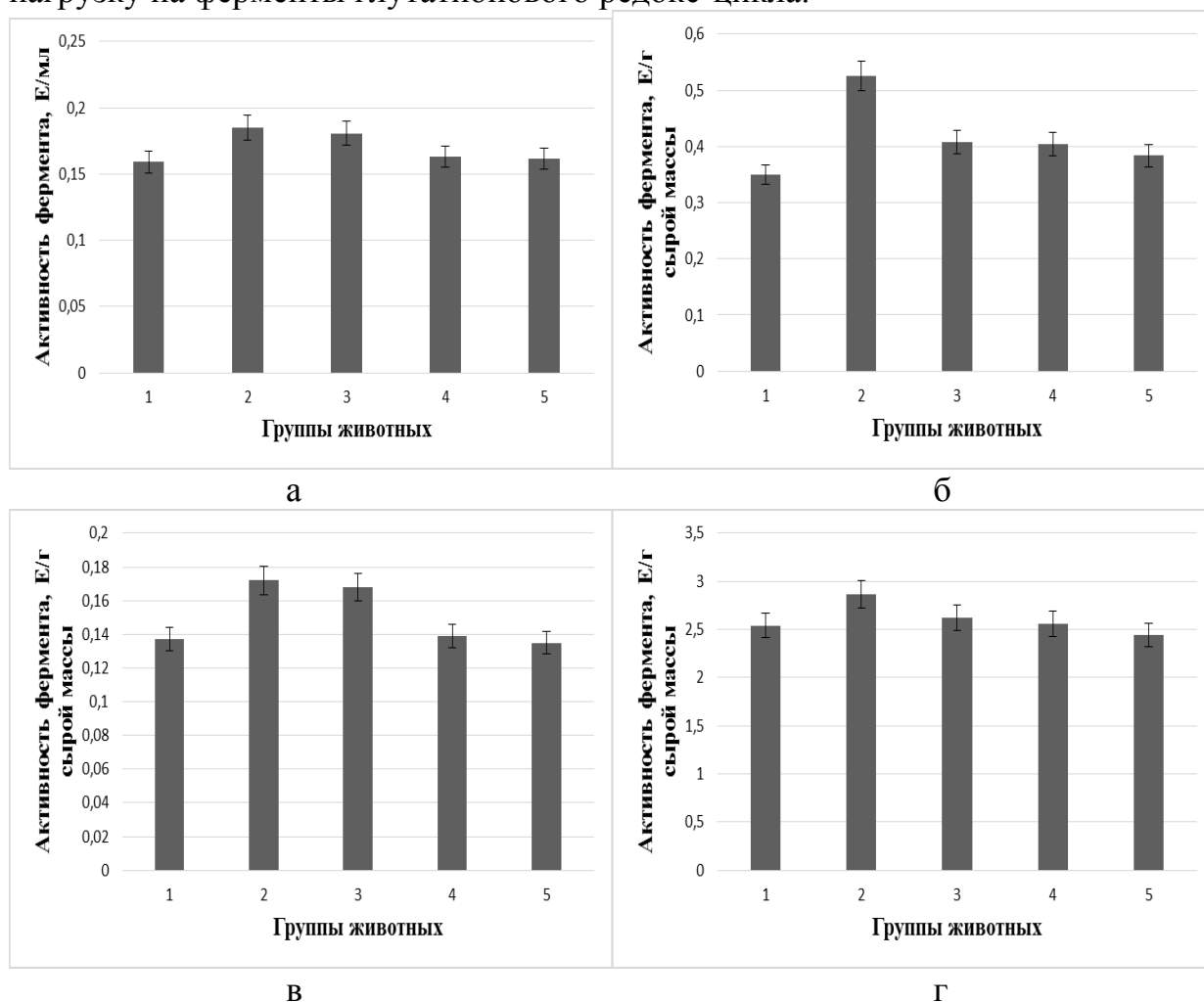


Рис. 4. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/мл сыворотки крови (а), и представленная в Е/г сырой массы ткани сердца (б), печени (в) и мышц крыс (г) в норме (1), при развитии ревматоидного артрита (2) и введении тиоктовой кислоты на фоне патологии в дозе 16 (3), 35 (4) и 70 (5) мг/кг веса животного

