

На правах рукописи



Веревкин Алексей Николаевич

РЕГУЛЯЦИЯ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА В ТКАНЯХ
КРЫС ПРИ ОКСИДАТИВНОМ СТРЕССЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ
РАЗВИТИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И РЕВМАТОИДНОГО
АРТРИТА, ВОЗДЕЙСТВИЕМ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ
ПРЕПАРАТОВ

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» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

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

Официальные оппоненты: **Островский Олег Владимирович**
доктор медицинских наук, профессор,
ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
Кафедра теоретической биохимии с
курсом клинической биохимии,
заведующий кафедрой

Земченкова Ольга Владимировна
кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный
медицинский университет им. Н.Н.
Бурденко», кафедра биохимии, ассистент

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии
наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

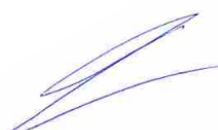
Защита диссертации состоится «28» ноября 2016 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

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. Согласно современным воззрениям в основе многих патологических состояний лежит чрезмерное возрастание скорости свободнорадикального окисления (СО) биосубстратов, что в условиях недостаточности антиоксидантной защиты приводит к развитию окислительного стресса (ОС). К заболеваниям, патогенез которых включает интенсивную генерацию активных форм кислорода (АФК), относятся сахарный диабет 2 типа (СД2) и ревматоидный артрит (РА). Так, при СД2 активация полиолового и гексозаминового путей окисления глюкозы, а также ферментативного гликозилирования белков ведет к накоплению свободных радикалов (Балаболкин М.И., 2007). Наличие продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), окисленных липопротеинов низкой плотности и карбонильных групп, отражающих степень окислительного повреждения белков, в синовиальной жидкости подтверждает ведущую роль ОС в патогенезе РА (Dai L., 2000; Taysi S., 2002; Dalle-Donne I., 2003). Интенсификация свободнорадикальных процессов (СРП) при развитии СД2 и РА приводит к нарушению структуры и функций клеток и тканевых систем организма. Защиту от повреждающего действия свободных радикалов осуществляет многоуровневая система антиоксидантной защиты.

Значительный интерес представляет исследование эндогенных и экзогенных факторов, способных влиять на активность антиоксидантных систем (АОС) организма и/ или обладающих собственным антиоксидантным потенциалом. К веществам подобного спектра действия могут быть отнесены эпифамин, мелаксен и вальдоксан. Данные препараты способны оказывать воздействие на метаболизм мелатонина – гормона, обладающего широким спектром действия и выраженной антиоксидантной активностью (Galano A., 2011). Так, в состав эпифамина входит комплекс белков и нуклеопротеидов, которые обладают избирательным действием на клетки эпифиза, что способствует стимулированию синтеза и секреции мелатонина (Кузник Б.И., 1998). Мелаксен включает в свой состав данный гормон, синтезированный из аминокислот растительного происхождения. Вальдоксан является селективным агонистом МТ1 и МТ2 мелатониновых рецепторов и, тем самым, способен оказывать эффекты, характерные для данного гормона (Millan M.J., 2003). В связи с этим приобретает актуальность исследование влияния данных мелатонин-корректирующих препаратов на свободнорадикальный гомеостаз при патологических состояниях, сопряженных с оксидативным стрессом – СД2 и РА.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина, мелаксена и вальдоксана, на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при оксидативном стрессе, индуцированном развитием сахарного диабета 2 типа и ревматоидного артрита.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Оценка влияния мелатонин-корректирующих препаратов на маркерные показатели развития СД2 и РА в сыворотке крови крыс.
2. Анализ воздействия эпифамина, мелаксена и вальдоксана на интенсивность протекания СРП в тканях экспериментальных животных с СД2 и РА на основе параметров биохемилюминесценции (БХЛ), уровня диеновых конъюгатов (ДК) и активности аконитатгидратазы (АГ), являющейся маркерным ферментом развития ОС.
3. Выявление антиапоптотического эффекта исследуемых лекарственных средств на фоне развития патологий, сопряженных с ОС.
4. Изучение влияния мелатонин-корректирующих препаратов на активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы, а также на функционирование глутатионовой АОС – активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ) и уровень восстановленного глутатиона (GSH), в тканях животных с СД2 и РА.
5. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов при действии эпифамина, мелаксена и вальдоксана на фоне развития СД2 и РА.
6. Определение активности НАДФН-генерирующих ферментов в тканях крыс при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 и РА.
7. Разработка гипотетической схемы, отражающей воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на свободнорадикальный гомеостаз при патологиях, сопряженных с развитием ОС.

Научная новизна. Впервые осуществлено комплексное исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов на интенсивность СО биомолекул, активности ферментативных и неферментативных компонентов АОС, ряда ферментов окислительного метаболизма, а также уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с СД2 и РА. Установлено, что введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана при развитии патологий, сопряженных с ОС, приводит к уменьшению интенсивности СРП и коррекции функционирования ферментов АОС в тканях крыс. При этом также отмечено снижение интенсивности апоптотических процессов. Выявлено снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с СД2 и РА при введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана, что соотносится с изменениями активности ферментов и свидетельствует об уменьшении степени мобилизации АОС в условиях торможения оксидативного стресса. Проведен сравнительный анализ эффектов различных доз исследуемых лекарственных средств. Осуществлено исследование воздействия мелатонин-корректирующих препаратов на активность ферментов-поставщиков восстановительных эквивалентов в виде НАДФН для работы глутатионовой АОС в тканях крыс с исследуемыми патологиями. Предложена гипотетическая схема влияния мелатонин-корректирующих препаратов на регуляцию свободнорадикального гомеостаза при патологиях, сопряженных с развитием ОС.

Практическая значимость. Полученные данные о корригирующем воздействии эпифамина, мелаксена и вальдоксана на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс в условиях развития патологических состояний, сопряженных с окислительным стрессом, свидетельствуют о возможности применения данных лекарственных средств для коррекции оксидативного статуса при СД2 и РА. Результаты работы углубляют фундаментальные представления о путях реализации протекторного действия веществ, обладающих антирадикальным потенциалом, что создает основы для развития антиоксидантной терапии.

Материалы работы используются в учебном процессе на медико-биологическом и фармацевтическом факультетах Воронежского государственного университета при чтении курсов «Интеграция обменных процессов в организме», «Свободнорадикальные процессы в биологических системах», «Биологическая химия», а также спецкурсов по патобиохимии и энзимологии. Кроме того, они используются при проведении практикумов, выполнении курсовых, выпускных квалификационных работ и магистерских диссертаций студентами Воронежского госуниверситета.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на V Международной научно-практической конференции «Современное состояние естественных и технических наук» (Москва, 2011), на VII международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» (Томск, 2012), на IX международной научно-практической конференции «Современные достижения науки-2013» (Прага, 2013), в материалах 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013» (Воронеж, 2013), на VI Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013), в Материалах 10 научно-практической конференции «Актуальные научные разработки – 2014» (София, 2014), на Международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж, 2015)

Публикации. Основные результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, изложены в 25 публикациях, из них 3 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Выявлено дозозависимое протекторное действие мелатонин-корригирующих препаратов при патологиях, сопряженных с ОС – СД2 и РА, обеспечивающее снижение маркерных показателей развития заболеваний, а также интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов.
2. Введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана экспериментальным животным при СД2 и РА способствует приближению показателей ключевых компонентов АОС к контрольным значениям.
3. При действии мелатонин-корригирующих препаратов на фоне СД2 и РА активность ряда ферментов окислительного метаболизма – глюкозо-6-

фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) и АГ, изменяется в направлении нормы.

Структура и объем работы. Диссертация представлена на 221 странице машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения полученных результатов (2 главы), заключения, выводов и списка литературы (256 источников). Иллюстративный материал включает 59 рисунков и 9 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и материалы исследования: Для проведения исследований использовали гомогенат печени, почек, сердца и мышц, а также сыворотку крови белых лабораторных крыс-самцов массой 150-200 г. В ходе работы было сформировано 18 экспериментальных групп: 1 группа (n = 16) – контрольные животные; 2 группу (n = 16) составляли животные с СД2, индуцированным внутримышечными инъекциями протамин-сульфата (Sigma-Aldrich Co., США) (Ульянов А.М., 2000); в 3, 4 и 5 группах (n = 18) животным с СД2 внутрибрюшинно вводили эпифамин в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl утром в дозах 1,25, 2,5 и 5,0 мг/кг на 15, 17 и 19 день эксперимента; в 6, 7, 8 и 9 группах (n = 16) животным по аналогичной схеме вводили мелаксен в дозах 2,5, 5,0, 10,0 и 20,0 мг/кг; в 10, 11, 12 и 13 группах (n = 16) по аналогичной схеме вводили вальдоксан в дозах 2,5, 5,0, 10,0 и 20,0 мг/кг; 14-ю группу (n = 17) составляли животные с РА, вызванным введением полного адьюванта Фрейнда (Sigma-Aldrich Co., США) (Wang D., 2010); в 15 и 16 группах (n = 16) животным с патологией внутрибрюшинно вводили эпифамин в дозе 1,25 и 2,5 мг/кг массы животного, в виде раствора в 1 мл 0,9% NaCl, однократно утром на 10, 12 и 14 день эксперимента; крысам 17 и 18 групп (n = 16) по аналогичной схеме вводили мелаксен в дозе 5,0 и 10,0 мг/кг. При проведении исследований соблюдалась основные принципы Надлежащей лабораторной практики GLP. Работа выполнена в соответствии с санитарными правилами для вивария и нормами гуманного обращения с лабораторными животными.

