МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЗ «ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ МОЗ УКРАЇНИ»
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ТКАЧЕНКО ВІКТОРІЯ АНДРІЇВНА

УДК 616.127-005.4-085-092.9:577.112.4

ДИСЕРТАЦІЯ

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

03.00.04 – біохімія
Біологія

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
(кандидата біологічних наук)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ /Ткаченко В. А./

Науковий керівник: **ШЕВЦОВА АЛЛА ІВАНІВНА**
доктор біологічних наук, професор

Дніпро, 2019

АНОТАЦІЯ

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

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, рівень кінцевих продуктів глікації та галектину-3, що є їхнім рецептором, активність протеолітичних та антиоксидантних ферментів досліджувались у щурів з адреналін-індукованою ішемією міокарда (АІМ) та пітуїтрин-ізадрин-індукованим ушкодженням міокарда (ПІУМ). Для оцінки можливих шляхів фармакологічної корекції метаболічних порушень, що виникають за КОС, застосовували антиоксиданти (корвітин та 2-оксоглутарат), гіпоглікемізуючий препарат аміногуанідин, а також лікарські засоби доксициклін та еплеренон, що здатні впливати на процеси деградації модифікованих білків.

Ішемічна хвороба серця (ІХС) є одним з найбільш загрозливих патологічних станів, який призводить до погіршення якості життя та втрат населення. Незважаючи на велику кількість досліджень, частота виникнення ІХС і несприятливих кардіоваскулярних подій залишаються неодмінно високими. Окисний стрес, що виникає внаслідок порушення балансу між постачанням та використанням кисню в ішемізованому мокарді, вважається основним патогенетичним чинником гострого інфаркту міокарда та його подальших ускладнень. Останнім часом з’являється все більше доказів того, що поряд з окисним стресом за ішемії міокарда розвивається карбонільний стрес,

що призводить до незворотної модифікації протеїнів та порушення їхніх структурно-функціональних властивостей.

Під час дослідження було показано, що за введення адреналіну в дозі 0,2 мг/100 г маси впродовж 10 днів або за комбінованого введення пітуїтрину та ізадрину у щурів спостерігаються фізіологічні та біохімічні зміни, що є характерними для ішемічного стану. Ішемічне ушкодження міокарда було підтверджено гістологічними дослідженнями, в яких було показано наявність некротичних кардіоміоцитів, ознак запалення та початкових стадій розвитку фіброзу у лівому шлуночку, виснаження глікогену навколо уражених локусів, що свідчило про активацію споживання енергії у постішемізованому міокарді. Ішемія міокарда у щурів спричиняла карбонільно-окисний стрес, підтвердженням чого було вірогідне збільшення в крові та серці вмісту ТБК-активних продуктів (ТБКАП), альдегід- та кетонфенілгідразонів, тобто ранніх та пізніх маркерів окисної модифікації білків. Одночасно збільшувалась кількість кінцевих продуктів глікації (КПГ), хоча рівень глюкози практично не змінювався і визначався в межах нормальних значень. Встановлена в роботі кореляція між ТБКАП та КПГ (r=0,61) свідчить про взаємозв’язок між процесами карбонільної та окисної модифікації білків.

КОС та його негативні наслідки можуть бути результатом не тільки збільшення активних форм кисню (АФК) та активних карбонільних сполук (АКС), а й порушенням активності ферментів антиоксидантної системи: СОД, каталази та системи глутатіону. За нашими даними, ішемія міокарда призводила до різноспрямованих змін зазначених ензимів. Рівень СОД в гемолізаті еритроцитів тварин з ПІУМ практично не змінювався, тоді як активність інших досліджуваних ферментів антиоксидантного захисту зазнавала суттєвих змін: активність каталази в плазмі крові знизилась майже у 5 разів, в той час як активність глутатіонпероксидази в еритроцитах, навпаки, підвищилась у 1,5 раза. Така різноспрямована реакція цих ферментів на КОС відображає різну спорідненість до пероксиду водню, що є субстратом для обох

ферментів і свідчить про високу швидкість утворення цієї речовини у щурів з ПІУМ. З іншого боку, зниження активності каталази може бути наслідком окисної модифікації цього ферменту, який за даними літератури є надзвичайно чутливим до підвищення КПГ.

