

Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет імені Івана Франка

ТКАЧЕНКО ВІКТОРІЯ АНДРІЇВНА

УДК 616.127-005.4-085-092.9:577.112.4

**ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА ШЛЯХИ ЇЇ ЗАПОБІГАННЯ ЗА
УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ МІОКАРДА**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біохімії та медичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Шевцова Алла Іванівна
ДЗ «Дніпропетровська медична академія
МОЗ України», професор кафедри біохімії та
медичної хімії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сибірна Наталія Олександрівна
Львівський національний університет
імені Івана Франка
завідувач кафедри біохімії

доктор біологічних наук, доцент
Фоменко Ірина Степанівна
Львівський національний медичний
університет імені Данила Галицького,
професор
кафедри біологічної хімії

Захист відбудеться “19” квітня 2019 р. о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 у Львівському національному університеті імені Івана Франка МОН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий “ ” _____ 2019 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14
кандидат біологічних наук, доцент

М. В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Ішемічна хвороба серця (ІХС) займає перше місце серед причин інвалідизації та смертності у більшості економічно розвинених країн. В Україні смертність від хвороб серця та системи кровообігу у 2-4 рази вища ніж у країнах ЄС та світу, причому в нашій країні вмирають від цих захворювань не тільки частіше, але й переважно у молодому віці (Гандзюк, 2014; Дяченко, 2016). До числа чинників, що провокують розвиток ІХС, відносять активні форми кисню (АФК), рівень яких стрімко зростає при ішемії-реперфузії і «запускає» процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Активація ПОЛ призводить до порушення структури та проникності мембран кардіоміоцитів, ступінь ураження яких значною мірою залежить від активності ензимів системи антиоксидантного захисту. Вважають, що зсув рівноваги між про- та антиоксидантною системами у клітинах серцевого м'яза та судинному ендотелії є основою розвитку окисного стресу (ОС), призводячи до окисної модифікації білків (ОМБ) і підсилення експресії генів прозапальних та проапоптотичних білків (Reznikov, 2014; Цвях, 2016). Останнім часом ОС пов'язують з утворенням активних карбонільних сполук (АКС) і формуванням кінцевих продуктів глікації (КПГ) (Nowotny, 2015; Kiyunaa, 2018). Раніше утворення цих речовин пояснювали тривалою гіперглікемією, що спостерігається при цукровому діабеті, але окремі роботи свідчать, що вони беруть участь у патогенезі інших захворювань, не пов'язаних з цукровим діабетом (Ott, 2014; Rabbani, 2015). Встановлена роль КПГ у патогенезі кардіоренального синдрому (Willemssen, 2012), але досліджень, присвячених ролі ОМБ та КПГ у розвитку ІХС недіабетичного походження, практично немає.

Накопичення ОМБ може не тільки змінювати властивості протеїнів, а й запускати окремі механізми сигналіngu після їх взаємодії з рецепторами. Серед таких рецепторів варто уваги галектин-3 (AGE-R3), який бере участь у розвитку атеросклеротичних змін судинного ендотелію (Menini, 2013; Drechsler, 2015). Підвищення рівня цього лектину розглядають як маркер ускладнень гострого інфаркту міокарда та фактор високого ризику смерті (O'Sullivan, 2016; Yu L, 2012). Однак відомостей стосовно взаємозв'язку AGE-R3 з рівнем КПГ та ОМБ за серцево-судинної патології не знайдено, хоча такі дані можуть мати велике значення в діагностиці і моніторингу ефективності терапевтичних заходів у хворих після гострого інфаркту міокарда.

Оскільки ішемія міокарда пов'язана з генеруванням АФК та активацією процесів ОМБ, значна увага приділяється пошуку препаратів, що можуть проявляти кардіопротекторні властивості за рахунок гальмування зазначених процесів або активації знешкодження токсичних продуктів карбонільно-окисного стресу (КОС). До зазначеної групи препаратів відносяться біофлавоноїд кверцетин, аміногуанідин, 2-оксоглутарат, які досить широко використовуються в профілактиці запальних процесів (Liu G, 2017; Sadowska-Bartosz, 2015; Zdzisińska, 2017; Cheng, 2019), але роботи, присвячені впливу цих речовин на показники КОС та шляхи знешкодження його токсичних продуктів

при ішемії міокарда, практично відсутні. Одним зі способів знешкодження ОМБ-КПГ може бути їх деградація під дією протеолітичних ферментів, серед яких складові убіквітин-протеасомної системи (Uchiki, 2012; Teodorowicz, 2018). Останнім часом з'явилися нові дослідження щодо кардіопротекторної дії доксицикліну. Цей тетрацикліновий антибіотик здатний інгібувати матриксні металопротеїнази та протеоліз у позаклітинному матриксі. Разом з тим присутність багатозаміщеного фенольного кільця може забезпечити нейтралізацію вільних радикалів (Elewa, 2015), тому в роботі була висунута гіпотеза про здатність цього препарату пригнічувати КОС в залежності від дози. В кардіології широко використовують антагоністи альдостерону, серед яких особливу увагу привертає еплеренон проте молекулярні механізми його лікувальної дії остаточно не з'ясовані. Аналіз літературних даних наводить на думку, що цей препарат може впливати на посттрансляційні модифікації, процеси сигналювання та деградації модифікованих протеїнів (Кисельов, 2015; Yugar-Toledo, 2017). Зважаючи на вищесказане, актуальним напрямком є дослідження показників КОС та їх знешкодження при експериментальній ішемії міокарда, оцінка впливу антиоксидантів та кардіопротекторних препаратів на ці показники і обґрунтування гіпотези про роль КОС в розвитку серцево-судинних захворювань недіабетогенного походження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконувалася в лабораторії біохімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» в межах кафедральної науково-дослідної роботи «Посттрансляційні зміни (модифікації) білків за умов патологічних процесів» (номер держреєстрації 0114U001279) та держбюджетної теми «Визначення ефективності терапії та ризику ускладнень у хворих з артеріальною гіпертензією, різними формами ішемічної хвороби серця на основі оцінки посттрансляційних модифікацій білків» (номер держреєстрації 0114U001280).

Мета та задачі дослідження. На основі визначення рівня продуктів окисної модифікації білків, стану антиоксидантної системи та протеазно-інгібіторного балансу при експериментальній ішемії міокарда та впливу на ці показники різних препаратів обґрунтувати положення про роль карбонільно-окисного стресу в розвитку ішемічної хвороби серця та біохімічні механізми її запобігання.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Відтворити моделі адреналінової та пітуїтрин-ізадрінової ішемії міокарда та довести наявність ушкодження міокарда за фізіологічними, морфологічними та біохімічними показниками в серці та крові експериментальних тварин.

2. Визначити показники окисної модифікації білків та активність окремих ферментів антиоксидантного захисту в крові та клітинних фракціях серцевого м'яза експериментальних тварин.

3. Визначити зміни активності матриксних металопротеїназ 2/9, трипсиноподібних ферментів та $\alpha 1$ -інгібітора протеїназ за умов адреналінової та пітуїтрин-ізадрінової ішемії міокарда.

4. Оцінити вплив корвітину, 2-оксоглутарату, аміногуанідину та різних доз доксицикліну на показники окисної модифікації білків, активність ферментів антиоксидантного захисту та протеолізу в крові та серці експериментальних щурів.

5. Провести порівняльний аналіз ефектів еплеренону та антиоксидантів на показники окисної модифікації білків за умов пітуїтрин-ізадринного ушкодження міокарда.

6. Визначити рівень рецепторів до кінцевих продуктів глікації типу AGE-R3 в крові та оцінити вплив на них кардіопротекторних препаратів.

Об'єкт дослідження – молекулярні механізми розвитку та корекції карбонільно-окисного стресу в умовах експериментальної ішемії міокарда.

Предмет дослідження – показники карбонільної та окисної модифікації протеїнів, активність ферментів антиоксидантного захисту матриксних металопротеїназ, трипсиноподібних ферментів та їх інгібіторів, рівень AGE-R3 та ступінь його олігомерізації, функціонально-гістохімічна характеристика серцевого м'яза, поведінкові реакції.