Определение маркерных показателей развития заболеваний: Контроль развития СД2 осуществляли путем определения концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс. Развитие РА оценивали путем определения содержания ревматоидного фактора (РФ) в сыворотке крови крыс турбидиметрическим методом (Вершинин В.И., 2011) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ) по методу Панченкова (Луговская С.А., 2006).

Оценка оксидативного статуса. Интенсивность процессов СО определяли методом БХЛ, индуцированной сульфатом железа и пероксидом водорода, на приборе БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 секунд и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), отражающие интенсивность СРП, и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha$), характеризующую общую антиоксидантную активность. Уровень ДК определяли спектрофотометрически при 233 нм (Стальная И.Д., 1977).

Интенсивность апоптотических процессов в тканях экспериментальных животных оценивали по степени фрагментации ДНК и изменению активности каспаз-3 и -8. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия). Последующую детекцию фрагментов ДНК осуществляли в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Определение активности каспаз-3 и -8 проводили с помощью набора реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США).

Определение активности ферментов проводили на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением. О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм. Скорость ГП-реакции определяли по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДФН при протекании двух сопряженных реакций: генерации окисленного глутатиона (GSSG) под действием ГП и его последующего восстановления под действием ГР с использованием НАДФН. Активность ГР определяли спектрофотометрически по падению оптической плотности в результате окисления НАДФН. Об активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ судили по увеличению оптической плотности в результате восстановления НАДФ. О скорости ГТ-реакции судили по возрастанию оптической плотности опытных образцов при 340 нм в ходе реакции с 1-хлор, 2,4-динитробензолом. Активность АГ определяли спектрофотометрически при 233 нм. Активность СОД определяли на спектрофотометре при $\lambda=540$ нм по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзимотической системе феназинметасульфата и НАДН (Гуныко И.Н., 2002). В основе метода определения активности каталазы лежит способность H_2O_2 образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при $\lambda=410$ нм (Королюк М.А., 1988). Содержание общего белка определяли унифицированным биуретовым методом.

Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы. Содержание GSH определяли с помощью реакции его взаимодействия с 5,5- дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана). В ходе данной реакции в эквимолярных количествах образуется тионитрофенильный анион, имеющий максимум поглощения при 412 нм (Брусков В.И., 2001). Определение содержания цитрата проводили по методу Нательсона (Афанасьев В.Г., 1973).

Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов. 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. В качестве затравочного праймера использовали олиго-(dT)₁₅ праймер. Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I использовали набор реактивов фирмы «Синтол» (Россия) и комплект

генспецифических праймеров. Исследование проводили на приборе АНК – 32. Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода (Livak K. J., 2001).

Статистическая обработка экспериментальных данных. Опыты проводили в 16-18-ти 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. 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 $p < 0,05$ (Ллойд Э., 1990).

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА МАРКЕРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА И РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ЖИВОТНЫХ

В ходе исследования было установлено, что введение мелатонин-корректирующих препаратов крысам с СД2 приводило к снижению содержания глюкозы в сыворотке крови животных, возрастающей при патологии (табл. 1). Так, при введении эпифамина в дозе 1,2 мг/кг концентрация глюкозы в крови на 19 сутки после начала эксперимента снижалась в 1,7 раза, при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг – в 1,8 раза; 5,0 мг/кг – в 1,9 раза. При введении мелаксена в дозе 2,5 мг/кг концентрация глюкозы в крови на 19 сутки после начала эксперимента снижалась в 1,7 раза, при действии мелаксена в дозе 5 мг/кг – в 2,4 раза; 10 мг/кг – в 2,6 раза; 20 мг/кг – в 2,7 раза. В то же время, при введении вальдоксана в дозе 2,5 мг/кг концентрация глюкозы в крови снижалась в 1,7 раза, при действии вальдоксана в дозе 5,0 мг/кг – в 1,9 раза; 10,0 мг/кг – в 2,0 раза; 20,0 мг/кг – в 1,9 раза (табл. 1).

Можно предполагать, что наблюдаемый эффект объясняется повышением уровня мелатонина в организме. Это согласуется с имеющимися данными о снижении уровня гликемии при введении мелатонина при СД1 и СД2 (She M., 2009, Montilla P.L., 1998).

Введение мелатонин-корректирующих препаратов крысам с экспериментальным РА приводило к снижению уровня РФ и СОЭ, возрастающих у крыс с РА. Так, содержание РФ достоверно уменьшалось только при введении максимальной дозы эпифамина 2,5 мг/кг в 1,2 раза.

При действии эпифамина в дозах 1,2 и 2,5 мг/кг наблюдалось снижение СОЭ в 1,3 и 1,6 раза. На фоне введения мелаксена в дозе 5,0 мг/кг животным с патологией наблюдалось снижение РФ в 1,2 раза и СОЭ в 2,4 раза, в дозе

Таблица 1. Концентрация глюкозы в сыворотке крови крыс экспериментальных групп животных на 15, 17 и 19 день эксперимента

Группы животных	Концентрация глюкозы, мМ		
	15 день	17 день	19 день
1	5,00±0,24	5,26±0,23	5,50±0,26
2	9,02±0,41*	9,72±0,43*	13,74±0,64*
3	8,50±0,36**	8,12±0,33**	7,99±0,38**
4	8,18±0,38**	7,92±0,36**	7,71±0,34**
5	8,05±0,35**	7,87±0,36**	7,30±0,30**
6	8,51±0,39**	8,33±0,35**	8,30±0,33**
7	7,36±0,26**	6,96±0,24**	5,65±0,23**
8	7,71±0,37**	6,20±0,30**	5,33±0,23**
9	7,27±0,34**	5,98±0,27**	5,10±0,24**
10	8,22±0,37**	8,02±0,36**	7,88±0,36**
11	7,68±0,34**	7,41±0,32**	7,33±0,29**
12	7,66±0,35**	7,09±0,30**	6,82±0,28**
13	7,59±0,33**	7,25±0,32**	7,12±0,34**

Примечание: здесь и на рисунках 2, 3, 8 различия достоверны при $p < 0,05$; (*) - по сравнению с контрольной группой, (**) - по сравнению с группой с СД2.

10 мг/кг – в 1,4 и 2,9 раза соответственно (рис. 1). Вероятно, полученные данные об изменении маркерных показателей развития заболеваний при введении исследуемых препаратов обусловлены опосредованным воздействием данных веществ путем коррекции уровня и эффективности действия мелатонина в организме.

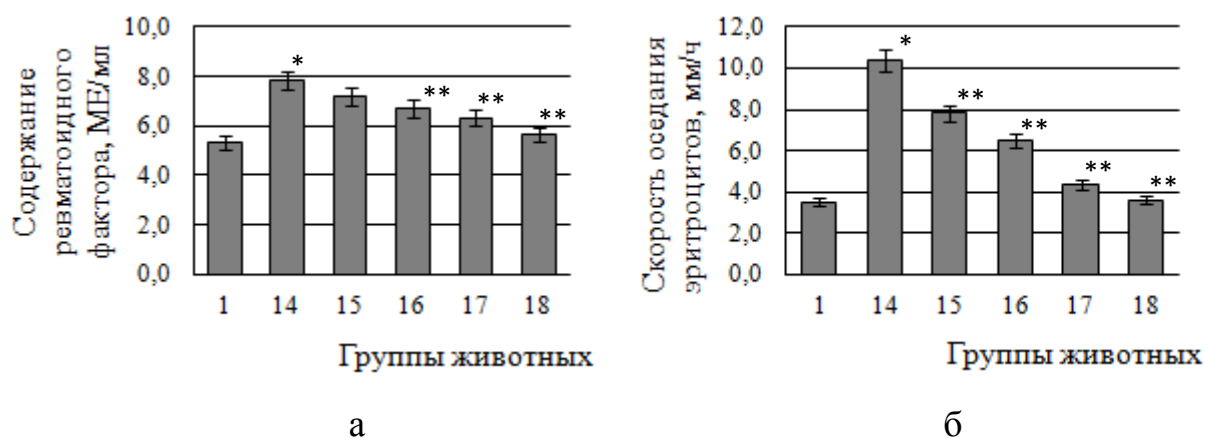


Рис. 1. Содержание ревматоидного фактора (а) и скорость оседания эритроцитов (б) в крови крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 (17) и 10 мг/кг (18)