В то же время, развитие РА сопровождалось уменьшением содержания GSH. Так, концентрация данного тиола снижалась в сыворотке крови, печени и мышцах крыс в 1,2, раза, а в сердце – в 2,2 раза относительно контроля. Наблюдаемые изменения могли быть связаны с расходом GSH для детоксикации продуктов СО, чрезмерная интенсификация которого происходила в условиях развития патологии (Surapneni K.M., 2008). Значительный вклад в изменение данного параметра мог быть внесен развитием дисбаланса между скоростью образования, восстановления окисленного глутатиона и расходом GSH при усилении генерации АФК (Дмитриев В.А., 2008). Судя по всему, на момент развития наибольшей интенсивности протекания РА, даже повышение активности GSR не способно было компенсировать потери GSH в тканях животных. Введение ТК, при этом, способствовало изменению концентрации GSH в сторону контрольных значений во всех исследуемых тканях. По-видимому, за счет реализации

антиоксидантного действия исследуемого соединения происходило уменьшение степени развития ОС и, как следствие, снижение расходования GSH при РА. Увеличение концентрации GSH в печени выше контрольных значений при введении ТК в дозе 70 мг/кг веса тела происходило, вероятно, вследствие наличия у данного соединения способности воздействовать на биосинтез глутатиона, имеющий особенно большое значение в гепатоцитах (Волоскова А.В., 2005, Suh J.H., 2004). Активность GST у крыс второй экспериментальной группы также уменьшалась по сравнению с контрольными животными. Выявленные изменения активности фермента могли быть связаны с дефицитом GSH – основного субстрата исследуемого фермента в условиях ОС, развивающегося при индукции РА (Surapneni K.M., 2008). К нормализации активности GST у крыс на фоне развития РА приводило введение исследуемого протектора. Судя по всему, воздействие ТК на фоне РА обеспечивало ослабление нагрузки на GPX и GSR, и ослабление расходования GSH для детоксикации АФК, благодаря проявлению антиоксидантных и протекторных свойств. Таким образом, уменьшение степени дисбаланса в глутатионовой АОС способствовало изменению анализируемых параметров в направлении контрольных значений.

В ходе работы с помощью программы «qgene» осуществлялась оценка уровня транскриптов генов ряда антиоксидантных ферментов в исследуемых тканях лабораторных животных при РА и введении ТК на фоне развития патологии. В ходе данного анализа использовались следующие гены-мишени:

Sod1, прямой праймер – GGTCCAGCGGATGAAGAG,	обратный праймер – GGACACATTTGGCCACACC;	Cat, прямой праймер – GCTAATGAAGACAACGTCACCTCA,	обратный праймер – TGTTCTCACACAGGCGTTTC;
Gpx1, прямой праймер – CGACATCGAACCCGATATAGA,	обратный праймер – ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG;	Gsr, прямой праймер – TTCCTCATGAGAACCAGATCC,	обратный праймер – TGAAAGAACCCATCACTGGTTA;
глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФДН),	прямой праймер – CCCTCAAGATTGTCAGCAATG,	обратный праймер – AGTTGTCATGGATGACCTTGG.	референсный ген

Расчет разницы экспрессии с учетом порогового цикла для ГАФДН и значений эффективности амплификации показал, что при РА происходит увеличение уровня транскриптов генов ферментов антиоксидантной защиты. Так, данный показатель для Sod1 увеличивался в крови, сердце, печени и мышцах крыс в 4,0, 3,1, 2,5 и 2,8 раза относительно животных контрольной группы. Уровень транскриптов Cat возрастал при этом в крови и сердце в 3,3, 3,1 раза, а в печени и мышцах крыс – в 2,6 раза. Для Gpx1 возрастание уровня транскриптов в крови и сердце животных составило 2,6 раза относительно контроля, в печени и мышцах – 2,4 и 2,8 раза. Gsr характеризовался увеличением уровня транскриптов в крови и сердце крыс в 3,0 раза, в печени и мышцах – в 2,5 и 3,3 раза относительно контроля. Полученные результаты соотносятся с данными по повышению активности исследуемых ферментов в тканях крыс при экспериментальном РА. По-видимому, усиление синтеза GPX,

GSR, СОД и каталазы при РА может быть одним из важнейших механизмов, лежащих в основе возрастания активности исследуемых антиоксидантных ферментов в условиях патологии. Очевидно, возрастание уровня экспрессии исследованных ферментов может способствовать повышению устойчивости систем организма к окислительному стрессу. В то же время нельзя исключить возможности регуляции активности GPX, GSR, СОД и каталазы при патологии путем модификации свойств уже существующих молекул ферментов наряду с их синтезом *de novo* (Mulherin D.M., 1996, Surapneni K.M., 2008, Vijayakumar D., 2006).