Методи дослідження – диференційне центрифугування, біохімічний аналіз крові, спектро- та флюориметрія, гель-хроматографія та діаліз, електрофорез у поліакриламідному гелі, желатин-зимографія, імуноблотинг, імуноферментний та імунофлюоресцентний аналіз, електрокардіографія, гістологічні та статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Аналіз неферментативної модифікації білків (окисної модифікації білків та рівня кінцевих продуктів глікації) у щурів з експериментальною ішемією міокарда дозволив висунути і обґрунтувати положення про патогенетичне значення карбонільно-окисного стресу в розвитку ІХС на тлі нормального рівня глюкози. Вперше встановлено, що за короткотривалої дії адреналіну, порушується протеазно-інгібіторний баланс у крові та серцевому м'язі. У плазмі крові щурів достовірно підвищується відносна активність ММП9, а у фракції розчинних білків серцевого м'яза, навпаки, вірогідно збільшується активність ММП2 і не визначається ММП9. Ці зміни спостерігаються на тлі зниження в крові рівня найбільш потужного інгібітора протеолізу – α 2-макроглобуліну та збільшення у два рази концентрації α 1-інгібітора протеїназ у серці. У плазмі щурів з пітуїтрин-ізадринним ушкодженням міокарда (ПІУМ) достовірно збільшується активність латентної та зрілої форм ММП2 ($P < 0,05$).

Дослідження впливу антиоксидантів (корвітину, аміногуанідину та 2-оксоглутарату), різних доз тетрациклінового антибіотика доксицикліну та антагоніста альдостерону еплеренону на активність антиоксидантних ферментів, ступінь карбонільної модифікації протеїнів в субклітинних фракціях лівого шлуночка та співвідношення ТБК/КПГ доводить, що корегування зазначених показників є невід'ємною частиною кардіопротекторної дії зазначених препаратів. Вперше встановлено, що низькі дози доксицикліну знижують рівень продуктів карбонільної модифікації протеїнів та індекс окисного стресу до нормальних значень, причому, ефекти малих доз доксицикліну порівняльні або перевищують дію класичних антиоксидантів –

аміногуанідину та корвітину, що обумовлює ефективність цього препарату у запобіганні фіброзуванню тканин та формуванню постінфарктної серцевої недостатності.

Аналіз галектину-3 (AGE-R3), який може виступати як скавенджер-рецептор КПП, у плазмі експериментальних тварин, дозволив встановити існування його моно-, ди-, три- та тетрамерних форм і довести перерозподіл зазначених форм за пітуїтрин-ізадринової ішемії міокарда та за дії досліджуваних в роботі препаратів. Показано, що під дією антиоксидантів та доксицикліну знижується вміст усіх форм AGE-R3, за виключенням тетрамерної, рівень якої вірогідно підвищується навіть у порівнянні з групою ПУМ. Антагоніст альдостерону еплеренон, навпаки, підвищує вміст мономерів AGE-R3 на тлі зменшення олігомерних форм. На підставі отриманих результатів обґрунтована схема біохімічних механізмів запобігання окисної модифікації білків за дії зазначених препаратів.

Теоретичне та практичне значення роботи. Робота відноситься до числа фундаментальних досліджень у галузі біохімії, але має практичну значимість у клінічній медицині, оскільки отримані результати закладають основи для розробки додаткових маркерів у діагностиці та моніторингу серцево-судинних захворювань і їх метаболічно обґрунтованої терапії. Матеріали дослідження можуть бути корисними при оцінці рівня AGE-R3 методом ELISA, який дозволяє визначити лише загальний пул цього лектину без урахування його олігомерних форм, в той час як імуноблотинг дає можливість визначити розподіл різних форм і оцінити його КПП-рецепторну активність. Результати модифікації методик впроваджено в наукові дослідження, що виконуються на кафедрах внутрішньої медицини ДЗ «ДМА МОЗ України». За результатами роботи отримано патент на корисну модель, відтворення якого дозволяє оцінювати рівень КПП у клінічних лабораторіях. Матеріали досліджень використовуються при викладанні курсу біохімії ДЗ «ДМА МОЗ України» у розділі «Функціональна біохімія» та спецкурсу «Біохімічні основи дії лікарських засобів».

Особистий внесок здобувача. Дисертант безпосередньо виконала весь обсяг експериментальної роботи, статистичну обробку результатів, здійснила пошук і аналіз джерел наукової літератури згідно з тематикою кандидатської дисертації, підготовку публікацій до друку. Планування експериментальної роботи, аналіз та обговорення результатів, формулювання основних положень, які виносяться на захист, а також висновків проведено спільно з науковим керівником, професором кафедри біохімії та медичної хімії Аллою Іванівною Шевцовою.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені на II-й та IV-й Республіканських науково-практичних конференціях «Современные достижения молодых учёных в медицине» (Гродно, Республіка Білорусь, 2015, 2017), Міжнародній науковій конференції «Молодь та поступ біології» (Львів, 2015 (диплом за найкращу стендову доповідь, I місце), II та III Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015;

Дніпро, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Кислород и свободные радикалы» (Гродно, Республіка Білорусь, 2016), XI Міжнародній конференції студентів та молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016), VIII Lviv-Lublin conference of «Experimental and clinical biochemistry» (Lublin, Poland, 2017), XVIII National Congress of Cardiologists of Ukraine, Ukrainian Journal of Cardiology (Kiev, 2017), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії» (Харків, 2018), I-й Білорусько-польсько-литовській науковій конференції “Frontiers in Life Science. Signalling and Metabolism” (Гродно, Республіка Білорусь, 2018).

Публікації результатів дослідження: за темою дисертації опубліковано 20 роботи, серед яких 10 статей (8 – у наукових фахових виданнях, 2 з них – у зарубіжних виданнях, одна з яких цитується у **Scopus**) та 10 тез доповідей у матеріалах наукових з’їздів, вітчизняних та міжнародних конференцій, а також отримано 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, обговорення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 156 сторінках друкованого тексту і проілюстровано 35 рисунками та 11 таблицями. Список літератури налічує 238 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Огляд літератури складається з 10 підрозділів, в яких узагальнено інформацію та висвітлено ключові питання, вирішенню яких присвячена дисертаційна робота.

Матеріали та методи дослідження.

В роботі було використано 2 експериментальні моделі, пов’язані з ушкодженням міокарду: адреналінова та пітуїтрин-ізадрінова. Всі процедури з експериментальними тваринами виконувались згідно з етичними нормами, встановленими Законом України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», та дотриманням Міжнародних принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18 березня 1986 р.). Щурів утримували у стандартних умовах віварію, контролюючи фізіологічний стан, вагу, ЕКГ та поведінкові реакції.

Модель 1: всі щури були розділені на 4 групи (n=10): 1 група – контрольна, щурам вводили фізіологічний розчин, 2 група (АІМ) – щури, яким підшкірно вводили адреналін в дозі 0,2 мг/100 г маси згідно схеми Хідірової (2010), 3 група після моделювання АІМ отримувала корвітин (К) впродовж 5 днів (доза 42 мг/кг) внутрішньочеревинно. У 4-й групі щурів застосовували доксициклін (Д) після моделювання АІМ, який вводили інтрагастрально в дозі 4,2 мг/кг за допомогою зонду.

Модель 2: пітуїтрин-ізадрінове ушкодження міокарда (ПІУМ) моделювали комбінованим введенням пітуїтрину (0,5 ОД/кг підшкірно) та ізадрину (100

мг/кг підшкірно) впродовж двох днів за схемою (Беленічев, 2012). Щурів було розділено на 8 груп (n=10): 1 група – контрольна отримувала 0,9% NaCl; друга група – щури з ПУМ; у 3-й групі (ПУМ+К) після індукування ПУМ щурам вводили корвітин. У 4-й групі щурам з ПУМ вводили еплеренон (ПУМ+Е). У 5-й групі тварини отримували 1% розчин 2-оксоглутарату (ПУМ+ОГ). У 6-й групі тваринам вводили аміногуанідин (ПУМ+АГ), в дозі 200 мг/кг, у 7-й та 8-й групах експериментальним тваринам вводили доксициклін у дозах 4,2 мг/кг (ПУМ + Д1) та 16,8 мг/кг (ПУМ + Д2), відповідно.

Дослідження фізіологічних параметрів здійснювали за допомогою електрокардіографії у другому стандартному відведенні, використовуючи комп'ютерний електрокардіографічний комплекс CardioLab 2000 («ХАИ-Медика», Харків), тесту відкритого поля за методом (Буреш, 1991).

Матеріали та методи дослідження: плазма, гемолізат еритроцитів, зрізи тканини лівого шлуночка та субклітинні фракції серцевого м'яза. За допомогою тест-системи «Філісит-Діагностика» (Україна) визначали рівень глюкози, гемоглобіну та аспартатамінотрансферази. Загальний білок визначали за методом Бредфорда.

Ступінь ОМБ визначали у плазмі та клітинних фракціях серця експериментальних тварин за кількістю альдегідфенілгідразонів (АФГ) та кетонфенілгідразонів (КФГ), рівнем флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) (Шевцова, 2016). ТБК-активні продукти (ТБК-АП), активність ензимів антиоксидантного захисту у плазмі та еритроцитах досліджували згідно загальноприйнятих методик. (Ohkawa, 1997; Дубинина, 1995; Ткаченко, 2014; Goth, 199; Razygraev, 2004; Kryl'skii, 2014).