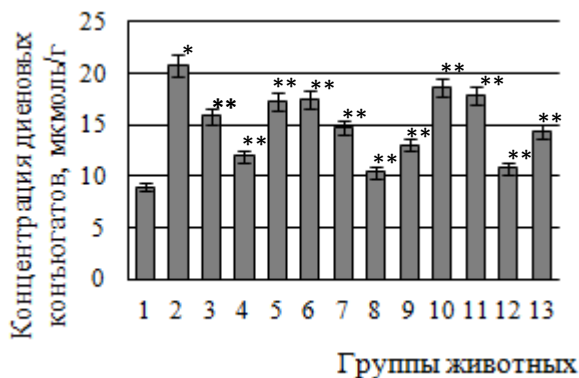
Примечание: здесь и на рисунках 4, 7, 9 различия достоверны при $p < 0,05$; (*) - по сравнению с контрольной группой, (**) - по сравнению с группой с РА.

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ БИОСУБСТРАТОВ В ТКАНЯХ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

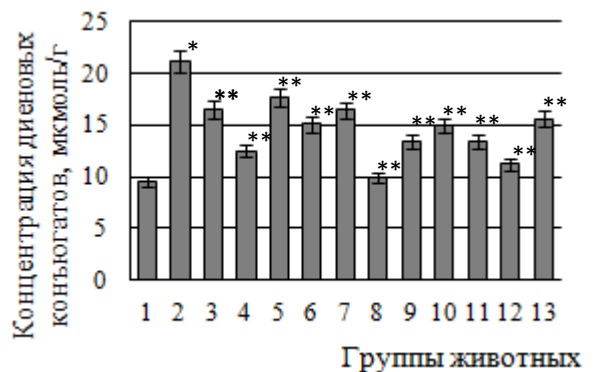
В ходе проведенного исследования было установлено, что при введении мелатонин-корректирующих препаратов наблюдается снижение параметров БХЛ, возрастающих при развитии СД2 и РА. Так, величина S при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг снижалась в печени, почках, сыворотке крови и сердце крыс с СД2 соответственно в 1,9, 1,6, 2,1 и 1,7 раза, $tg\alpha 2$ – в 1,5, 1,4, 1,9 и 1,6 раза, I_{max} – в печени и сыворотке в 1,7 раза, в почках в 2,0 раза, в сердце в 2,1 раза. Применение мелаксена и вальдоксана также приводило к снижению параметров БХЛ, при этом наибольшие изменения отмечены при введении протекторов в дозе 10 мг/кг. Введение эпифамина в дозе 2,5 мг/кг и мелаксена в дозе 10 мг/кг крысам с РА приводило к снижению S в сыворотке крови на 33% и 45%, I_{max} – в 1,5 и 1,4 раза, $tg\alpha 2$ – в 1,4 и 1,8 раза. В мышцах данные параметры изменялись сходным образом.

Введение мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 и РА приводило к снижению уровня первичных продуктов ПОЛ, возрастающего при патологии. Так, применение эпифамина в дозе 2,5 мг/кг, мелаксена и вальдоксана в дозе 10 мг/кг на фоне развития СД2 снижало содержание ДК в печени и почках в 1,7, 2,0, 1,9 раза, в сердце в 2,1, 2,9, 2,3 раза, в сыворотке крови в 1,4 раза (рис. 2). Введение эпифамина в дозе 2,5 мг/кг и мелаксена в дозе 10 мг/кг животным с РА приводило к уменьшению уровня ДК в сыворотке крови в 1,6 и 1,8 раза, в мышцах на 15% и 25% соответственно. Сходные изменения отмечены и при введении других доз исследуемых веществ.

Установлено, что применение мелатонин-корректирующих препаратов сопровождается снижением уровня апоптотических процессов в тканях крыс с СД2 и РА. Так, при введении мелаксена в дозе 10 мг/кг животным с СД2 наблюдалось снижение активности каспаз-3 и -8 в печени в 2,6 и 1,4 раза относительно значений при патологии (рис. 3). Использование указанной дозы мелаксена при РА уменьшало активность каспаз-3 и -8 в мышцах в 2,8 и 2,5 раза (рис. 4). Сходная тенденция была отмечена и при введении эпифамина.



а



б

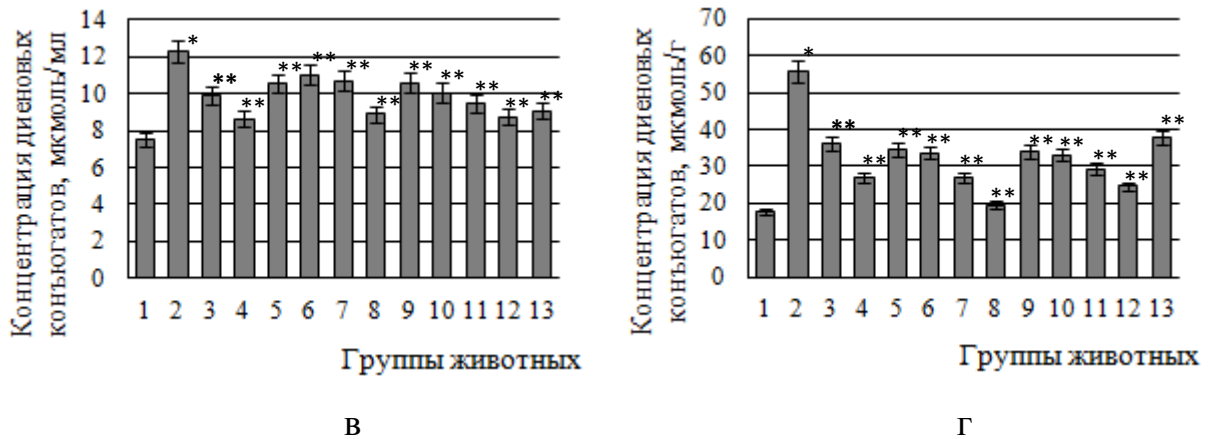


Рис. 2. Содержание диеновых конъюгатов в печени (а), почках (б), сыворотке крови (в) и сердце (г) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 (3), 2,5 (4) и 5,0 мг/кг (5), мелаксена в дозе 2,5 (6), 5,0 (7), 10 (8) и 20 мг/кг (9) и вальдоксана в дозе 2,5 (10), 5,0 (11), 10 (12) и 20 мг/кг (13)

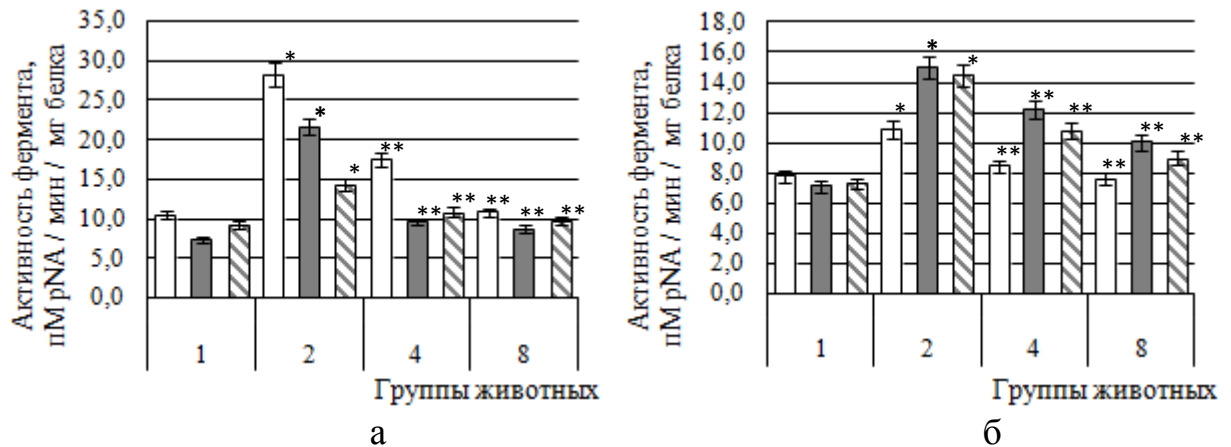


Рис. 3. Активность каспазы-3 (а) и каспазы-8 (б) в печени (□), почках (■) и сердце (▨) крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4) и мелаксена (8)