Введение ТК на фоне РА сопровождалось снижением уровня транскриптов генов АОС крыс. Так, применение исследуемого протектора в дозе 70 мг/кг приводило к снижению данного параметра Sod1 в крови и сердце в 1,3 и 1,5 раза относительно второй экспериментальной группы. Уровень транскриптов Cat в этих условиях уменьшался в сердце и крови крыс в 1,4 и 1,3 раза. Данный показатель Gsr в крови и сердце животных понижался в 1,1 раза, как и уровень транскриптов Gpx1 в сердце крыс, тогда как в крови для этого гена наблюдалось уменьшение исследуемого параметра в 1,2 раза. В печени и мышцах животных уровень транскриптов всех исследуемых генов при введении ТК снижался в 1,2 раза относительно второй экспериментальной группы. Уменьшение активности и уровня экспрессии ферментов при введении ТК на фоне развития РА, вероятно, происходит благодаря реализации антиоксидантного действия данного соединения, снижающего степень мобилизации ферментов АОС. Таким образом, по-видимому, на уровень экспрессии генов GSR, GPX, СОД и каталазы в тканях животных влияет уровень процессов СО в организме при патологии и действии тиоктовой кислоты на фоне развития РА.

В процессе функционирования ферментов глутатионового редокс-цикла при детоксикации АФК происходит окисление GSH, который затем восстанавливается за счет НАДФН. Основными источниками данного соединения для глутатионовой АОС являются Г6ФДГ – один из ключевых ферментов пентозофосфатного пути, и НАДФ-ИДГ (Свиридов М.М., 2006). Результаты, полученные в ходе работы показали, что активность Г6ФДГ возрастала при развитии РА, что согласуется с данными по активности GSR при данной патологии. Помимо этого, развитие патологии сопровождалось ростом в сыворотке крови, печени и мышцах крыс активности НАДФ-ИДГ. Судя по всему, увеличение активности исследуемых ферментов могло иметь важное адаптивное значение в связи с возрастанием потребности в НАДФН глутатионовой АОС при интенсификации процессов СО на фоне РА. Однако в сердце крыс при развитии патологии НАДФ-ИДГ проявляла тенденцию к уменьшению своей активности. Данный эффект мог быть обусловлен воздействием на фермент 4-гидроксиналена – конечного продукта пероксидного окисления омега-6 полиненасыщенных жирных кислот, образующегося при ряде патологий, сопряженных с ОС, в том числе при РА (Shi Q., 2012). Введение крысам с патологией ТК способствовало нормализации параметров, характеризующих активность Г6ФДГ в исследуемых тканях. Так, наибольший эффект достигался при применении протектора в дозе 70 мг/кг:

активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, снижалась в 1,9 раза, а активность, представленная в виде Е/г сырой массы, в сердце уменьшалась в 1,3 раза, в печени и мышцах – в 1,2 раза. Кроме этого, при введении ТК происходило снижение активности НАДФ-ИДГ в сыворотке крови крыс и повышение данного параметра в сердце животных, таким образом, указанные показатели изменялись в сторону контрольных значений. По-видимому, изменение исследуемых параметров при введении ТК на фоне развития РА может быть следствием снижения потребности в поставке НАДФН для работы глутатионовой АОС. В сердце животных, судя по всему, под воздействием протектора происходило снижение интенсивности ПОЛ и образования 4-гидроксиноненаля, что и приводило к нормализации активности НАДФ-ИДГ. В печени и мышцах крыс с РА введение ТК в максимальной дозе способствовало возрастанию активности данного фермента выше контрольных значений. Наблюдаемый эффект мог быть обусловлен активирующим воздействием тестируемого соединения на α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, обратимо инактивирующийся в условиях ОС, которое приводило к интенсификации превращения 2-оксоглутарата и, соответственно, изоцитрата (McLain A.L., 2013, McLain A.L., 2011).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование динамики развития РА на основе маркерных показателей и ряда параметров свободнорадикального гомеостаза показало, что максимальная интенсивность патологического процесса приходится на 15 день после введения полного адьюванта Фрейнда, что согласуется с литературными данными (Wang D, 2011). Применение ТК на фоне патологии приводило к изменению маркерных показателей в сторону контрольных значений, что, по-видимому, обусловлено наличием у молекулы протектора антиоксидантных свойств, а также способности снижать тяжесть аутоиммунных заболеваний и интенсивности воспаления путем ингибирования транскрипционного фактора Nf-kB (Gomes M.B., 2014, Salintho S, 2010, Pattison D.J., 2004).