Активність матриксних металопротеїназ – ММП 2/9 – досліджували методом желатин-зимографії у модифікації (Шевцова, 2013). Активність трипсиноподібних ензимів (ТПЕ) визначали за розщепленням синтетичного безбарвного субстрату N-бензоїл-DL-аргінін-4-паранітроанлідгідрохлориду під дією ТПЕ, ступінь забарвлення вимірювали при довжині хвилі 410 нм. Концентрацію α 1-інгібітора протеїназ (α 1-ІП) та α 2-макроглобуліну (α 2-МГ) визначали за мікротваріантом методу Веремеєнко.

Для визначення галектину-3 (AGE-R3) у плазмі застосовували електрофорез у 10% поліакриламідному гелі з подальшим імуноблотингом та імунофлюоресцентним аналізом з використанням специфічних первинних антитіл до AGE-R3.

Результати обробляли за допомогою програми Microsoft Excel 2016 та програмного продукту Statistica 6.0. Вірогідність міжгрупових відмінностей розраховували за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента та непараметричного U-критерію Манна-Уїтні для малих вибірок.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Модель 1. Адреналін-індукована ішемія міокарда.

Зміни фізіологічних та біохімічних параметрів. Аналіз ЕКГ показав, що після ін'єкцій адреналіну впродовж 10 днів відбуваються зміни електричної

активності серцевого м'язу, аналогічні тим, що мають місце при гострому інфаркті міокарда у людини. Ці зміни спостерігаються на тлі незначного підвищення рівня глюкози та активності аспартатамінотрансферази (АсАТ) у плазмі крові. Застосування корвітину сприяє відновленню функціонального стану серця, рівня глюкози та активності АсАТ, тоді як застосування доксицикліну не призводить до повного відновлення стану міокарда.

Показники ОМБ та ензимів антиоксидантної системи. Встановлено, що за АІМ вміст альдегідо- і кетопохідних у плазмі зростав у 1,5 раза та у 1,2 раза у порівнянні з інтактною групою (рис. 1).

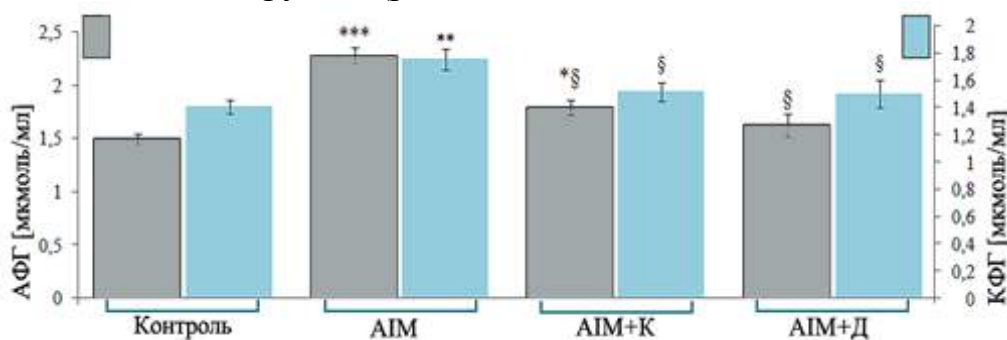


Рис. 1 Вплив корвітину та доксицикліну на показники окисної модифікації білків

* - $P < 0,05$, ***- $P < 0,001$ – різниця вірогідна у порівнянні з показниками контрольної групи;

§ $P < 0,05$ – різниця вірогідна відносно групи з АІМ.

Використання корвітину та доксицикліну достовірно знижувало рівень ОМБ: значення АФГ у третій та четвертій групах знизилось на 20% та 25%, відповідно; КФГ – у третій та четвертій групах на 12-13%. У тварин відбувалось вірогідне підвищення вмісту ТБК-АП у крові ($2,16 \pm 0,24$ нмоль/мл проти контролю $0,78 \pm 0,18$, $P < 0,001$) та цитозольній фракції серця ($0,143 \pm 0,06$ нмоль/мл проти контролю $0,105 \pm 0,06$, $P < 0,001$). Ці зміни спостерігались на фоні незначного підвищення глюкози, ймовірно, як наслідок гіперглікемічного ефекту адреналіну. Застосування зазначених вище препаратів призводило до вірогідного зниження концентрації ТБК-АП у крові та цитозольній фракції серця, але у крові рівень ТБК-АП не досягав значень контрольної групи.

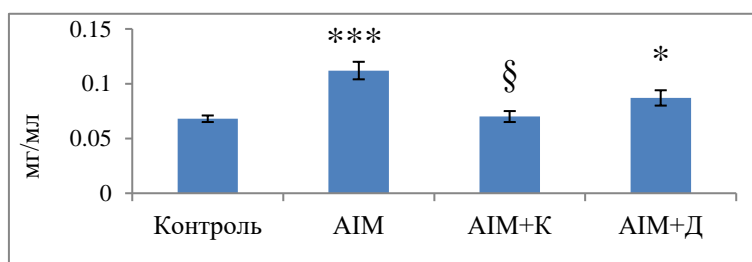


Рис. 2 Вплив корвітину та доксицикліну на показники фКПГ у експериментальних тварин

* - $P < 0,05$; ***- $P < 0,001$ – різниця вірогідна у порівнянні з показниками контролю;

§ - $P < 0,05$ – різниця вірогідна по відношенню до групи АІМ.

Рівень кінцевих продуктів глікації фКПГ у плазмі експериментальних тварин з АІМ підвищився у 2 рази порівняно з контролем і становив $0,112 \pm 0,009$ мг/мл (рис. 2). Застосування К призводило до нормалізації рівня фКПГ у плазмі щурів третьої групи, за введення Д спостерігалась тенденція до зниження цього показника, але не до контрольних значень.

Таблиця 1

Активність ферментів антиоксидантної системи у експериментальних щурів (M±m, n=10)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	АІМ	АІМ+К	АІМ+Д
Каталаза у плазмі [МО/л]	4,96±0,58	3,02±0,63	10,76±0,85***§§	7,96±0,65***§§
Каталаза (ЦФ) [МО/л/мг білка]	0,42±0,03	0,58±0,02	0,79±0,08*	0,51±0,08
Досліджували у гемолізаті еритроцитів:				
ГП [МЕ/г Нб]	80,02±6,85	120,91±3,21*	97,13±7,18§§	102,86±3,59*

Тут і надалі:

* – P<0,05, ** – P<0,01, *** – P<0,001 – різниця вірогідна у порівнянні з показниками контрольної групи;
§ – P<0,05; §§ – P<0,01; §§§ – P<0,001 – різниця вірогідна по відношенню до групи АІМ. ЦФ – цитозольна фракція білків серцевого м'язу.

Дослідження активності ферментів антиоксидантної системи показало вірогідне зростання їхнього рівня у плазмі крові та гемолізаті еритроцитів за умов АІМ, за виключенням каталази, активність якої знижувалась у 1,64 раза. Застосування К та Д призводило до підвищення активності каталази та зниження активності глутатіонпероксидази, хоча вона залишалась підвищеною відносно контрольної групи (таблиця 1). Різнострамованість змін каталази та ГП пояснюється різною спорідненістю до вмісту перекису водню. Діюча речовина К – кверцетин – є «пасткою» вільних радикалів, який здатен зменшувати їхню кількість та ушкоджувальну дію (Лапшина, 2009). Ймовірно, саме цей механізм зумовлює зниження кардіотоксичного ефекту високих доз адреналіну за дії корвітину.

Зміни активності протеазно-інгібіторного балансу та матриксних металопротеїназ. Визначення активності трипсиноподібних ензимів та неспецифічних інгібіторів протеолізу, результати якого представлені у табл. 2, показало, що у плазмі крові щурів з АІМ ці показники не змінюються, за виключенням α2-макроглобуліну, кількість якого вірогідно знижувалась. У тканині серця кількість α1-інгібітора протеїназ була збільшеною у 2 рази. При застосуванні К та Д основні зміни стосувались α2-макроглобуліну: під впливом Д його кількість у плазмі крові різко знижувалась, а при застосуванні К взагалі не визначалась.