Розвиток КОС та збільшення продуктів окисної модифікації білків пов'язані з порушенням протеазно-інгібіторного балансу в крові та серцевому м'язі експериментальних тварин. Під час дослідження встановлено, що активність серинових протеїназ практично не змінюється, тоді як активність цинкових протеїназ ММП2/9, навпаки, збільшується, причому спостерігається протилежність змін в крові та серці: в крові вірогідно збільшується активність ММП9, а в серці – ММП2. Одночасно змінюється кількість інгібіторів серинових протеїназ: в крові підвищується рівень α2-макроглобуліну, а в серці – α1-інгібітора протеїназ. Зазначені зміни можуть призводити до зниження процесів деградації та оновлення окисно-модифікованих білків у крові та серцевому м'язі ішемізованих тварин.

Вагоме значення у метаболічних порушеннях за умов КОС мають білок-рецепторні взаємодії. Дослідження рівня галектину 3 (AGE-R3), який має властивості скавенджер-рецептора КПГ, дозволило встановити здатність цього лектину до олігомеризації та перерозподіл його форм за умов експериментальної ішемії міокарда. Збільшення олігомерних форм за ПІУМ свідчить про активацію взаємодії КПГ-модифікованих білків з AGE-R3, наслідком чого може бути, з одного боку, активація процесів внутрішньоклітинного сигналювання модифікованих білків, а з іншого, прискорення процесів їхньої детоксикації.

Оцінка впливу різних за фармакологічними властивостями препаратів на рівень ОМБ та КПГ, активність протеолізу та антиоксидантних ензимів дозволила встановити, що всі вони 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. 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 і корвітину, що визначає перспективність використання цього препарату в лікуванні постінфарктної серцевої недостатності. Показано, що під дією антиоксидантів та доксицикліну знижується кількість усіх форм AGE-R3, за виключенням тетрамерної, кількість якої вірогідно підвищується під дією зазначених препаратів, навіть у порівнянні з групою з ПІУМ. Особливо значні зміни розподілу моно- и тетрамерних форм мали місце за дії корвітину. Антагоніст альдостерону еплеренон, навпаки, підвищував вміст мономерних форм на тлі зменшення його олігомерних форм.

Знайдені закономірності поглиблюють та розширюють уявлення про молекулярні механізми розвитку серцево-судинних захворювань та ускладнень, що виникають 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.

SUMMARY

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

Dissertation thesis on obtaining the scientific degree of PhD (Biology) in the speciality 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 in rats with experimental myocardial ischemia. Indicators of oxidative modification of proteins, the level of advanced glycation end products (AGEs), galectine-3 (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. To assess the possible ways of pharmacological correction of metabolic disorders arising from carbonyl-oxidative stress a set of drugs was used. These drugs include exogenous antioxidants, such as quercetin and 2-oxoglutarate, a hypoglycemic drug, aminoguanidine, and drugs that can affect degradation of modified proteins, doxycycline and eplerenone.

Coronary heart disease (CHD) is one of the most threatening pathological conditions, which leads to a deterioration in the quality of life and death. The incidence of CHD and adverse cardiovascular events remains high despite the large number of studies. Oxidative stress is considered to be the main pathogenetic factor of acute myocardial infarction and its subsequent complications. It may arise as a result of the disturbance in a balance between supply and use of oxygen in ischemia/reperfusion. There has been growing evidence that in myocardial ischemia oxidative stress is accompanied with the development of carbonyl stress, which leads to irreversible modification of proteins and impairment of their structural and functional properties.