Развитие РА у лабораторных животных характеризовалось интенсификацией СО и мобилизацией АОС. Было показано, что при индукции данной патологии увеличивались значения показателей биохемилюминесценции и содержания ДК в тканях крыс. По-видимому, полученные данные свидетельствовали о чрезмерной генерации АФК, играющих важную роль в патогенезе РА и являющихся триггером аутоиммунной реакции (Hirao M., 2012). Накопление первичных продуктов ПОЛ происходило при этом вследствие окисления биологических молекул образовавшимися свободными радикалами. Наблюдалось также угнетение активности АГ вследствие разрушения АФК железо-серного кластера активного центра, и накопление цитрата – основного субстрата данного фермента. Введение ТК на фоне патологии приводило к уменьшению параметров, характеризующих интенсивность СО, восстановлению активности АГ и снижению содержания цитрата. По-видимому, благоприятный эффект исследуемое соединение оказывало благодаря способности как непосредственно обезвреживать АФК и хелатировать ионы металлов переменной валентности,

так и участвовать в регенерации других антиоксидантов и (Flora S.J.S., 2009, Gomes M.B., 2014, Liang J.F., 2000, Suntres Z.E., 2003).

Кроме того, развитие патологии, сопровождалось активацией апоптотических процессов, что выражалось в соответствующих изменениях электрофореграмм ДНК и активности каспаз в тканях крыс РА. Усиление данного процесса происходило, по-видимому, под действием свободных радикалов, генерируемых в большом количестве в процессе патогенеза РА. Использование ТК в качестве протектора способствовало уменьшению интенсивности апоптотических процессов, что может быть связано как с антиоксидантной активностью данного соединения, так и с наличием у него антиапоптотических свойств (Pierce R.H., 2000, Kaya-Dagistanli F., 2013).

Индукция РА приводила к росту активности СОД и каталазы в исследуемых тканях животных, что являлось защитной реакцией организма на чрезмерную генерацию АФК гранулоцито-макрофагальными клетками в процессе патогенеза данного заболевания. Для тканей крыс, которым вводили ТК в качестве протектора, была характерна более низкая активность анализируемых ферментов, по сравнению с животными с патологией, что могло являться следствием снижения нагрузки на данные защитные системы. Так, помимо непосредственного антиоксидантного эффекта исследуемое соединение может усиливать биосинтез GSH, а также снижать экспрессию субъединиц фермента НАДФН-оксидазы, играющей важную роль в генерации АФК при иммунном ответе (Flora S.J.S., 2009, Feng B., 2013).

При развитии РА происходило повышение активности GPX и GSR, что имело важное адаптивное значение для формирования клеточного ответа на развитие ОС. Концентрация GSH при этом снижалась в исследуемых тканях крыс вследствие его расходования для детоксикации АФК. Уменьшалась также и активность GST в условиях дефицита основного субстрата данного фермента – GSH. Введение ТК способствовало нормализации исследуемых параметров, что происходило, видимо, благодаря снижению нагрузки на ферменты глутатионового редокс-цикла и уменьшению степени дисбаланса глутатионовой АОС. Увеличение концентрации GSH выше контрольных значений в печени животных, получавших максимальную дозу протектора, по-видимому, было связано со способностью ТК активизировать биосинтез данного тиола, главным источником которого выступают гепатоциты.