Таблиця 2

Активність трипсиноподібних ензимів та вміст α1-інгібітора протеїназ та α2-макроглобуліну у експериментальних тварин (M±m, n=10)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	АІМ	АІМ+К	АІМ+Д
ТПЕ у плазмі щурів, [МО/мл]	0,455±0,044	0,439±0,067	0,611±0,063*	0,500±0,065
ТПЕ (ЦФ), [МО/мг білка]	0,015±0,005	0,020±0,005	0,024±0,005	0,030±0,008
ПІ1 у плазмі щурів, [мкмоль/л]	339,1±14,7	332,9±15,9	322,1±12,7	326,7±12,3
ПІ1 (ЦФ), [мкмоль/л/мг білка]	9,8±0,7	20,3±1,4***	18,1±2,1***	16,4±2,6***
α2-МГ у плазмі щурів [мкмоль/л]	9,4±0,4	7,4±0,2***	-	1,4±0,1***

ЦФ – цитозольна фракція білків серцевого м'язу, ТПЕ – трипсиноподібні ензими; ПІ1 – α1-інгібітор протеїназ; α2-МГ – α2-макроглобулін.

За результатами визначення активності ММП2 та ММП9, встановлено, що за умов АІМ у плазмі крові щурів достовірно підвищується відносна активність ММП9 та спостерігається тенденція до збільшення проформ обох ММП (рис. 3) на тлі незмінної активності ММП2.

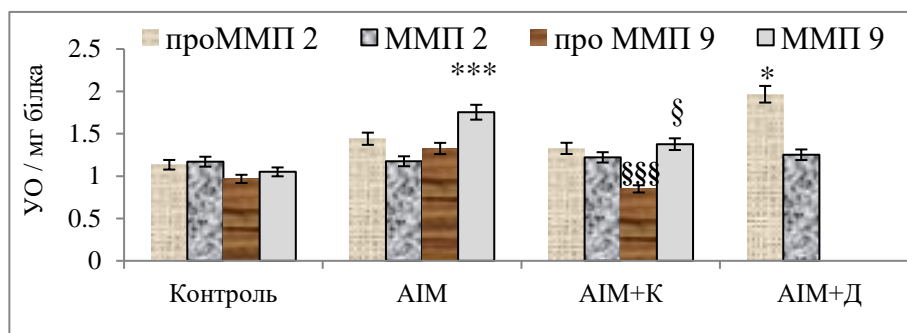


Рис. 3 Активність ММП2 та ММП9 у плазмі щурів з АІМ

* – P<0,05; *** – P<0,001 – різниця вірогідна у порівнянні з показниками контрольної групи; § – P<0,05; §§§ – P<0,001 – різниця вірогідна по відношенню до АІМ.

У фракції розчинних білків серцевого м'яза, навпаки, ММП9 не визначалась, а обидві форми ММП2 достовірно збільшувались. Після застосування К відбувалось суттєве зниження активності усіх досліджуваних форм ММП у плазмі крові у порівнянні з другою групою, причому активність ММП9 була нижчою за контроль. У серцевому м'язі вірогідно зменшувалась активність проММП2. Слід зазначити зниження ТБК-АП у фракції розчинних білків серця після застосування К та Д, яке було асоційоване зі зменшенням активності желатиназ.

Модель 2. Пітуїтрин-ізадринове ушкодження міокарда.

Показники окисної модифікації білків. Наявність ішемічного ушкодження міокарда після введення пітуїтрину та ізадрину була підтверджена за даними ЕКГ та гістологічного аналізу.

Таблиця 3

Вплив антиоксидантів, доксицикліну та еплеренону на показники карбонільно-окисного стресу, активність АсАТ та рівень глюкози у плазмі крові експериментальних тварин (M±m, n=10)

Групи тварин	1	2	3	4	5	6	7	8
Показники								
ТБК-активні продукти [нмоль/мл]	0,74±0,09	2,09±0,11***	0,77±0,08§§§	0,64±0,09§§§	1,06±0,09**§§§	1,06±0,14**§§§	1,28±0,18*§§§	1,26±0,12**§
АФГ [мкмоль/мл]	1,571±0,08	2,19±0,11***	1,75±0,04*§	1,72±0,24§	1,88±0,06*§	1,45±0,13§§§	1,62±0,17§	1,69±0,15§
КФГ [мкмоль/мл]	1,46±0,11	1,71±0,07***	1,50±0,05§	1,33±0,21§§	1,54±0,08§	1,41±0,05§	1,54±0,17*	1,47±0,05§
фКПГ [мг/мл]	0,07±0,003	0,09±0,004***	0,07±0,01§§§	0,07±0,01§§§	0,08±0,002**§	0,07±0,01§§§	0,08±0,01§	0,06±0,04§§§
АсАТ [мкмоль/мл*Год]	0,49±0,03	0,64±0,01***	0,71±0,02§§§	0,49±0,04§§	0,57±0,02§§	0,56±0,02§§§	0,51±0,03§§§	0,51±0,04§§
Глюкоза [ммоль/л]	4,71±0,57	6,03±0,63*	7,63±0,62**§	5,02±0,28§	4,91±0,29§	6,98±0,36**	6,32±0,56*	4,72±0,41§§

1- контроль, 2- ПУМ, 3- ПУМ+ОГ, 4- ПУМ+АГ, 5- ПУМ+К, 6- ПУМ+Е, 7- ПУМ+Д1, 8- ПУМ+Д2
АФГ – альдегідфенілгідрозони, КФГ – кетонфенілгідрозони, фКПГ – кінцеві продукти глікації.

* – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – відносно до групи контролю;

§ – P<0,05, §§ – P<0,01, §§§ – P<0,001 – відносно до групи з ПУМ.

За умов ПУМ рівні ТБК-АП, АФГ, КФГ та фКПГ у плазмі тварин з ПУМ збільшились відносно контрольної групи у 2,8, 1,4, 1,2 та 1,3 раза, відповідно, причому ці зміни спостерігались на тлі нормального рівня глюкози та підвищеної активності АсАТ ($P<0,001$). Кореляційний аналіз показав наявність позитивного зв'язку між ТБК-АП та фКПГ ($r=0,61$, $P<0,05$).

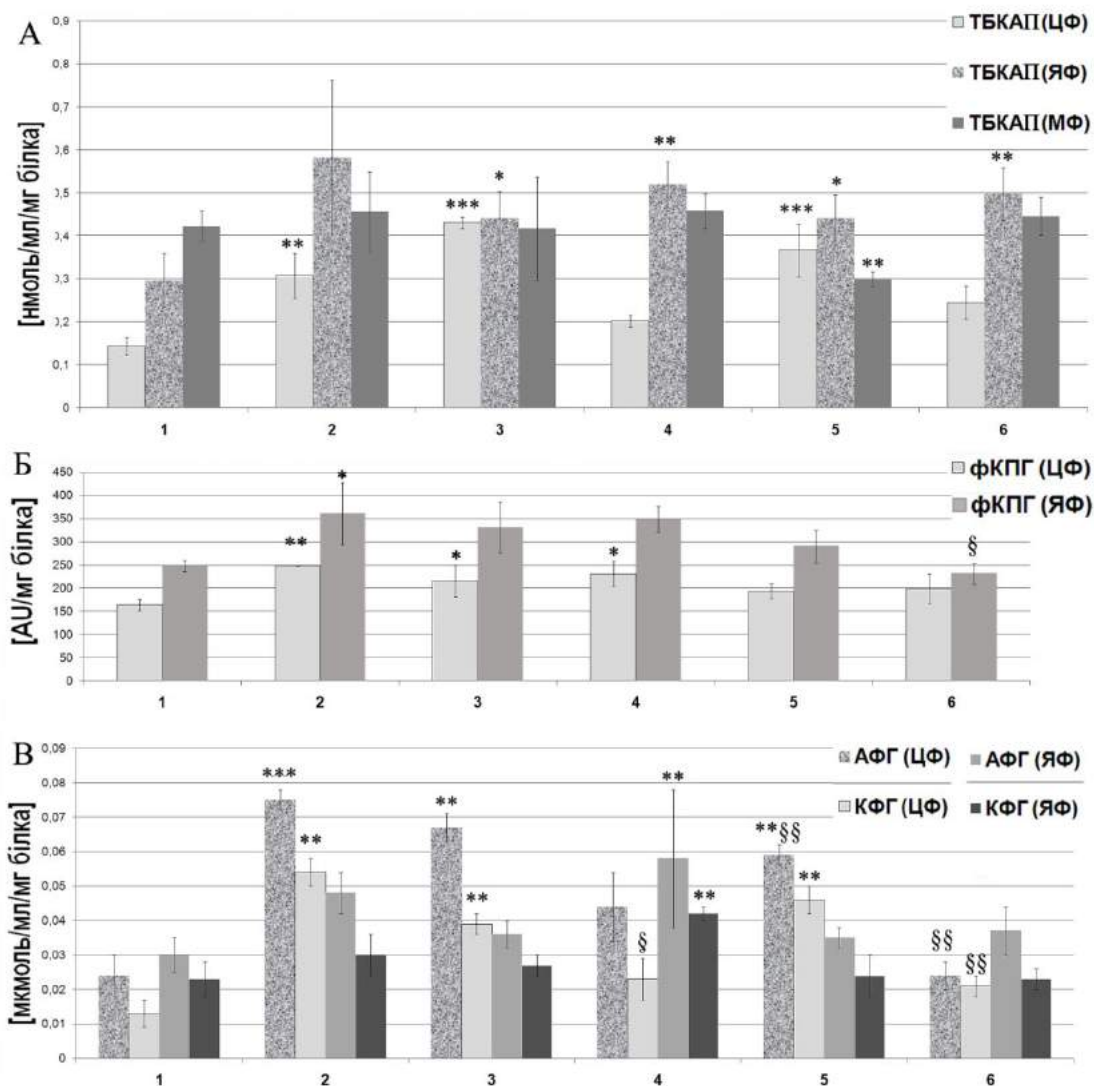


Рис. 4 Рівень ТБК-АП (А), фКПГ (Б), АФГ та КФГ (В) у субклітинних фракціях серця за впливу доксицикліну та антиоксидантів