Physiological and biochemical changes that are characteristic for the ischemia after the epinephrine injection (0,2 mg/100 g ,10 days) or after the combined administration pituitrine and isoprenaline in rats were demonstrated. Ischemic damage to myocardium was confirmed by histological studies. There were necrotic cardiomyocytes, signs of inflammation and initial stages of fibrosis in the left ventricle and glycogen exhaustion around the affected areas, which together indicated activation of the energy consumption in post-ischemic myocardium. Myocardial ischemia in rats led to carbonyl-oxidative stress which was accompanied by the significant increase of TBA-active products (TBAAP), and aldehyde and ketone-

phenylhydrazones , early and late markers of oxidative protein modification, respectively, in blood and heart muscle. Simultaneously, there was increase of an AGEs level, while a glucose level did not exceed control values. A correlation between TBAAP and AGE (r=0,61) found in this study indicates the relationship between carbonyl and oxidative modification of proteins.

Carbonyl-oxidative stress and its negative effects can arise from an increase in reactive oxygen species (ROS) and reactive carbonyl compounds (RCOs), and in addition from the impairment of the activity of antioxidant enzymes such as SOD, catalase and glutathione system. Our results showed that myocardial ischemia led to differential changes of these enzymes: 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. A multi-directional change in activity of these enzymes reflects their different affinity for hydrogen peroxide, which is a substrate for both enzymes, and indicates a high rate of formation of this substance in PIMD-rats. Furthermore, a decrease in the activity of catalase may be a result of the oxidative modification of this enzyme, which according to the literature is extremely sensitive to the increase of AGEs levels. Carbonyl-oxidative stress development and increase of OMP products is associated with a disruption of the proteolytic/anti-proteolytic balance in blood and heart muscle of experimental animals. We established that activity of serine proteases almost does not change, while MMP 2/9 activity changes in blood and heart in different ways: MMP9 activity significantly increases in blood and MMP2 activity increases in heart. Simultaneously, the levels of serine proteases inhibitors change, in particular, the α2-macroglobulin level is elevated in blood, and the α1-proteinase inhibitor level increases in heart. These changes can lead to a reduction in degradation and renewal of OMP in blood and heart muscle of ischemic animals. Investigation of the level of AGE-R3 level, which has AGEs scavenger-receptor properties, of allowed us to establish its ability to the olygomerization and redistribution of AGER-3 forms in experimental myocardial ischemia.

Assessing the effect of drugs with various pharmacological properties on OMP, AGEs, proteolysis and activity of anti-oxidant enzymes we found that all tested drugs reduce carbonyl-oxidative stress, by activating the ways of ROS neutralization and dicarbonyl compounds inactivation, by regulating the activity of enzymes of the antioxidant system and degradation and excretion of OMP products.

Low doses of doxycycline reduce the level of protein carbonyl modification products and normalize the oxidative stress index. Notably, 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 We also showed, that the antioxidants (quercetin, 2-oxoglutarate, aminoguanidine) and doxycycline reduce the amount of all AGE-R3 forms, except for the tetrameric AGE-R3. This form was 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 (in comparison to PIMD) after the treatment with quercetin. In contrast, amount of AGE-R3 monomeric forms increased in 5 times and its oligomerization reduced after the treatment with eplerenone.

In conclusion, 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.

СПИСОК 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 корвітин та 2-оксоглутарат, досліджувала фізіологічні параметри та показники карбонільно-оксидативного 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 галекину-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. Лєвих, 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 Белоруско-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**. Ефект еплеренону на показники оксидативно-карбонільного стресу 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. Shauls'ka, 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-кетоглутората 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.