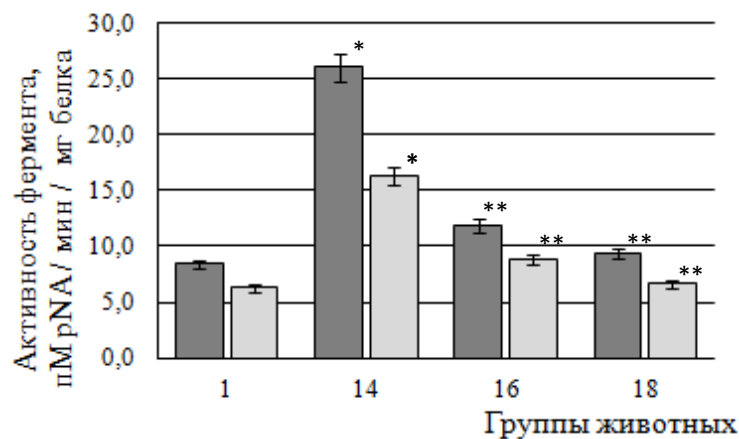


Рис. 4. Активность каспазы 3 (■) и каспазы 8 (▨) в мышцах крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

При этом наблюдалось значительное снижение степени фрагментации ДНК, возникающей при СД2 и РА (рис. 5, 6). Так, в образцах ДНК животных, которым вводили протекторы, не было выявлено совокупности полос, соответствующей низкомолекулярной ДНК, что указывает на способность исследуемых мелатонин-корректирующих препаратов оказывать антиапоптотический эффект.

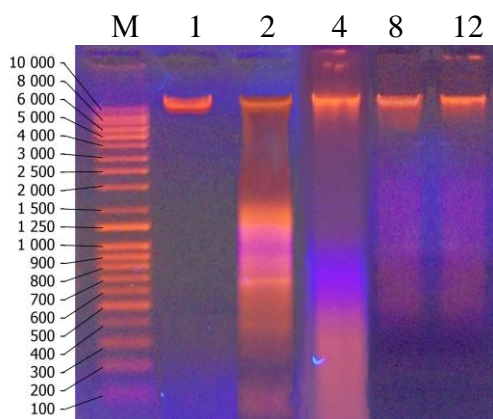


Рис. 5. Электрофореграмма образцов ДНК из сердца крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)

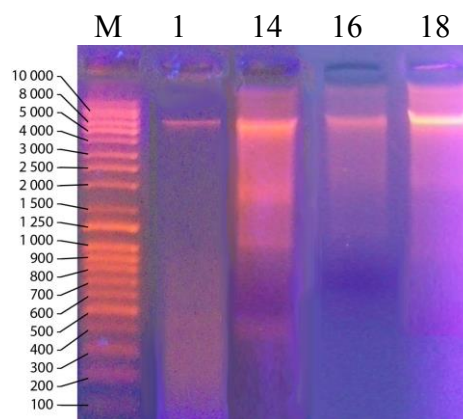


Рис. 6. Электрофореграмма образцов ДНК из мышечной ткани крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина (16) и мелаксена (18)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии способности у эпифамина, мелаксена и вальдоксана оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз, снижая степень проявления ОС при СД2 и РА.

ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРЕГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА И РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ У КРЫС

Изменение скорости протекания СРП в тканях экспериментальных животных указывает на необходимость оценки состояния антиоксидантной системы, ключевыми ферментами которой являются СОД, каталаза, ГП, ГР и ГТ. Установлено, что введение мелатонин-корректирующих препаратов крысам с СД2 и РА способствует снижению активности СОД и каталазы, возрастающей при патологии. Так, удельная активность указанных ферментов при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг снижалась в печени крыс с СД2 в 1,9 и 2,1 раза, в почках в 1,3 и 2,0 раза, в сыворотке крови в 1,7 и 2,3 раза, в сердце в 2,4 раза соответственно. При введении указанной дозы эпифамина на фоне развития РА удельная активность СОД и каталазы снижалась в сыворотке крови в 2,3 и 2,0 раза, в мышцах в 1,2 раза (рис. 7). Введение мелаксена в дозе 10 мг/кг животным с СД2 приводило к

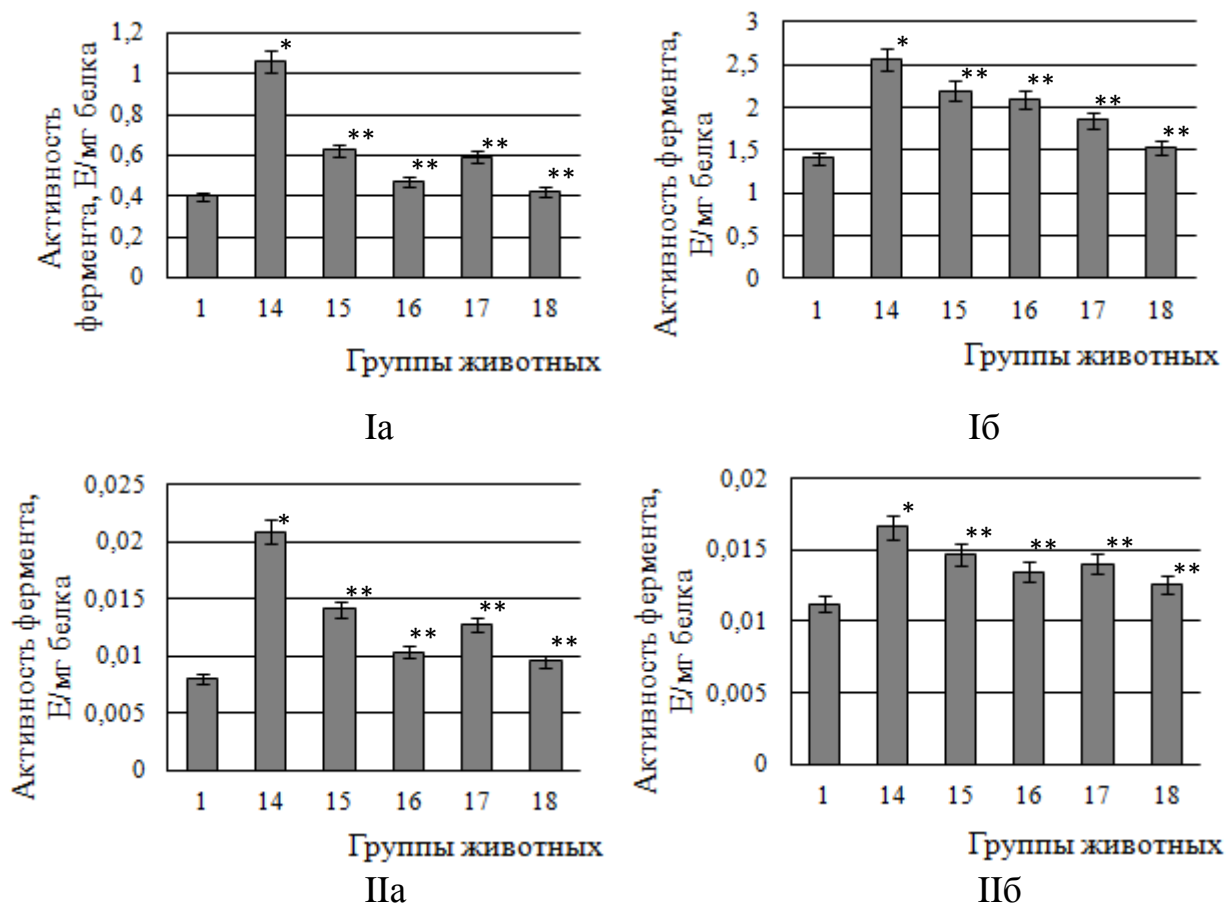


Рис. 7. Активность супероксиддисмутазы (I) и каталазы (II), выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 (17) и 10 мг/кг (18)

уменьшению активности СОД в печени в 2,0 раза, в почках и сыворотке крови в 1,3 раза и в сердце в 2,4 раза, каталазы – в 1,9, 1,6, 1,8 и 2,0 раза соответственно. При этом на фоне РА активность указанных ферментов снижалась в 2,5 и 2,2 раза в сыворотке крови и в 1,7 и 1,3 раза в мышцах (рис. 7). Применение вальдоксана в дозе 10 мг/кг на фоне развития СД2 приводило к снижению удельной активности СОД в печени в 1,8, в почках в 1,3 раза, в сыворотке в 1,5 раза и в сердце в 2,0 раза. Удельная активность каталазы при этом также снижалась на 73%, 57%, 75% и 95% соответственно. Изменения активности исследуемых ферментов в тканях животных других экспериментальных групп, которым вводили различные дозы протекторов, а также активность ферментов, выраженная в виде Е/г сырой массы ткани и Е/мл сыворотки, имели сходные тенденции.