1- контроль, 2- ПУМ, 3- ПУМ+Д1, 4- ПУМ+Д2, 5- ПУМ+АГ, 6- ПУМ+К. АФГ – альдегідфенілгідрозони, КФГ – кетонфенілгідрозони, фКПГ – кінцеві продукти глікації. ЦФ – цитозольна фракція, ЯФ – ядерна фракція, МФ – мітохондріальна фракція; * – $P<0,05$; ** – $P<0,01$, *** – $P<0,001$ – відносно до групи контролю; § – $P<0,05$, §§ – $P<0,01$ – відносно до групи з ПУМ.

Враховуючи, що патогенетична роль продуктів ОМБ зумовлена їхньою гено- та цитотоксичністю, спроможністю викликати загибель клітин за типом апоптозу або некрозу (Thomas, 2005), ми провели дослідження показників ОМБ в окремих субклітинних фракціях серця експериментальних тварин, результати якого наведено на рис. 4. Дослідження показників КОС у клітинних фракціях показало, що за умов ПУМ рівні ТБК-АП, фКПГ, АФГ та КФГ збільшуються в усіх фракціях. У цитозольній фракції спостерігали суттєве підвищення АФГ на тлі помірного зростання КФГ. В ядерній фракції зміни АФК та КФГ були

недостовірними. Під впливом Д спостерігались різноспрямовані зміни досліджуваних показників. За дією малих доз цього препарату визначалось зменшення продуктів ОМБ та КПГ, в основному, в ядерній фракції, а за високих доз різко знижувався рівень АФГ та КФГ у цитозолі, причому ефекти низьких доз доксицикліну на ці параметри були схожі з дією АГ. Зміни ТБК-АП у всіх субклітинних фракціях серця під дією високих доз Д співпали зі змінами, що спостерігались за дії К.

Активність ензимів антиоксидантної системи у експериментальних тварин

Рівень активності каталази в плазмі крові тварин з ПУМ знизився майже втричі ($P < 0,001$), проте активність ГП в еритроцитах, навпаки, збільшилась в 1,5 раза ($P < 0,001$). Було виявлено тенденцію до зниження активності ГР та незначне збільшення рівня СОД. Вміст і активність зазначених ферментів, за винятком СОД, збільшувались у тварин, які отримували К, в той час як застосування 2-ОГ призводило до зниження активності антиоксидантних ензимів майже до норми. За дії низьких доз Д активність ГР та СОД у еритроцитах поверталась до норми, рівень каталази підвищувався у 2 рази у порівнянні з групою з ПУМ. Активність ГП у цій групі збільшилась на 70% та 14% відносно контрольної групи та групи з ПУМ, відповідно. Для дози Д2 (16,8 мг/кг) аналогічні розрахунки становили 22% та 85%. За результатом активності ензимів системи АОЗ проводили розрахунок індексу окисного стресу (ІОС), що запропонований (Jaiswal, 2016), за наступною формулою: $ІОС = ТБК-АП / \text{рівень} (СОД + ГП + ГР)$. Значення ІОС в групі тварин з ПУМ у 2 рази перевищувало контрольні показники, а при застосуванні антиоксидантів та Е поверталось до нормальних значень, причому, результати у групі, де застосовували Д у малих дозах, співпадали з даними групи тварин, що приймала К – класичний антиоксидант. Найбільш суттєве зниження ІОС було зафіксовано у щурів на тлі застосування АГ, що пояснюється його впливом не тільки на окисні, але й на карбонільні радикали.

Активність матриксних металопротеїназ 2/9 за умов ПУМ підвищувалась,

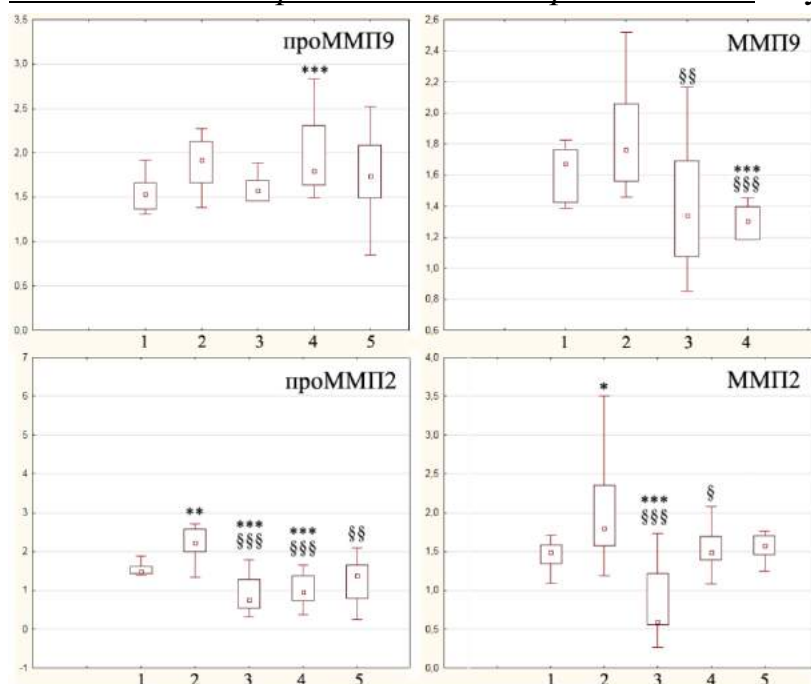


Рис. 5 Активність ММП2/9 у плазмі щурів за умов ПУМ

1- контроль,
2- ПУМ,
3- ПУМ+К,
4- ПУМ+Д1,
5- ПУМ+Д2.
* – $P < 0,05$;
** – $P < 0,01$;
*** – $P < 0,001$ – відносно до групи контролю;
§ – $P < 0,05$,
§§ – $P < 0,01$,
§§§ – $P < 0,001$ – відносно до групи з ПУМ.

причому, найбільш вірогідні зміни спостерігались для ММП2 ($P < 0,05$). Застосування К та різних доз Д призводило до зниження активності зазначених ферментів, особливо різкі зміни латентної форми ММП2 мали місце за дії К та низьких доз Д, що узгоджується з літературними даними стосовно здатності цього антибіотика гальмувати синтез ММП2 (Рис. 5).

AGE-R3 у плазмі крові експериментальних тварин. Дослідження AGE-R3 у плазмі крові експериментальних щурів методом імуноблотинга дозволило встановити наявність 4-х зон з молекулярною масою (ММ) 32-33 кДа, 66-70 кДа, 95-98 кДа і 120-125 кДа. Розрахунок інтенсивності та ширини цих зон показав, що у щурів з ПУМ змінюється кількість цих форм: 32-33 кДа (мономерна форма), вірогідно зменшується, а ди- та тетрамерні форми (66-70 кДа, 120-125 кДа) збільшуються. Співвідношення моно- та олігомерних форм змінюється під дією кардіопротекторних препаратів, що досліджувались в роботі (рис. 6).