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 // ІІІ 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. **Пароник 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).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ……..		1
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……		16
ВСТУП…….		19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ……		26
1.1. Сучасні погляди на механізми розвитку карбонільно-окисного стресу за ішемії міокарда……		26
1.2. Окисна модифікація білків як чинників дестабілізації метаболізму…….		28
1.2.1.	Типи окисної модифікації протеїнів……..	28
1.2.2.	Вплив окисної модифікації білків на метаболічні процеси……	30
1.3. Механізми та наслідки неферментативної глікації білків…….....…….		33
1.3.1.	Шляхи утворення активних карбонільних сполук та кінцевих продуктів глікації……..……...	33
1.3.2.	Рецептор-незалежні ефекти глікації білків……...	36
1.3.3.	Рецептори та рецептор-залежні ефекти продуктів глікації…….	38
1.4. Шляхи запобігання окисної модифікації білків……...		43
1.4.1.	Роль антиоксидантної системи у знешкодженні АФК, альдегід- та кетонфенілгідразонів …….....	44
1.4.2.	Детоксикація активних карбонільних сполук……..	45
1.4.3.	Роль процесів протеолізу у знешкодженні продуктів окисної модифікації білків …….	47
1.4.4.	Препарати, що запобігають окисній модифікації білків……..	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ…..……		54
2.1. Реагенти та матеріали досліджень……..		54
2.2. Моделі ішемічного ушкодження міокарда ……		55
2.3. Біохімічні методи дослідження……...		56
2.3.1	Отримання клітинних фракцій серцевого м’яза……...	56
2.3.2.	Визначення концентрації загального білка, гемоглобіну та глюкози у плазмі експериментальних тварин……	57
2.3.3.	Отримання гемолізату еритроцитів……...	59

2.3.4.	Отримання глікованого альбуміну……	59
2.3.5.	Методи оцінки окисної модифікації білків……...	60
	Визначення альдегід- та кетонфенілгідразонів ……..	60
	Визначення рівня флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації..…	61
	Визначення рівня ТБК-активних продуктів……..	61
2.3.6.	Визначення активності ензимів антиоксидантної системи……..…...	62
	Оцінка активності каталази …….....	62
	Визначення активності глутатіонпероксидази ….……	63
	Визначення активності глутатіонредуктази……..……..	63
	Оцінка рівня супероксиддисмутази…….……	64
2.3.7.	Методи оцінки показників протеазно-інгібіторної ланки……..……	65
	Визначення активності трипсиноподібних ензимів…….……	65
	Желатин-зимографія……	65
	Визначення α1-інгібітора протеїназ……...	67
	Визначення α2-макроглобуліну……	67
2.3.8.	Визначення галектину-3……	68
2.4. Фізіологічні та гістологічні методи дослідження…….		69
	Тест відкритого поля……...	69
	Електрокардіографія……	69
	Гістологічні дослідження ……...	70
2.5. Статистична обробка даних …….……...		71
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ……		72
3.1. Показники окисної модифікації та шляхи її запобігання за умов адреналінової ішемії міокарда (АІМ) (модель 1)…….		72
3.1.1.	Зміни фізіологічних та біохімічних параметрів у щурів під дією адреналіну та вплив на них кардіопротекторних препаратів…….	72
3.1.2.	Показники окисної модифікації протеїнів та ензимів-антиоксидантної системи у експериментальних щурів……	76

3.1.3.	Зміни показників протеазно-антипротеазного балансу у експериментальних тварин…….	79
3.1.3.1.	Зміни активності трипсиноподібних ензимів та неспецифічних інгібіторів протеолізу у експериментальних тварин……..	79
3.1.3.2.	Активність матриксних металопротеїназ 2/9 у експериментальних тварин……..	81
3.2. Показники окисної модифікації та шляхи її запобігання за умов пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда (ПІУМ) (Модель 2)……		84
3.2.1.	Зміни фізіологічних параметрів за ПІУМ та вплив на них кардіопротекторних препаратів……..	84
3.2.2.	Гістологічні зміни у щурів з ПІУМ та вплив на них антиоксидантів	87
3.2.3.	Показники карбонільно-окисного стресу в плазмі крові……	91
3.2.4.	Зміни показників окисної модифікації білків у серцевому м’язі …..	93
3.2.5.	Активність ензимів антиоксидантної системи…….	95
3.3. Активність матриксних металопротеїназ 2/9 у експериментальних щурів		100
3.4. AGE-R3 у плазмі крові за умов ПІУМ та за впливу кардіопротекторних препаратів……..		103
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ……		106
4.1. Обгрунтування наявності ішемічного ушкодження міокарда у експериментальних тварин……		106
4.2. Розвиток карбонільно-окисного стресу та посттрансляційні неензиматичні модифікації протеїнів за експериментальної ішемії міокарда..		109
4.3. Роль антиоксидантів та кардіопротекторних препаратів у запобіганні окисної модифікації білків……		115
4.4. Олігомеризація AGE-R3 у щурів з експериментальною ішемією міокарда …….		120
ВИСНОВКИ…….		126
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……...		128