Данные, полученные в ходе исследования, показали, что развитие патологии сопровождалось увеличением уровня транскриптов генов ферментов СОД, каталазы, GPX и GSR, что могло выступать в качестве одного из механизмов возрастания их активности в условиях окислительного стресса. Введение ТК, проявляющей протекторные свойства в условиях интенсификации СО, сопровождалось уменьшением уровня транскриптов генов анализируемых ферментов, что согласуется с данными по изменению их активности.

Индукция РА приводила к увеличению активности НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ в большинстве исследуемых тканей животных, что могло быть следствием возрастания потребности в НАДФН глутатионовой АОС. В сердце крыс уменьшение активности НАДФ-ИДГ происходило, по-видимому, вследствие образования неактивного аддукта между данным ферментом и 4-

гидроксиналеном – продуктом ПОЛ. Введение ТК способствовало нормализации активности исследуемых ферментов благодаря снижению потребности GSR в НАДФН, а также уменьшению интенсивности СО в тканях животных. Увеличение активности НАДФ-ИДГ в печени и мышцах крыс выше контрольных значений после введения протектора в максимальной дозе могло являться следствием активирующего воздействия ТК на α -КГДГ-комплекс, сопряженного с усилением образования изоцитрата – субстрата ИДГ.

Воздействие исследуемого протектора на окислительно-восстановительный гомеостаз организма животных носило дозозависимый характер, наибольший эффект ТК оказывала в дозировке 70 мг/кг.

На основании проведенного исследования была предложена гипотетическая схема, отражающая основные механизмы регуляции свободнорадикального гомеостаза под воздействием ТК (схема 1). Так, тестируемое биологически активное соединение, являющееся кофактором для пируватдегидрогеназного и 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса (на схеме ПДГК и 2-ОГДГК соответственно), с помощью НАДН или НАДФН способно быстро превращаться в восстановленную форму – ДГЛК, которая выполняет множество биологических функций. Данное соединение является мощным антиоксидантом, хелатором ионов металлов переменной валентности, способно восстанавливать окисленные формы других антиоксидантов, таких как витамин С, Е, GSH, тиоредоксин, убихинон. ТК также выступает в роли скавенджера АФК благодаря напряженной конформации 5-членного кольца с внутримолекулярной дисульфидной связью, причем свою антиоксидантную активность данное вещество способно проявлять как в липидной, так и водной фазе (Flora S.J.S., 2009, Gomes M.B., 2014, Liang J.F., 2000, Suntres Z.E., 2003). Кроме того, исследуемое соединение способно снижать экспрессию НАДФН-оксидазы, играющей важнейшую роль в генерации АФК при РА, а также транскрипционно усиливать биосинтез GSH и уменьшать интенсивность воспалительного процесса (Flora S.J.S., 2009, Gomes M.B., 2014, Salintho S, 2010, Yadav V., 2010, Feng B., 2013). Проявление ТК протекторных свойств при патологии способствовало снижению интенсивности ОС и апоптотических процессов, уменьшению нагрузки на АОС. Таким образом, показана возможность регуляции свободнорадикального гомеостаза в условиях развития РА при помощи ТК, что может представлять значительный интерес с точки зрения фармакологической коррекции метаболических нарушений при данном патологическом состоянии.