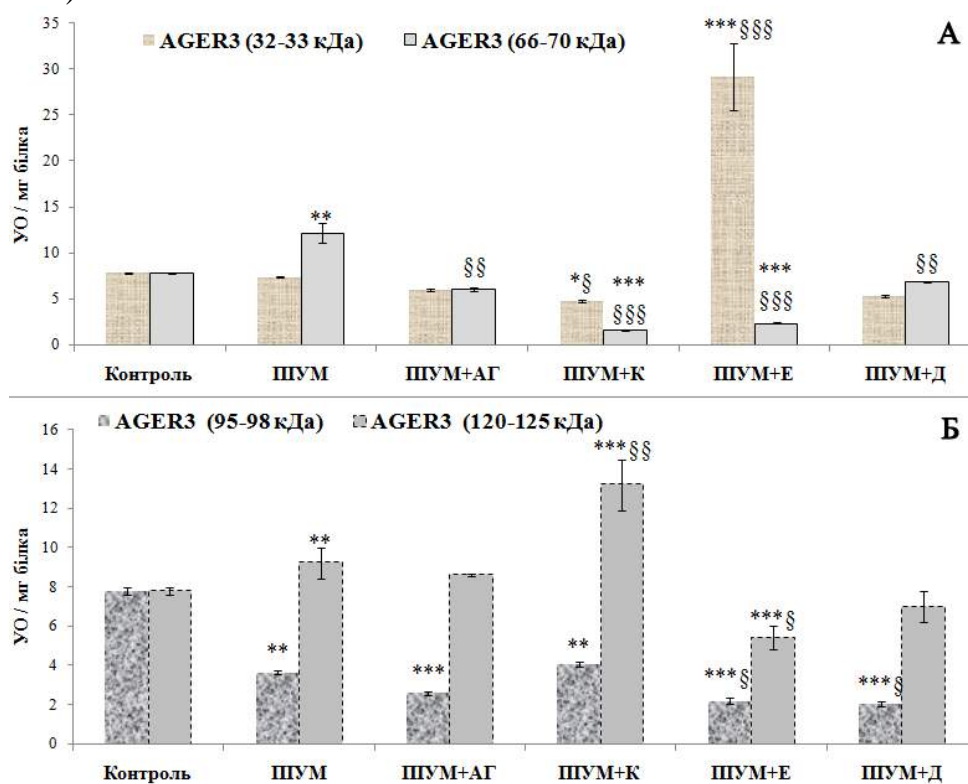


Рис. 6 Олігомерні форми AGE-R3 у плазмі крові експериментальних тварин

* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ – відносно до групи контролю;

§ – $P < 0,05$, §§ – $P < 0,01$ – відносно до групи з ПУМ.

Під дією антиоксидантів та Д знижується кількість всіх форм AGE-R3, за виключенням тетрамерної, кількість якої вірогідно підвищується навіть у порівнянні з групою з ПУМ. Особливо різкі зміни розподілу моно- и тетрамерних форм мали місце за дії корвітину. Антагоніст альдостерону Е, навпаки, підвищує вміст мономерних форм на тлі зменшення його олігомерних форм.

Підсумовуючи викладене вище, слід акцентувати увагу на наступному. За експериментальної ішемії міокарда у щурів розвивається карбонільно-окисний стрес, підвищується рівень окисно-модифікованих білків та порушується

протеазно-інгібиторний баланс у крові та серці. У плазмі крові щурів з експериментальною ішемією міокарда збільшується рівень ди- та тетрамерних форм AGE-R3, що беруть участь у видаленні продуктів неферментативної модифікації протеїнів. Зниження вмісту ОМБ та КПП і перерозподіл моно- та олігомерних форм AGE-R3 під впливом різних за механізмом дії кардіопротекторних препаратів свідчать, що їхня терапевтична дія значною мірою обумовлена гальмуванням карбонільно-окисного стресу та прискоренням видалення продуктів неферментативної модифікації протеїнів. Узагальнююча схема отриманих в роботі результатів наведена на рис. 7.

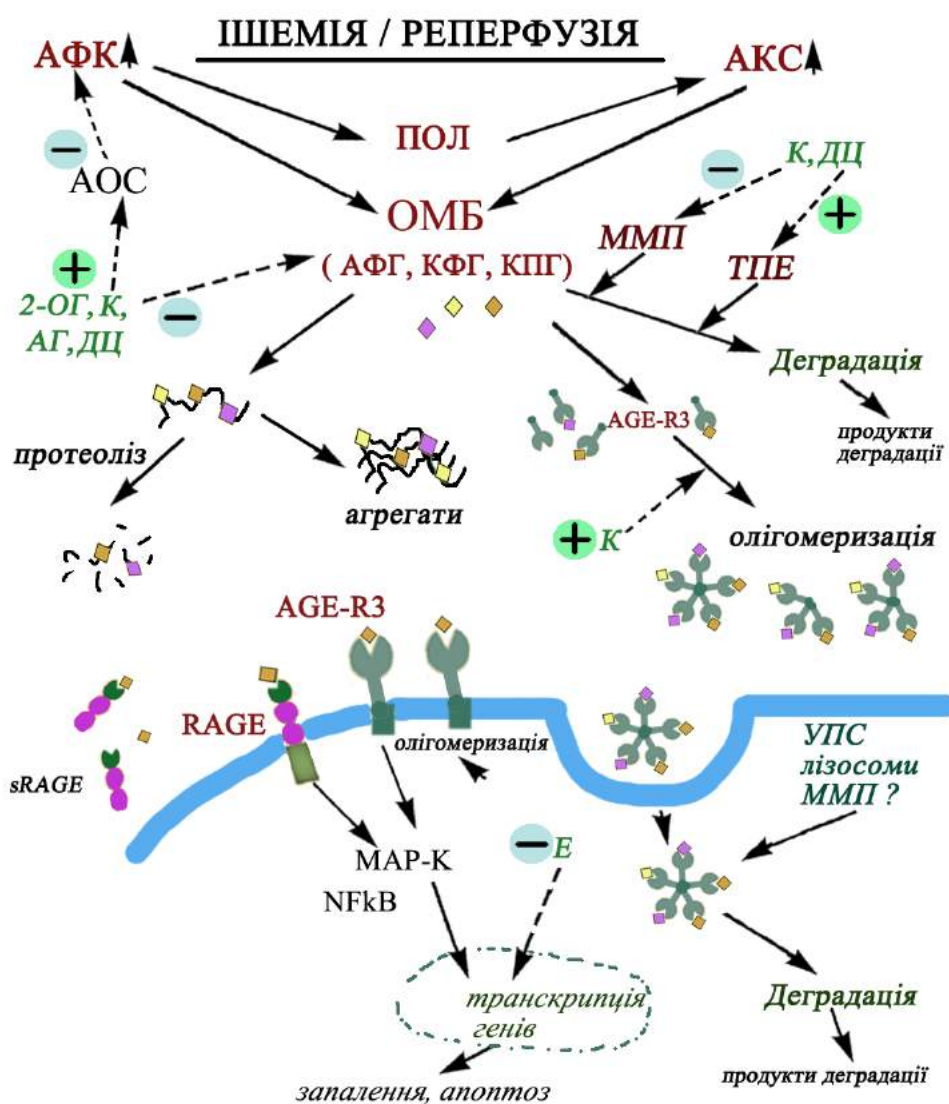


Рис. 7 Узагальнююча схема утворення продуктів ОМБ та шляхів запобігання їх негативним наслідкам

Стріли – метаболічні шляхи, стріли пунктиром – шляхи запобігання, АОС – антиоксидантна система, АГ – аміногуанідин, К – корвітин, 2-ОГ – 2-оксоглутатат, ДЦ – доксициклін, Е – еплеренон.

ВИСНОВКИ

Результати дисертаційної роботи поглиблюють та розширюють уявлення про молекулярні механізми розвитку серцево-судинних захворювань та їхніх ускладнень і надають інформацію про шляхи метаболічно обґрунтованої корекції таких станів.

1. Відтворення адреналінової та пітуїтрин-ізадрінової моделі ішемії міокарда у щурів призводить до розвитку карбонільно-окисного стресу, що

підтверджується вірогідним підвищенням у крові та серці вмісту ТБК-активних продуктів (у 1,7-2,8 рази), альдегід- та кетонфенілгідрозонів (у 1,5 та 1,2 рази, відповідно), кінцевих продуктів глікації (у 2 рази), причому, ці зміни мають місце за відсутності гіперглікемії. Наявність кореляції між ТБК-АП та КПП ($r=0,61$) свідчить про взаємозв'язок між процесами карбонільної та окисної модифікації білків.