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

2-ОГ	– 2-оксоглутарат
α1-ІП	– α1-інгібітор протеїназ
α2-МГ	– α2-макроглобулін
АсАТ	– аспартатамінотрансфераза
АІМ	– адреналін-індукована ішемія міокарда
АЛДГ	– альдегіддегідрогеназа
АСБ	– атеросклеротична бляшка
АОЗ	– антиоксидантний захист
АОС	– антиоксидантна система
АФА	– активні форми азоту
АФК	– активні форми кисню
ВРО	– вільнорадикальне окиснення
ВМКПГ	– високомолекулярні кінцеві продукти глікації
БАНІ	– N-бензоїл-D,L-аргінін-4-паранітроанілід гідрохлорид
БСА	– бичачий сироватковий альбумін
ГП	– глутатіонпероксидаза
ГР	– глутатіонредуктаза
ГSTT	– глутатіонтрансфераза
ГЕБ	– гематоенцефалічний бар’єр
ДАБ	– діамінобензидин
ЕЦМ	– екстрацелюлярний матрикс
ЗБ	– загальний білок
ЗФР	– забуферений фізіологічний розчин
ІХС	– ішемічна хвороба серця
ІЛ	– інтерлейкін
ІМ	– ішемія міокарда
КОС	– карбонільно-окисний стрес

КПГ	– кінцеві продукти глікації
ЛПВГ	– ліпопротеїни високої густини
ЛПНГ	– ліпопротеїни низької густини
МАПК	– мітоген-активована протеїнкіназа (MAPK)
МАО	– моноаміноксидази
МДА	– малоновий діальдегід
ММП	– матриксна металопротеїназа (MMP)
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
НМКПГ	– низькомолекулярні кінцеві продукти глікації
ОМБ	– окисно-модифіковані білки
ОС	– окисний стрес
ПААГ	– поліакриламідний гель
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
ПІУМ	– пітуїтрин-ізадрин-індуковане ушкодження міокарда
СФСМ	– субклітинні фракції серцевого м’яза
ТПЕ	– трипсиноподібні ензими
ТБК	– тіобарбітурова кислота
ТФБ	– твін фосфатний буфер
ТФР-β	– трансформувальний фактор росту β (TGF-β)
ФНП-α	– фактор некрозу пухлин α (TNF-α)
AGE-R3	– рецептор, галектин-3
4HNE	– 4-гидроксиноненаль
Aβ	–β- амілоїдний білок
GOLD	– гліоксаль-лізиновий димер
GSH	– відновлений глутатіон
MOLD	– метилгліоксаль-лізиновий димер
3DG-H	– 3-дезоксиглюкозон
CAR	– constitutive androstane receptor

CML	– Nδ-карбоксиметиллізин
MG	– метилгліоксаль
NF-κB	– ядерний фактор транскрипції κB
Hb	– гемоглобін
RAGE	– receptor for advanced glycation end products
TLR	– Toll-like рецептор
SR	– скавенджер-рецептор
SDS	– додецилсульфат натрію
PAS	– periodic acid-Schiff-diastase
PAI-1	– інгібітор активатора плазміногену
PG-I2	– антитромботичний простациклін (простагландін)