Результаты проведенных исследований показали, что при введении мелатонин-корректирующих препаратов крысам с СД2 и РА наблюдается возрастание содержания GSH, уменьшение содержания которого отмечено при развитии патологий. При этом происходило снижение активности ГП и ГР. Так, при введении эпифамина в дозе 2,5 мг/кг на фоне развития СД2 активность указанных ферментов, выраженная в Е/г сырой массы ткани,

уменьшалась в печени в 1,7 и 1,5 раза, в почках в 1,5 и 1,4 раза, в сердце в 1,1 и 1,3 раза и, в виде Е/мл сыворотки крови, - в 2,0 и 1,7 раза соответственно. При этом активность ГТ снижалась в печени в 1,4 раза, в почках в 1,5 раза, в сыворотке крови в 1,3 раза и в сердце в 1,2 раза. Также отмечено снижение активности ГП и ГР, возрастающей при патологии, при введении указанной дозы эпифамина животным с РА в сыворотке крови на 37% и 78% и в мышцах на 21% и 27% соответственно. Активность ГТ, уменьшающаяся при РА, изменялась в сторону контрольных значений при введении эпифамина. Подобные изменения в активности ферментов глутатионовой АОС отмечены и при введении мелаксена и вальдоксана.

В ходе анализа уровня транскриптов генов, кодирующих СОД1, каталазу, ГП1 и ГР, установлено, что введение мелатонин-корректирующих препаратов способствует снижению экспрессии генов, указанных антиоксидантных ферментов, возрастающей при патологиях, сопряженных с развитием ОС. При этом наибольший эффект был отмечен при использовании мелаксена в дозе 10 мг/кг. Так, при действии данного препарата на фоне СД2 относительный уровень транскрипции генов *Sod1* и *Cat* снижался в печени в 1,4 и 1,9 раза, в почках в 1,8 и 1,3 раза, в сыворотке в 1,5 и 1,6 раза, в сердце в 2,0 и 1,3 раза. При этом, экспрессия генов *Gpx1* и *Gsr* уменьшалась в 2,1 и 1,6 раза в печени, в 1,5 и 1,6 раза в почках, в 1,4 раза в сыворотке и в 1,5 и 2,4 раза в сердце относительно уровня при СД2 (рис. 8).

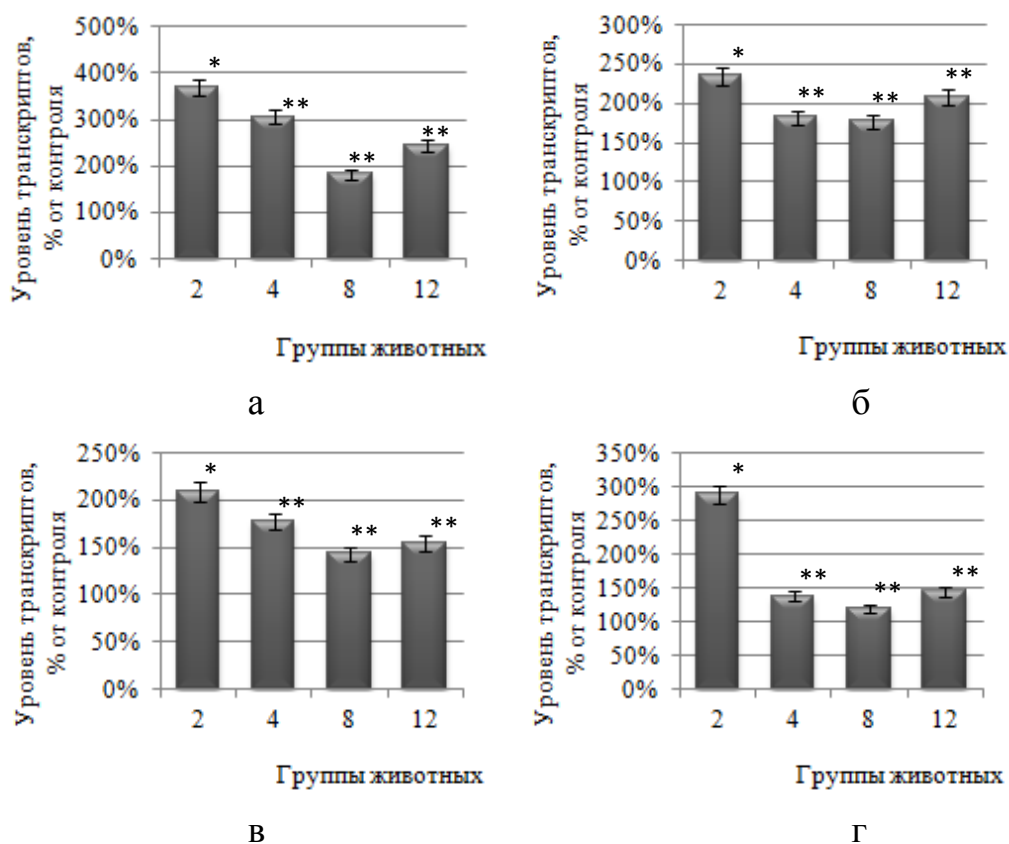


Рис. 8. Уровень транскриптов генов *Sod1* (а), *Cat* (б), *Gpx1* (в) и *Gsr* (г) в сердце крыс контрольной группы (1), животных с сахарным диабетом 2 типа (2) и при введении животным с патологией эпифамина (4), мелаксена (8) и вальдоксана (12)

Кроме того, введение мелаксена животным с РА приводило к уменьшению уровня транскриптов генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx1* и *Gsr* в крови в 2,6, 1,5, 1,9 и 1,8 раза, в мышцах – в 1,9, 1,3, 1,7 и 1,8 раза соответственно.

Снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов при введении мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития СД2 и РА, вероятно, происходит благодаря антиоксидантному действию этих препаратов, снижающих мобилизацию ферментов АОС. Известно, что гены СОД, каталазы и ГП имеют в области промотора сайт связывания для редокс-чувствительного транскрипционного ядерного фактора NF-κB (Tomas-Zarico S., 2005), который контролирует экспрессию ряда генов, играющих важную роль в ответе на стресс. Кроме того, транскрипция гена ГР находится в зависимости от степени восстановленности транскрипционного фактора ОхуR (Николайчик Е.А., 2007). Очевидно, введение исследуемых веществ сопровождалось торможением интенсивности СРП в организме животных и соответствующим снижением степени мобилизации данных ферментов антиоксидантной защиты, сопряженным с уменьшением расхода восстановленного глутатиона. Кроме того, существуют литературные данные, что мелатонин способен активировать синтез глутатиона путем индукции гамма-глутамилцистеинсинтетазы (Urata Y., 1999).

АКТИВНОСТЬ НАДФН-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИН-КОРРЕКТИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ ЖИВОТНЫМ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Нормальное функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов. В этой связи была произведена оценка изменений активностей НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 и РА. Отмечено, что при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг на фоне СД2 удельная активность НАДФ-ИДГ, возрастающая при патологии, снижалась в печени и сердце в 1,7 раза, в почках в 1,9 раза, в сыворотке в 1,5 раза; при действии мелаксена в дозе 10 мг/кг – в 1,5, 1,4, 1,7 и 1,1 раза; при введении вальдоксана в дозе 10 мг/кг – в 1,9, 1,4, 1,7 и 1,5 раза соответственно (рис. 8). Удельная активность НАДФ-ИДГ при введении эпифамина в дозе 2,5 мг/кг и мелаксена в дозе 10 мг/кг при развитии экспериментального РА снижалась в 1,5 и 2,2 раза в сыворотке крови и в 1,5 и 1,7 раза в мышцах относительно значений при патологии (рис. 9).

Установлено, что активность Г6ФДГ в тканях крыс с СД2 снижалась относительно контрольных значений. Наблюдаемые изменения активности данного фермента могут быть связаны с активацией определенных метаболических путей, характерных для данной патологии. Известно, что при СД снижена интенсивность функционирования пентозофосфатного пути (McLennan S.V., 1991). Это, вероятно, связано с подавлением синтеза глюкокиназы и индукцией глюкозо-6-фосфатазы в печени, вследствие чего уменьшается доступность глюкозо-6-фосфата для Г6ФДГ (Адо А.Д., 1980).