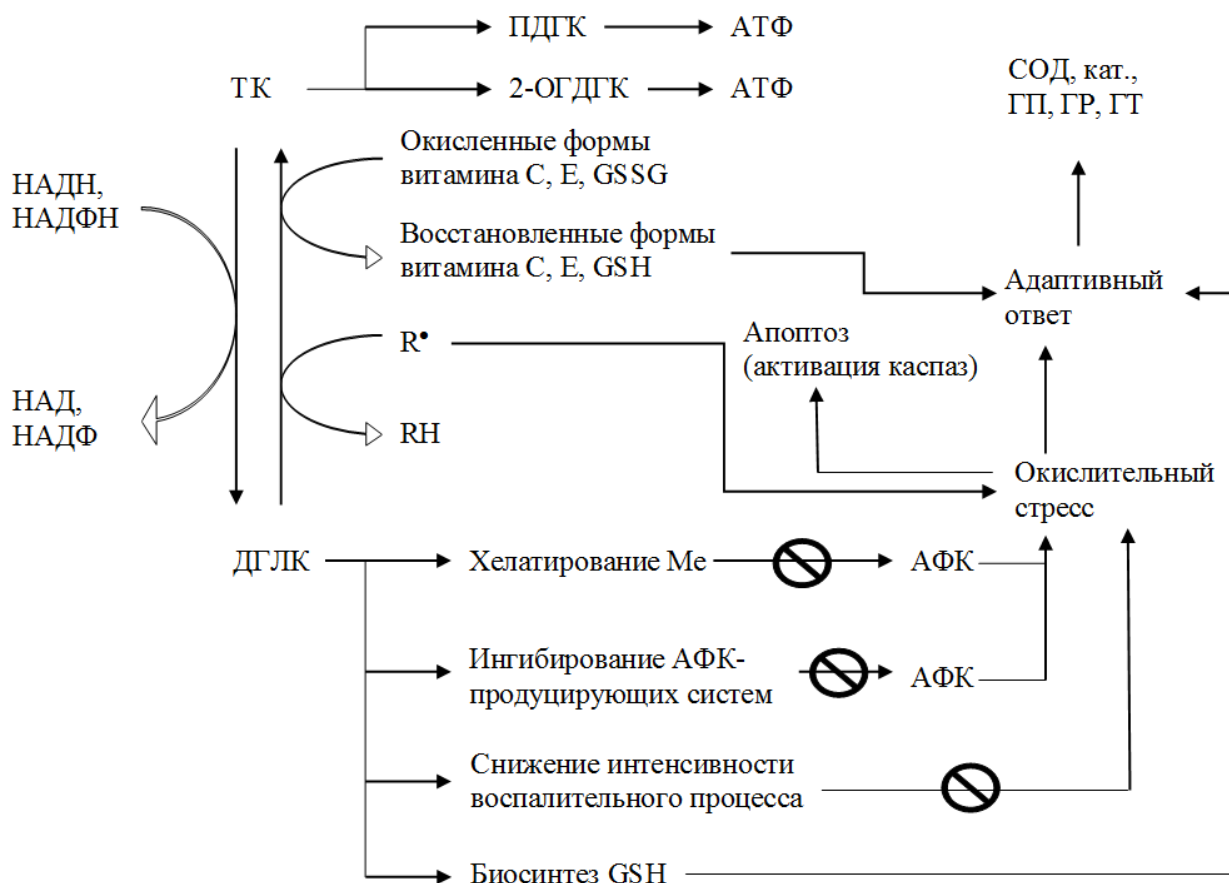


Схема 1. Регуляция свободнорадикального гомеостаза под воздействием тиоктовой кислоты в условиях развития ревматоидного артрита.

ВЫВОДЫ

1. Наибольшая активность патологического процесса, а также максимальные значения показателей состояния окислительно-восстановительного гомеостаза: параметры биохемилюминесценции, содержание диеновых конъюгатов и восстановленного глутатиона, активность каталазы и аконитатгидратазы, достигаются на 15 день после индукции ревматоидного артрита, вызванной введением полного адьюванта Фрейнда экспериментальным животным.
2. Введение тиоктовой кислоты на фоне развития ревматоидного артрита приводило к снижению в крови экспериментальных животных скорости оседания эритроцитов, а также содержания ревматоидного фактора, циркулирующих иммунных комплексов, иммуноглобулинов класса А, М и G, возраставшего при индукции патологии. Наблюдаемые изменения маркерных показателей развития ревматоидного артрита свидетельствуют о наличии у исследуемого соединения протекторных и противовоспалительных свойств. Наибольший эффект в большинстве случаев оказывало введение тиоктовой кислоты в дозе 70 мг\кг веса тела животного.
3. Под воздействием тиоктовой кислоты снижалась интенсивность свободнорадикального окисления, о чем свидетельствовало уменьшение показателей биохемилюминесценции и содержания диеновых конъюгатов в тканях лабораторных животных, а также нормализация активности аконитатгидратазы – чувствительной мишени действия активных форм кислорода.

4. Использование тиоктовой кислоты в качестве протектора приводило к снижению степени фрагментации ДНК и активности каспаз в тканях животных экспериментальных групп, что может быть связано с наличием у данного соединения антиапоптотических свойств и способности тормозить процессы свободнорадикального окисления.

5. Показано, что введение тиоктовой кислоты приводило к уменьшению активности супероксиддисмутазы и каталазы в исследуемых тканях крыс, что могло свидетельствовать о снижении нагрузки на антиоксидантную систему под воздействием исследуемого протектора.