2. Встановлено зміни активності ферментів антиоксидантної системи за умов експериментальної ішемії міокарда, причому, найбільш значні зміни знайдені для ферментів, що знешкоджують перекис водню. Активність каталази знижувалась у 2-3 рази, в той час як активність глутатіонпероксидази підвищувалась у 1,5 рази, а індекс окисного стресу підвищувався у 1,9 рази.
3. Доведено, що за умов експериментальної ішемії міокарда порушується протеазно-інгібіторний потенціал крові та серцевого м'яза: за дії адреналіну в плазмі крові підвищується активність ММП9 у 1,7 рази та зменшується рівень $\alpha 2$ -макроглобуліна, тоді як у серцевому м'язі, навпаки, збільшується активність проММП2 у 1,6 рази та рівень $\alpha 1$ -інгібітора протеїназ. За пітуїтрин-ізадринової моделі, навпаки, в плазмі крові найбільш вірогідні зміни активності знайдені для ММП2.
4. Уперше встановлено, що експериментальна ішемія міокарда супроводжується перерозподілом моно- та олігомерних форм AGE-R3: зменшується кількість мономерних форм на тлі вірогідного підвищення ди- та тетрамерних ($P<0,01$), що свідчить про активацію взаємодії цього скавенджер-рецептора з КПП за ішемічного ушкодження серцевого м'яза.
5. Застосування антиоксидантів корвітину, 2-оксоглутарату та аміногуанідину призводить до зменшення рівня всіх досліджуваних показників карбонільно-окисного стресу, причому найбільш виражена відновлювальна дія спостерігалась при застосуванні корвітину та аміногуанідину.
6. Доведено, що доксициклін в дозах 4,2 мг/кг проявляє кардіопротекторні властивості, знижуючи утворення продуктів окисної модифікації білків і активуючи ферменти антиоксидантного захисту, в першу чергу, глутатіонпероксидазу. Ефекти малих доз доксицикліну на зазначені показники порівняні або перевищують дію класичних антиоксидантів – аміногуанідину і корвітину, що визначає перспективність його використання в лікуванні постінфарктної серцевої недостатності.
7. Показано, що антагоніст альдостерону еплеренон запобігає наслідкам окисної модифікації протеїнів шляхом регулювання активності ферментів антиоксидантного захисту та олігомеризації рецепторів до кінцевих продуктів глікації типу AGE-R3.
8. Уперше показано, що під дією антиоксидантів та доксицикліну знижується кількість всіх форм AGE-R3, за виключенням тетрамерної, кількість якої вірогідно підвищується, навіть у порівнянні з групою з ПІУМ. На основі отриманих даних запропонована узагальнююча схема утворення

окисномодифікованих білків за ішемії міокарда та шляхів запобігання їхньому негативному впливу.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Tkachenko V. The cardio- and neuroprotective effects of Corvitin and 2-oxoglutarate in rats with pituitrin-isoproterenol-induced myocardial damage / **V. Tkachenko**, Y. Kovalchuk, N. Bondarenko, O. Bondarenko, G. Ushakova, A. Shevtsova // *Biochemistry Research International*. – 2018. – №9302414. – P. 1-11. (Здобувач брала участь у створенні експериментальної моделі ішемії міокарда у щурів, здійснювала введення тваринам препаратів, досліджувала фізіологічні параметри та показники карбонільно-окисного стресу, проводила відбір тканин серця для гістологічного дослідження)
2. Ткаченко В. А. Зміни показників карбонільно-оксидативного стресу у щурів з експериментальною ішемією міокарда під впливом доксицикліну / **В. А. Ткаченко**, А. І. Шевцова // *ВКНУ, Біологія*. – 2018. – Т. 75, №2. – С. 6-12. (Дисертант моделювала експериментальну модель ішемії міокарда у щурів, здійснювала введення препаратів-коректорів, досліджувала показники карбонільно-окисного стресу)
3. Шевцова А. І. Неферментативна модифікація білків та рівень галектину-3 у щурів з експериментальною ішемією міокарда / А. І. Шевцова, **В.А. Ткаченко**, Ю.Г. Кот // *ВКНУ, Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. – 2018. – Т. 24, №2. – С. 31-36. (Здобувач дослідила рівень галектину-3 за експериментальної ішемії міокарда)
4. Ткаченко В. А. Вплив еплеренону на фізіологічні параметри та ступінь карбонільно-оксидативного стресу у щурів з експериментальним ушкодженням міокарда / **В. А. Ткаченко** // *Український біофармацевтичний журнал*. – 2018. – Т. 2, №55. – С. 4-12. (Здобувач брала участь у створенні експериментальної моделі ішемії міокарда у щурів, здійснювала введення тваринам еплеренону, досліджувала фізіологічні параметри та показники карбонільно-окисного стресу)
5. Паронік В. А. Вплив кардіопротекторів на протеазно-інгібіторний потенціал крові та серця щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарда / **В. А. Паронік**, О. Е. Шаульська, Л. М. Дяченко, А. І. Шевцова // *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*. – 2016. – Т. 7, №1. – С. 27–31. (Дисертант моделювала адреналін-індуковане ушкодження міокарда у щурів, досліджувала фізіологічні параметри, здійснювала введення тваринам корвітину та доксицикліну, проводила дослідження показників оксидантно-антиоксидантної системи та системи протеолізу)
6. Паронік В. А. Вплив корвітину та гуміліду на стан оксидантно-антиоксидантної системи щурів на фоні введення адреналіну / **В. А. Паронік**, Л. М. Степченко, Л. М. Дяченко, А. Е. Левих, А. І. Шевцова // *Біологія тварин*. – 2015.– 17 № 4 – С. 109-114. (Здобувач брала участь у створенні експериментальної моделі адреналінового ушкодження міокарда у щурів, здійснювала введення тваринам корвітину та гуміліду, проводила дослідження показників оксидантно-антиоксидантної системи)
7. Паронік В. А. Активність антиоксидантних ферментів та желатиназ за умов адреналінової ішемії міокарду у щурів / **В. А. Паронік**, О. Е. Шаульська, В. І. Жилюк, А. І. Шевцова // *Медична хімія*. – 2015. – №3. – С. 71-76. (Здобувач брала участь у створенні експериментальної моделі адреналінового ушкодження міокарда у щурів, здійснювала введення тваринам корвітину, проводила дослідження показників оксидантно-антиоксидантної системи та системи протеолізу)
8. Шевцова А. І. Пат. 116929 UA, МПК G 01 N 1/00, 21/39, 21/64, 33/49 Спосіб визначення флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації у плазмі крові / А. І. Шевцова, **В.А. Ткаченко**, О. А. Коваль, А. С. Скоромна, А. П. Іванов; Заявник та патентовласник ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» – заявл. 21.12.16; опубл. 12.06.17, Бюл. № 11. – 4 с.: (в Україні).

9. Шевцова А. И., Ткаченко В. А. Конечные продукты гликирования и их рецепторы при сердечно-сосудистых заболеваниях / А. И Шевцова, **В. А. Ткаченко** // Журнал ГрГМУ. – 2019. – Т. 17, №1. – С. 11–16. (Здобувач приймала участь у пошуку матеріалу та написанні огляду).

10. Шевцова А. И., Ткаченко В. А. Конечные продукты гликирования и их рецепторы при ишемическом повреждении миокарда / А. И Шевцова, **В. А. Ткаченко** // “Frontiers in Life Science. Signalling and Metabolism”: сб. материалов I-й Белорусско-польско-литовской научной конференции (8-9 ноября, 2018 г.) отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно: ГрГМУ, 2018. – С.164-171. (Здобувач особисто провела дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку)

11. Ткаченко В. А. Эффект еплеренону на показатели оксидативно-карбонильного стресса та антиоксидантного захисту у щурів з експериментальною ішемією міокарда / **В. А. Ткаченко**, А. І. Шевцова // Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми експериментальної та клінічної біохімії», 12-13 квітня 2018р.: збірник тез.– Харків,2018. – С.64. (Здобувач особисто провела дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку)

12. Tkachenko V. The effects of corvitin and eplerenone on the activity of gelatinases and glycation of proteins in rats with isoprenaline-induced myocardial damage / **V. Tkachenko**, O. Shaul'ska, N. Pats, A. Shevtsova // VIII Lviv-Lublin conference of «Experimental and clinical biochemistry». September 18-20, 2017: Abstract book.– Lublin, 2017.– P.72. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді)

13. Ткаченко В. А. Конечные продукты гликирования в норме и при сердечно-сосудистой патологии / **В. А. Ткаченко**, А. С. Скоромная, М. Мухаммад, А. М. Забида Абдунасер // XI Міжнародної конференції студентів та молодих вчених «Біологія: від молекули до біосфери», 1-3 грудня 2016 р.: збірник матеріалів.– Харків, 2016.– С. 42-43. (Здобувач особисто провела дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку)

14. Ткаченко В. А. Сравнение кардиопротекторных свойств кверцетина и альфа-кетоглутарата на модели экспериментальной ишемии миокарда у крыс / **В. А.Ткаченко**, Ю. П. Ковальчук, А. Э. Левых, Г. А. Ушакова, А. И. Шевцова // Современные достижения молодых учёных в медицине: сб. материалов IV Республиканской науч.-практ. конф. с межд. участием (24 ноября 2017 г.) / отв. ред. В. А. Снежицкий. – Гродно: ГрГМУ, 2017. – С. 202-204. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді)

15. Шевцова А. И. Показатели оксидативно-карбонильного стресса у крыс с ишемией миокарда / А. И Шевцова, **В. А. Пароник** // Международной научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы», 19-20 мая 2016 г.; сборник материалов.– Гродно, Республика Беларусь, 2016.– С. 186-8. (Здобувач особисто провела дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку)