При введении эпифамина в дозе 2,5 мг/кг крысам с СД2 наблюдалось повышение удельной активности Г6ФДГ в печени и сердце в 1,2 раза, почках в 1,3 раза, в сыворотке крови в 1,4 раза. Введение мелаксена животным с патологией оказывало сходный эффект по отношению к удельной активности Г6ФДГ в исследуемых тканях. Так, в дозе 10 мг/кг мелаксен вызывал увеличение активности фермента в печени в 1,2 раза, в почках и сердце в 1,4 раза, в сыворотке в 1,5 раза. Введение вальдоксана в дозе 10 мг/кг животным с СД2 повышало активность Г6ФДГ в печени, почках и сердце в 1,3 раза и в сыворотке крови в 1,5 раза. В группе животных с РА отмечено возрастание активности Г6ФДГ, что, по-видимому, является ответной реакцией организма на стресс. Введение мелатонин-корректирующих препаратов крысам с экспериментальным РА изменяло значение активности Г6ФДГ в сторону контрольных значений. Так, удельная активность фермента при действии эпифамина в дозе 2,5 мг/кг снижалась в сыворотке крови и мышцах на 92% и 34%. Использование мелаксена в дозе 10 мг/кг на фоне развития РА снижало активность исследуемого фермента в 2,1 раза в сыворотке и в 1,5 раза в мышцах. Введение мелатонин-корректирующих препаратов, способствовало торможению процессов СО, снижая степень мобилизации ГР/ГП АОС и уменьшая активность НАДФН-генерирующих ферментов.

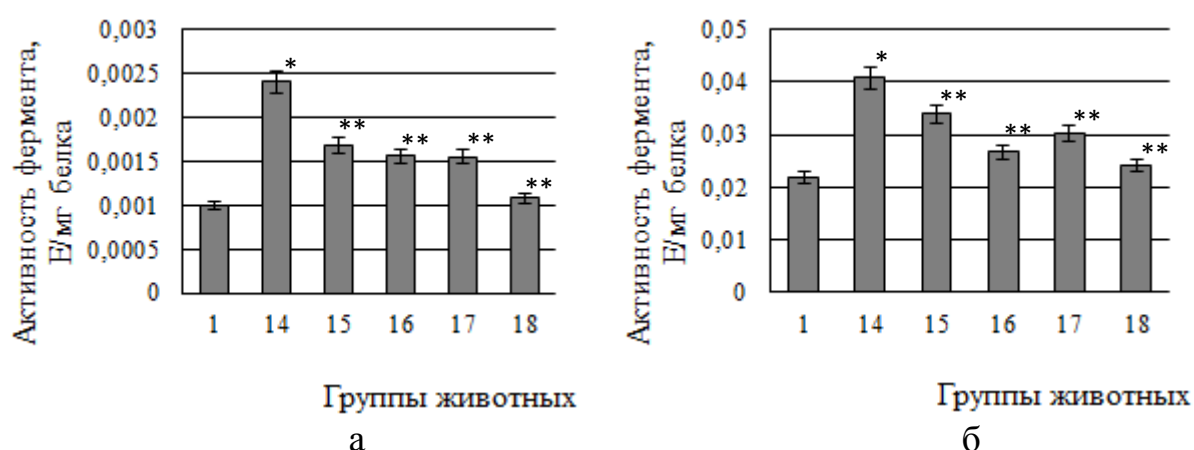


Рис. 9. Активность НАДФ-изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/мг белка, в сыворотке крови (а) и мышцах (б) крыс контрольной группы (1), животных с экспериментальным ревматоидным артритом (14) и при введении животным с патологией эпифамина в дозе 1,2 (15) и 2,5 мг/кг (16) и мелаксена в дозе 5,0 (17) и 10 мг/кг (18)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из ключевых факторов развития как СД2, так и РА, а также связанных с ними осложнений, является ОС, сопровождающийся нарушением скорости продукции и утилизации свободных радикалов. Установлено, что при СД2 увеличивается продукция O_2^- митохондриальными клетками (Brownlee M., 2001), ксантинооксидазой, цитохромом Р-450, а также путем протеинкиза С-зависимой активации НАДН/НАДФН-оксидазы (Inoguchi T., 2000). Развитие РА сопровождается колебаниями содержания кислорода в синовиальной жидкости вследствие

ишемии-реперфузии, патологического ускорения метаболизма тканей и устойчивой деформации суставов (Blake D.R., 1989). В ответ на частые изменения парциального давления кислорода, механических нагрузок, содержания иммуномодулирующих и воспалительных медиаторов хондроциты начинают продуцировать повышенный уровень АФК (Hayashi T., 1997; Henrotin Y., 1993; Tiku M.L., 1990). Это ведет к повреждению структуры и функций биополимеров, результатом чего может явиться гибель клеток.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что при введении мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития патологий, сопряженных с развитием ОС – СД2 и РА, происходит снижение показателей, отражающих интенсивность СРП. Так, отмечено уменьшение параметров БХЛ – S и I_{max} , а также уровня ДК в исследуемых тканях экспериментальных животных (рис. 10). Полученные данные свидетельствуют о способности исследуемых веществ снижать уровень ОС.

В условиях развития патологического состояния наблюдалось снижение активности АГ в исследуемых тканях животных, что, вероятно, связано с окислительной модификацией активного центра фермента под действием АФК. На фоне этого отмечено возрастание уровня цитрата. Введение препаратов, корректирующих уровень мелатонина, способствовало росту активности АГ и снижению концентрации цитрата, обусловленному, по-видимому, снижением уровня ОС при действии исследуемых веществ, что может способствовать регенерации активного центра АГ и метаболизации цитрата в реакции, катализируемой данным ферментом.

Наряду с этим, на фоне введения мелатонин-корректирующих препаратов отмечено изменение активности каспаз и степени фрагментации ДНК. Согласно полученным данным активность ключевых маркеров апоптоза – каспаз-3 и -8 – возрастала при развитии патологических состояний. При введении мелатонин-корректирующих препаратов наблюдалось изменение активности указанных протеаз в сторону контрольных значений. Кроме того, введение протекторов крысам с исследуемыми патологиями способствовало снижению степени фрагментации ДНК в тканях по сравнению с животными с экспериментальными СД2 и РА, у которых при электрофорезе визуализировалась характерная «апоптотическая лестница» (рис. 10). Очевидно, что указанные эффекты исследуемых веществ могут быть свидетельством их антиапоптотического действия.

Установлено, что под воздействием мелатонин-корректирующих препаратов на фоне развития патологий происходила коррекция функционирования компонентов АОС, что, вероятно, связано с проявлением ими антиоксидантных свойств. Это подтверждается снижением тангенса угла падения кинетической кривой – параметра БХЛ, характеризующего общий антиоксидантный потенциал.

Кроме того, при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным на фоне развития СД2 и РА, наблюдалось изменение активности СОД и каталазы в исследуемых тканях животных, увеличивающейся при патологии, в сторону контрольных значений, что может быть связано с антиоксидантным действием исследуемых веществ посредством их влияния на метаболизм мелатонина. Показано, что введение эпифамина, мелаксена и вальдоксана при СД2 и РА приводило к возрастанию уровня GSH в исследуемых тканях животных. Наряду с этим, отмечено снижение каталитической активности ГП, ГР и ГТ при введении лекарственных средств животным с СД2, что может быть сопряжено с торможением скорости СРП в организме животных при использовании протекторов и соответствующем снижении степени мобилизации данных ферментов антиоксидантной защиты. Также, активность ГП и ГР, возрастающая при экспериментальном РА, снижалась при введении эпифамина и мелаксена. При этом активность ГТ, снижающаяся у животных с РА, изменялась в направлении контрольных значений при введении мелатонин-корректирующих препаратов, что, вероятно, обусловлено метаболическими изменениями в тканях крыс на фоне развития аутоиммунного процесса и действия протекторов (рис. 10).

Функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов, которое осуществляют ферменты НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ. В ходе эксперимента было показано, что введение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к снижению активности НАДФ-ИДГ, возрастающей при развитии СД2 и РА, в исследуемых тканях животных. Введение мелатонин-корректирующих препаратов способствовало изменению активности фермента в сторону контрольных значений. Применение эпифамина и мелаксена на фоне развития экспериментального РА снижало активность Г6ФДГ, возрастающую у животных с патологией (рис. 10). По-видимому, снижение интенсивности функционирования глутатионовой АОС при введении исследуемых веществ, способствующих торможению процессов СО, проявляется и в уменьшении активности НАДФН-генерирующих ферментов.

Использование метода ПЦР в режиме реального времени позволило оценить изменение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов. Показано, что применение мелатонин-корректирующих препаратов при развитии СД2 и РА приводило к снижению уровня транскриптов генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx1* и *Gsr*, возрастающего при данных заболеваниях в исследуемых тканях крыс, что согласуется с результатами определения активности данных ферментов. Полученные данные свидетельствуют, что изменение каталитической активности ферментов под действием мелатонин-корректирующих препаратов может быть обусловлено снижением скорости их синтеза.