6. При введении тиоктовой кислоты происходило снижение активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, а также возрастание активности глутатионтрансферазы и содержания восстановленного глутатиона. Таким образом, использование данного протектора способствовало изменению исследуемых параметров в направлении контрольных значений путем снижения мобилизации и степени дисбаланса глутатионовой антиоксидантной системы.

7. Под воздействием тиоктовой кислоты в тканях экспериментальных животных происходило уменьшение уровня транскриптов генов ферментов супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, увеличение уровня которых при развитии ревматоидного артрита являлось, по-видимому, одним из механизмов повышения активности данных ферментов в ответ на интенсификацию свободнорадикального окисления.

8. Введение тиоктовой кислоты сопровождалось нормализацией активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в тканях крыс вследствие снижения потребности поставки НАДФН для глутатионовой антиоксидантной системы, обезвреживающей активные формы кислорода. Возрастание активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы выше контрольных значений при применении протектора в максимальной дозе в печени и мышцах крыс могло быть следствием активирующего воздействия исследуемого протектора на α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Активность глутатионовой антиоксидантной системы и NADPH-генерирующих ферментов при экспериментальном ревматоидном артрите у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160, № 7. – С. 30-34.
2. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Воздействие тиоктовой кислоты на оксидативный статус тканей крыс при ревматоидном артрите // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 9. – С. 8-11.
3. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Таныгина Е.С., Кирилова Е.М. Синтез и оценка влияния 2,4-диметоксифенилбигуанида на активность глутатионовой антиоксидантной системы в сердце и сыворотке крови крыс при экспериментальном ревматоидном артрите // Химико-фармацевтический журнал. – 2016. – Т. 49, № 11. – С. 32-35.
4. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М., Сафонова О.А. Воздействие липоевой кислоты на активность каспаз, показатели иммунного и антиоксидантного статуса при ревматоидном артрите у крыс // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42, № 4. – С. 431-439.

5. Сафонова О.А., Попова Т.Н., Крыльский Е.Д., Агарков А.А., Шульгин К.К., Кирилова Е.М., Таныгина Е.С. Активность антиоксидантных ферментов в условиях воздействия 3,5-дикарбометоксифенилбигуанида // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 4. – С. 416-420.
6. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Параметры биохемилюминисценции в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите // Тенденции и инновации современной науки: материалы III Международной научно-практической конференции, Краснодар. 29 октября 2012 г. – Краснодар, 2012 – С. 46.
7. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Активность каталазы в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите // Актуальные проблемы современной науки: материалы научных трудов IX международной научно-практической телеконференции, Томск, 2012г. – Томск, 2012 – Т.1. – №3. – С. 57-58.
8. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Содержание восстановленного глутатиона в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите // Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни: материалы II Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием (25 апреля 2013). – Воронеж, 2013. – Т.1. – С. 165-167.
9. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите // Современная наука: тенденции развития: материалы 5 международной научно-практической конференции (23 июля 2013). — Краснодар, 2013. — Т. 2. – С. 56-58 .
10. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном артрите // Актуальные вопросы науки: материалы 10 международной научно-практической конференции (25.07.2013). — Москва, 2013 .— С. 15-17.
11. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Содержание диеновых конъюгатов в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: материалы 5-й международной научно-методической конференции "Фармобразование-2013". — Воронеж, 2013. — С. 356-359.
12. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н. Активность некоторых НАДФН-генерирующих ферментов при экспериментальном ревматоидном артрите у крыс // Векторы развития современной науки. Материалы Международной научно-практической конференции. Часть 1 (Уфа 20-21 января 2014 г.). – Уфа, 2014. – С. 28-31.
13. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Активность ферментов глутатионовой антиоксидантной системы при экспериментальном ревматоидном артрите у крыс // Актуальные вопросы науки. Материалы XII Международной научно-практической конференции (Москва 24 января 2014 г.). – Москва, 2014. – С.13-16.
14. Крыльский Е.Д., Попова Т.Н., Кирилова Е.М. Активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном ревматоидном

артрите и действии тиоктовой кислоты // Интер-медикал. – 2014. – №4. – С. 55-58.

Публикации 1-5 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ, а также входящих в базы цитирований Web of Science и Scopus.