16. Паронік В. А. Вплив доксицикліну на антиоксидантну систему при адреналін-індукованій ішемії міокарда / **В. А. Паронік**, Н. В. Васьковець, Д. Ю. Сова // XVI конференція студентів та молодих вчених «Новини і перспективи медичної науки», 15 квітня 2016 р.: збірник тез. – Дніпропетровськ, 2016. – С. 64. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді)

17. Шевцова А. І. Посттрансляційні модифікації білків при серцево-судинних захворюваннях / А. І Шевцова, О. О. Коваль, **В. А. Паронік**, О. Е. Шаульська, Г. Б. Пелешенко, А. О. Кулініч // III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», 24-25 вересня 2013р.: збірник тез. – Дніпропетровськ, 2015. – С. 39. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді)

18. Паронік В. А. Активність антиоксидантної системи та протеолізу у щурів з ішемією міокарду / **В. А. Паронік**, О. Е. Шаульська, Л. М. Дяченко, Ю. А. Гордієнко // X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології», 20-23 квітня 2015 р.: збірник тез. – Львів, 2015. – С. 112-113. (Здобувач брала участь у проведенні досліджень, опрацюванні та аналізі експериментальних даних, написанні та оформленні тез доповіді)

19. Паронік В. А. Вплив корвітину та інспри на стан антиоксидантної системи та активність протеолітичних ферментів за ізадринової ішемії міокарду / **В. А. Паронік**, О. Е. Шаульська, А. І. Шевцова // III міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», 24-25 вересня 2015 р.: збірник тез. – Дніпропетровськ, 2015. – С. 139-140. (Здобувач особисто провела дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку).

20. Паронік В. А. Конечные продукты гликирования и ферменты антиоксидантной системы при экспериментальной ишемии миокарда у крыс / **В. А. Пароник**, А. И. Шевцова // Научная конференции молодых ученых «Современные достижения молодых ученых в медицине 2015», 27 ноября 2015 г: сборник материалов. – Гродно, 2015. – С. 151-154. (Здобувач особисто провела дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала матеріали до друку)

АНОТАЦІЯ

Ткаченко В. А. Окисна модифікація білків та шляхи її запобігання за умов експериментальної ішемії міокарда – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню процесів неферментативних посттрансляційних модифікацій білків за умов розвитку карбонільно-окисного стресу (КОС) у щурів з експериментальною ішемією міокарда і визначенню шляхів запобігання негативним наслідкам цих процесів. Показники окисної модифікації білків (ОМБ), рівень кінцевих продуктів глікації та AGE-R3, що є їхнім рецептором, активність протеолітичних та антиоксидантних ферментів досліджувались у щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарда та пітуїтрин-ізадрин-індукованим ушкодженням міокарда (ПШУМ) за дії різних за фармакологічними властивостями препаратів (корвітин, 2-оксоглутарат, аміногуанідин, еплеренон та доксициклін). Доведено, що всі зазначені препарати знижують прояви КОС, активуючи шляхи знешкодження активних форм кисню та інактивації дикарбонільних сполук, регулюючи активність ферментів антиоксидантної системи, а також деградацію та виведення продуктів ОМБ.

Дослідження AGE-R3 методом іммуноблотингу дозволило встановити здатність цього рецептору до олігомеризації. Встановлено зміни розподілу моно- та олігомерних форм AGE-R3 при експериментальній ішемії міокарда та за впливу кардіопротекторних препаратів, що досліджувались в роботі.

Знайдені закономірності поглиблюють та розширюють уявлення про молекулярні механізми розвитку серцево-судинних захворювань та ускладнень, що виникають на тлі цих патологічних станів, і надають важливу інформацію про шляхи їхньої метаболічно обґрунтованої корекції.

Ключові слова: антиоксидантна система, ішемія міокарда, карбонільно-окисний стрес, кардіопротекторні препарати, кінцеві продукти глікації, протеоліз, окисна модифікація білків, рецептори.

АННОТАЦИЯ

Ткаченко В. А. Окислительная модификация белков и пути ее предотвращения в условиях экспериментальной ишемии миокарда - на правах рукописи.

Дисертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Львовский национальный университет имени Ивана Франка, Львов, 2019.

Дисертация посвящена исследованию процессов неферментативных посттрансляционных модификаций белков в условиях развития карбонильно-окислительного стресса (КОС) у крыс с экспериментальной ишемией миокарда и определению путей предотвращения негативных последствий этих процессов. Показатели окислительной модификации белков (ОМБ), уровень конечных продуктов гликирования и их рецепторов (AGE-R3), активность протеолитических и антиоксидантных ферментов исследовались у крыс с адреналин-индуцированной ишемией миокарда (АИМ) и питуитрин-изадрин-индуцированным повреждением миокарда (ПИПМ) при действии корвитина, 2-оксоглутарата, аминокуанидина, еплеренона и доксициклина. Было показано, что все указанные препараты снижают проявления КОС, активируя пути обезвреживания активных форм кислорода и инактивации дикарбонильных соединений, регулируя активность ферментов антиоксидантной системы, а также деградацию и выведение продуктов ОМБ.

Исследование AGE-R3 методом иммуноблотинга позволило установить способность этого рецептора к олигомеризации. Установлено изменения распределения моно- и олигомерных форм AGE-R3 при экспериментальной ишемии миокарда и при воздействии кардиопротекторных препаратов, которые исследовались в работе.

Найденные закономерности углубляют и расширяют представления о молекулярных механизмах развития сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений, возникающих на фоне этих патологических состояний, и дают информацию о путях их метаболически обоснованной коррекции.

Ключевые слова: антиоксидантная система, ишемия миокарда, карбонильно-окислительный стресс, кардиопротекторные препараты, конечные продукты гликирования, протеолиз, окислительная модификация белков, рецепторы.

ANNOTATION

Tkachenko V A. Oxidative modification of proteins and ways of their prevention in conditions of experimental myocardial ischemia. – Manuscript.

Thesis on obtaining a scientific degree of Ph.D. in biological sciences, speciality of 03.00.04. - biochemistry. - Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2019.

The dissertation is devoted to the study of non-enzymatic post-translational modifications of proteins (OMP) and identifying ways to prevent the negative effects of these processes under conditions of development of carbonyl-oxidative stress (COS) in rats with experimental myocardial ischemia. Indicators of OMP, the level of advanced glycation end products (AGEs), AGE-R3 and the activity of proteolytic and antioxidant enzymes in rats with epinephrine-induced myocardial ischemia and pituitrine-isoprenaline-induced myocardial damage (PIMD) were investigated in the work. Exogenous antioxidants, such as quercetin and 2-oxoglutarate; hypoglycemic drug as aminoguanidine and drugs that can affect the processes of degradation of modified proteins as doxycycline and epleranone to assess the possible ways of pharmacological correction of metabolic disorders arising from COS were used.

All tested drugs reduce COS, by activating the ways of ROS neutralization and dicarbonyl compounds inactivation, by regulating the activity of enzymes of the antioxidant system (the level of SOD in erythrocytes of PIMD- rats almost did not change, activity of catalase in plasma decreased by nearly 5 times, while in contrast, the activity of glutathioneperoxidase in erythrocytes, increased by 1,5 times), and changing in the proteolytic/anti-proteolytic balance (MMP9 activity and α 2-macroglobulin level significantly increases in blood, whereas MMP2 activity and α 1-proteinase inhibitor level increases in heart) and excretion of OMP products.

We established that effects of small doses of doxycycline are comparable to or are greater than the effect of classical antioxidants, such as aminoguanidine and quercetin, and the use of this drug is promising for the treatment of postinfarction heart failure.

Investigation of the level of AGE-R3 level, which has AGEs scavenger-receptor properties, allowed us to establish its ability to the oligomerization and redistribution of AGE-R3 forms in experimental myocardial ischemia. We also showed, that antioxidants and doxycycline reduce, the amount of all AGE-R3 forms, except for the tetrameric AGE-R3. This form is significantly increased even in comparison to the PIMD-group. The amount of mono-AGE-R3 decreased tremendously and the level of its oligomeric forms increased after the treatment with Q. In contrast, amount of mono-AGE-R3 forms increased in 5 times and its oligomerization reduced after the treatment with E.

The results of this study expand understanding of the molecular mechanisms underlying the development of cardiovascular diseases and its complications, and provide important information regarding the ways of their metabolic-based correction.

Key words: antioxidant system, proteolysis, myocardial ischemia, oxidative-carbonyl stress, cardioprotective medications, advanced glycation end products, proteolysis, oxidative modification of proteins, receptors.