Таким образом, введение мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина, мелаксена и вальдоксана, при патологиях, сопряженных с развитием ОС – СД2 и РА, оказывает положительное воздействие на

свободнорадикальный гомеостаз. Исследуемые вещества, благодаря воздействию на метаболизм мелатонина и его рецепторы, способны снижать интенсивность СРП, что уменьшает функциональную нагрузку на АОС. Кроме того, положительная динамика в изменении маркерных показателей развития СД2 и РА при введении мелатонин-корректирующих препаратов позволяет рассматривать их в качестве потенциальных терапевтических агентов для лечения указанных заболеваний. На основании полученных результатов представлена гипотетическая схема, отражающая участие мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при ОС, индуцированном развитием СД2 и РА.

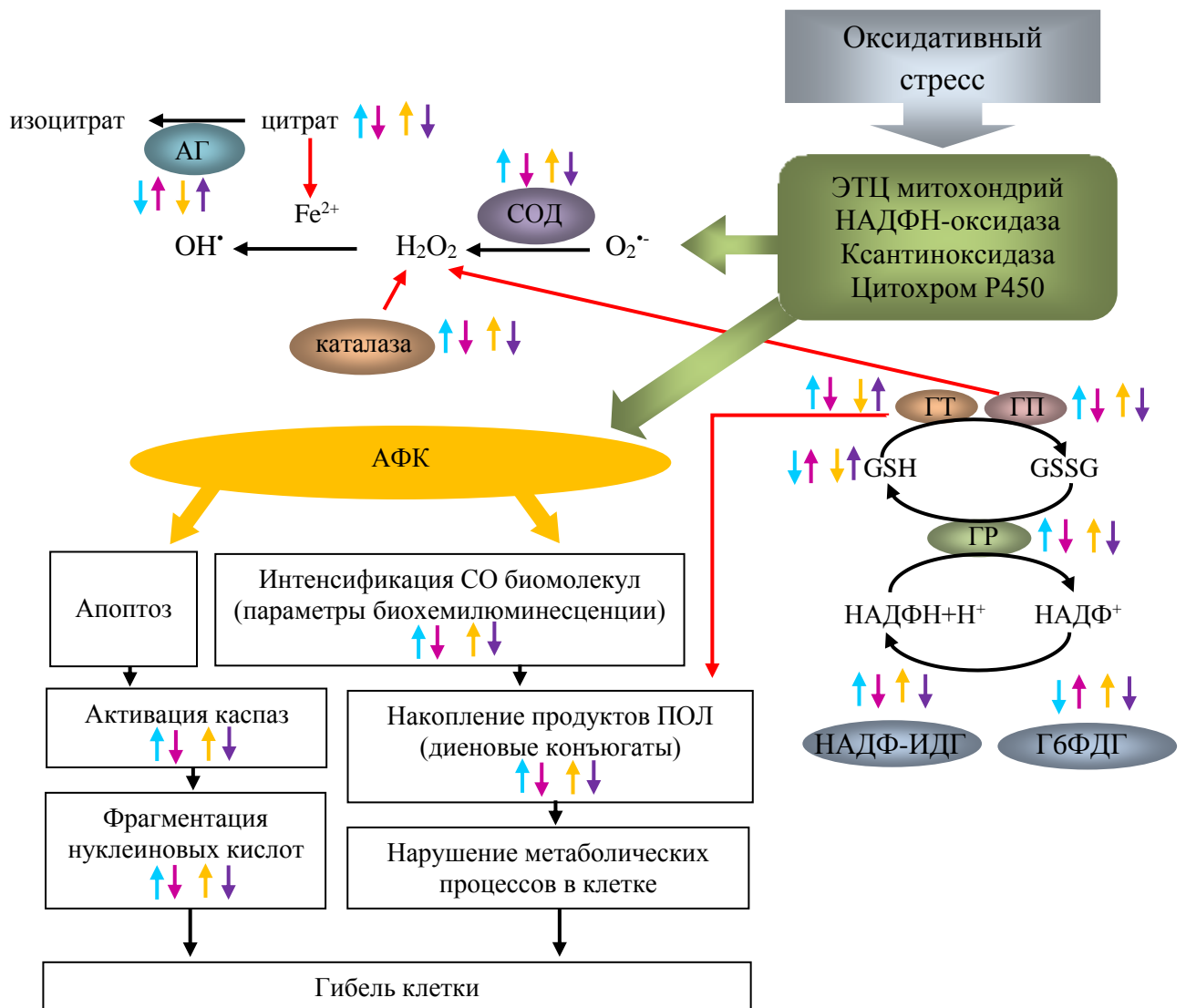


Рис. 10. Гипотетическая схема, отражающая участие мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при патологиях, сопряженных с развитием окислительного стресса

Условные обозначения: $\uparrow\downarrow$ - изменение параметра при сахарном диабете 2 типа; $\uparrow\downarrow$ - изменение параметра при введении мелатонин-корректирующих препаратов крысам с сахарным диабетом 2 типа; $\uparrow\downarrow$ - изменение параметра при ревматоидном артрите; $\downarrow\uparrow$ - изменение параметра при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным на фоне ревматоидного артрита

ВЫВОДЫ

1. Воздействие эпифамина, мелаксена и вальдоксана при развитии СД2 приводило к снижению концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс, возрастающей при патологии. Отмечено также изменение маркерных показателей РА, увеличивающихся в патологическом состоянии, в направлении контрольных значений. Эти результаты свидетельствуют о способности изучаемых препаратов оказывать протекторное действие при развитии патологий, сопряженных с ОС.

2. Установлено, что исследуемые лекарственные средства обладают выраженным антиоксидантным эффектом, снижая интенсивность свободнорадикального окисления биомолекул в тканях крыс, что подтверждается полученными данными об уменьшении показателей S и I_{max} хемилюминесценции, а также концентрации ДК, возрастающих при СД2 и РА.

3. Активность каспазы-3 и -8 и степень фрагментации ДНК снижалась под воздействием мелатонин-корректирующих препаратов у животных с индуцируемыми патологиями, что указывает на способность исследуемых веществ оказывать воздействие на интенсивность апоптоза в тканях крыс.

4. Показано, что под влиянием мелатонин-корректирующих препаратов активность антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы, ГП, ГР, ГТ – изменялась в сторону показателей, характерных для контрольных крыс. Факт уменьшения степени мобилизации антиоксидантных ферментов по сравнению с СД2 и РА подтверждается также изменением значений tgα2 БХЛ в направлении контрольных значений.

5. При введении эпифамина, мелаксена и вальдоксана животным с СД2 и РА отмечено снижение уровня транскриптов генов, кодирующих СОД1, каталазу, ГП1 и ГР, по сравнению со значениями при патологии.

6. Активность ферментов окислительного метаболизма при введении мелатонин-корректирующих препаратов животным с СД2 и РА, изменяющаяся при патологии, приближалась к контрольным показателям.

7. На основании проведенных исследований предложена гипотетическая схема, отражающая участие мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при патологиях, сопряженных с развитием ОС.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Попова Т. Н. Интенсивность свободнорадикальных процессов в печени крыс при сахарном диабете 2 типа и введении эпифамина / Т. Н. Попова, А. А. Агарков, А. Н. Веревкин // АСТА NATURAE. – 2013. – Т. 5, № 3(18). – С. 45-50.

2. Агарков А.А. Активность глутатионовой антиоксидантной системы и НАДФН–генерирующих ферментов в сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2–го типа и воздействии препаратов, корректирующих уровень мелатонина / А.А. Агарков, Т.Н. Попова, А.Н. Веревкин, Л.В.Матасова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2014. – Т. 157, № 2. – С. 158-162.

3. Воздействие мелаксена на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность некоторых антиоксидантных ферментов в печени и сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2 типа / А.Н. Веревкин, Т.Н. Попова, А.А. Агарков, А.В. Семенихина // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 5. – С. 640-645.

4. Влияние эпифамина на систему детоксикации супероксидного анион радикала в печени и сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2 типа / А.Н. Веревкин, А.А. Агарков, Т.Н. Попова, М.В. Величко // Материалы Международной научно-практической интернет-конференции «Генетико-биохимические аспекты современной биологии клетки», 22 декабря 2011г.: тез. докл. – Саранск, 2012. – С. 63-65.

5. Исследование активности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сыворотке крови крыс при введении эпифамина на фоне экспериментального сахарного диабета 2 типа / Попова Т.Н., Агарков А.А., Веревкин А.Н., Пронина М.П. // Материалы V Международной научно-практической конференции «Современное состояние естественных и технических наук», Москва, 30 декабря 2011г.: тез. докл. – М., 2011. – С. 75-77.

6. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени крыс с сахарным диабетом 2 типа при действии эпифамина / Агарков А.А., Попова Т.Н., Веревкин А.Н., Склярова Е.И. // Материалы III Международной научно-практической конференции «Проблемы современной биологии», Москва, 19 января 2012г.: тез. докл. – М., 2012. – С. 10-12.

7. Активность СОД и каталазы в сердечной мышце крыс с сахарным диабетом 2 типа и при действии эпифамина на фоне патологии / Попова Т.Н., Агарков А.А., Веревкин А.Н., Попов С.С., Пронина М.П., Клокова А.И. // VII Международная научно-практическая телеконференция «Актуальные проблемы современной науки», Томск, 27 февраля – 3 марта 2012г.: тез. докл. – Томск, 2012. – С. 85-86.

8. Влияние эпифамина на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в печени крыс с сахарным диабетом 2 типа / Агарков А.А., Веревкин А.Н., Склярова Е.И., Пронина М.П., Величко М.В. // XVIII Межгородская конференция молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 25-26 апреля 2012г.: тез. докл. – СПб., 2012. – С. 4-5.

9. Влияние эпифамина на уровень восстановленного глутатиона и активность глутатионтрансферазы в печени крыс при сахарном диабете 2 типа / Агарков А.А., Веревкин А.Н., Попов С.С., Склярова Е.И., Пронина М.П., Величко М.В. // Сборник тезисов научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию профессора А.А. Чумакова «Актуальные вопросы медицинской науки», Ярославль, 8 – 20 апреля 2012г.: тез. докл. – Ярославль, 2012. – С. 60-61.

10. Влияние эпифамина на интенсивность параметров биохемилюминесценции в печени крыс при сахарном диабете 2-го типа / Агарков А.А., Попова Т.Н., Веревкин А.Н., Попов С.С., Пронина М.П., Склярова Е.И., Клокова А.И. // Сборник трудов Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Медико-

биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни», Воронеж, 25 апреля 2012г.: тез. докл. – Воронеж, 2012. – С. 226-228.

11. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2 типа и введении мелаксена / А.А. Агарков, А.Н. Веревкин, М.В. Величко, А.В. Шевелева // XIX Межгородская конференция молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 10-11 апреля 2013г.: тез. докл. – СПб., 2013. – С. 4-5.

12. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2 типа на фоне введения мелаксена / А.Н. Веревкин, Т.Н. Попова, А.А. Агарков, А.И. Балдина // Материалы IX международной научно-практической конференции «Современные достижения науки-2013», Прага, 27 января – 5 февраля 2013г.: тез. докл. – Прага, 2013. – С. 42-42.

13. Влияние мелаксена на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в печени крыс при сахарном диабете 2 типа / А.Н. Веревкин, А.А. Агарков, Т.Н. Попова, С.С. Попов // Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2013», Воронеж, 16-25 апреля 2013г.: тез. докл. – Воронеж, 2013. – С. 226-228.

14. Содержание цитрата и активность аконитатгидратазы в сердечной мышце крыс с сахарным диабетом 2 типа и введении эпифамина / А.А. Агарков, Т.Н. Попова, А.Н. Веревкин, С.С. Попов, А.И. Балдина, А.В. Шевелева // Сборник научных статей II Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием (25 апреля 2013 г.) «Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни»: тез. докл. – Воронеж, 2013. – С. 143-145.

15. Дозозависимое влияние эпифамина на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа / А.А. Агарков, Т.Н. Попова, А.Н. Веревкин, А.В. Шевелева // VI Всероссийский с международным участием Конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013», Иркутск, 19-23 августа 2013г.: тез. докл. – Иркутск, 2013. – С. 423-424.

16. Воздействие мелаксена на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сердце и почках крыс при сахарном диабете 2 типа / А.Н. Веревкин, Т.Н. Попова, А.А. Агарков, Е.О. Чудинова, А.В. Макеева // Материалы 10 научно-практической конференции «Актуальные научные разработки – 2014», София, 17-25 января 2014г.: тез. докл. – София, 2014. – С. 98-102.

17. Активность глутатионтрансферазы и уровень восстановленного глутатиона в печени крыс при сахарном диабете 2 типа на фоне введения мелаксена / А.Н. Веревкин, Т.Н. Попова, А.А. Агарков, Е.О. Чудинова, С.С. Попов // Сборник материалов Всероссийской конференции с международным участием, посвящённой 85-летию со дня рождения В.А. Кухтина «Современные проблемы химической науки и фармации», Чебоксары, 3-4 апреля 2014 г.: тез. докл. – Чебоксары, 2014. – С. 147-148.

18. Воздействие мелаксена на интенсивность свободнорадикальных процессов в сыворотке крови крыс с сахарным диабетом 2 типа / А.Н. Веревкин,

Т.Н. Попова, А.А. Агарков, Е.О. Чудинова, А.В. Макеева // XIII Всероссийская молодежная научная конференция Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», Сыктывкар, 22-23 апреля 2014 г.: тез.докл. – Сыктывкар, 2014. – С. 29-32.

19. Веревкин А.Н. Фрагментация ДНК и активность каспаз в печени крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа и действии эпифамина / А.Н. Веревкин, А.А. Агарков, Т.Н. Попова // Международная научная конференция «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике». Сборник тезисов. – Воронеж, 2015. – С. 27-31.

20. Веревкин А.Н., Агарков А.А., Попова Т.Н. Влияние эпифамина и мелаксена на интенсивность свободнорадикальных процессов в сыворотке крови крыс с экспериментальным ревматоидным артритом // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета (4-5 февраля 2016). – Курск, 2016. – Т. 2. – С. 369-371.

21. Веревкин А. Н., Агарков А. А., Попова Т. Н., Голикова М. А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в мышцах крыс при развитии ревматоидного артрита и введении эпифамина // 21-ая международная научно-практическая конференция «Роль науки в развитии социума: теоретические и практические аспекты». – Екатеринбург, 2016. – С. 43-44.

22. Веревкин А.Н., Агарков А.А., Попова Т.Н., Балалаева К.Н. Определение влияния мелаксена на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сыворотке крови крыс при ревматоидном артритом // XI международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы современных наук – 2016». – Пшемысль, 2016. – С. 10-12.

23. Веревкин А.Н., Агарков А.А., Попова Т.Н. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на уровень восстановленного глутатиона и активность глутатионтрансферазы в сыворотке крови и мышцах крыс с ревматоидным артритом // Сборник статей по материалам XLII-XLIII международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии». – Москва, 2016. – С. 49-53.

24. Веревкин А.Н., Агарков А.А., Попова Т.Н., Синило П.А. Активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, а также НАДФН-генерирующих ферментов в сыворотке крови при введении эпифамина и мелаксена крысам с ревматоидным артритом // Международная научно-практическая конференция «Современные достижения и разработки в области медицины и фармакологии». – Хабаровск, 2016. – С. 18-22.

25. Веревкин А.Н., д.б.н. Попова Т.Н., к.б.н. Агарков А.А., Пушкарева Т.Ю., Фоминова У.Н., Синило П.А. Дозозависимое влияние эпифамина и мелаксена на активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови крыс с ревматоидным артритом // XI Международная научно-практическая конференция «Перспективы мировой науки – 2016». – Шеффилд, 2016. – С. 53-55.

Работы 1-3 опубликованы в печатных изданиях, входящих в список журналов, рекомендованных ВАК РФ, а также в базы цитирования Web of Science и Scopus

Список используемых сокращений

АГ – аконитатгидратаза;
АОС – антиоксидантная система;
АФК – активные формы кислорода;
БХЛ – биохемилюминесценция
Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
ГП – глутатионпероксидаза;
ГР – глутатионредуктаза;
ГТ – глутатионтрансфераза;
ДК – диеновые конъюгаты;
НАДФ-ИДГ – НАДФ-изоцитратдегидрогеназа;
ОС – оксидативный стресс;
ПОЛ – пероксидное окисление липидов;
РА – ревматоидный артрит;
РФ – ревматоидный фактор;
СД2 – сахарный диабет 2 типа;
СО – свободнорадикальное окисление;
СОД – супероксиддисмутаза;
СОЭ – скорость оседания эритроцитов;
СРП – свободнорадикальные процессы;
GSH – восстановленный глутатион;
GSSG – окисленный глутатион;
 I_{\max} – интенсивность вспышки хемилюминесценции;
S – светосумма хемилюминесценции;
 $\text{tg}\alpha_2$ – величина тангенса угла наклона касательной к кривой хемилюминесценции.