ВСТУП

Актуальність роботи. Ішемічна хвороба серця (ІХС) займає перше місце серед причин інвалідизації та смертності у більшості економічно розвинених країн. За даними Всесвітньої асоціації лікарів у Європі з кожним роком смертність від серцево-судинних захворювань сягає приблизно 3 млн. людей, у США – 1 млн. В Україні смертність від хвороб серця та системи кровообігу у 2-4 рази вища ніж у країнах ЄС та світу, причому в нашій країні від цих захворювань вмирають не тільки частіше, але й у більш молодому віці [9, 14, 18]. Серед факторів, що провокують розвиток ІХС, привертають увагу 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, призводячи до окисної модифікації білків (ОМБ) і підсилення експресії генів прозапальних та проапоптичних білків [41]. Останнім часом окисний стрес пов’язують з утворенням активних карбонільних сполук (АКС) і формуванням кінцевих продуктів глікації (КПГ) [122, 153]. Раніше утворення цих речовин пояснювали тривалою гіперглікемією, що спостерігається при цукровому діабеті, але накопичення даних свідчить, що вони приймають участь у патогенезі інших захворювань, не пов’язаних з цукровим діабетом [160, 178]. Встановлена роль КПГ у патогенезі кардіоренального синдрому [223], але досліджень, присвячених ролі ОМБ та КПГ у розвитку ІХС недіабетичного походження, практично немає.

Накопичення продуктів ОМБ може не тільки змінювати властивості протеїнів, а й запускати окремі механізми сигналінгу після їх взаємодії з рецепторами. Серед таких рецепторів вартий уваги галектин-3 (AGE-R3), який бере участь у розвитку атеросклеротичних змін судинного ендотелію [145, 87].

Підвищення рівня цього лектину розглядають як маркер ускладнень гострого інфаркту міокарда та фактор високого ризику смерті [164, 235]. 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 інфаркта міокарда (ГІМ).

Оскільки ішемія міокарда пов'язана з окисною модифікацією біомолекул, значна увага приділяється препаратам, що можуть проявляти кардіопротекторні властивості за рахунок гальмування або активації знешкодження токсичних продуктів карбонільно-окисного стресу. До зазначеної групи препаратів відносяться біофлавоноїд кверцетин, аміногуанідин та 2-оксоглутарат, які досить широко використовуються в профілактиці запальних процесів [134, 184, 229, 77], але роботи, присвячені впливу цих речовин на показники карбонільно-окисного стресу та шляхи знешкодження його токсичних продуктів при ішемії міокарда практично відсутні. Одним зі способів знешкодження продуктів ОМБ та КПГ може бути їх деградація під дією протеолітичних ферментів, серед яких складові убіквітин-протеасомної системи [211, 202]. Останнім часом з'явились нові дослідження щодо кардіопротекторної дії доксицикліну (Д). Цей тетрацикліновий антибіотик здатний інгібувати матриксні металопротеїнази та протеоліз у екстрацелюлярному матриксі. Разом з тим присутність багатозаміщеного фенольного кільця може забезпечити нейтралізацію вільних радикалів [88], 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 калій-зберігаючий діуретин еплеренон (фармакологічна форма – інспра), що застосовується при лікуванні серцевої недостатності після перенесеного ІМ, проте механізм його лікувальної дії остаточно не з'ясований. Аналіз літературних даних наводить на думку, що цей препарат може впливати на посттрасляційні модифікації, процеси сигналінгу та деградації

модифікованих протеїнів [22, 236]. Зважаючи на вищесказане, актуальним напрямком є дослідження показників карбонільно-окисного стресу та системи їх знешкодження за експериментального ушкодження міокарда, оцінка впливу антиоксидантів та кардіопротекторних препаратів на ці показники і обґрунтування гіпотези про роль карбонільно-окисного стресу в розвитку серцево-судинних захворювань недіабетогенного походження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в лабораторії біохімії ДЗ "Дніпропетровської медичної академії 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-ізадринової 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 α1-інгібітора протеїназ за умов адреналінової та пітуїтрин-ізадринової експериментальної 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-ізадринового ушкодження міокарда.

6. Визначити рівень рецепторів до кінцевих продуктів глікації типу AGER-3 в крові та оцінити вплив на них кардіопротекторних препаратів.

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

Предмет дослідження – показники карбонільної та окисної модифікації протеїнів, активність ферментів антиоксидантного захисту, матриксних металопротеїназ, трипсиноподібних ферментів та їх інгібіторів, рівень галектину-3 та ступінь його олігоммерізації, функціонально-гістологічна 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 та поведінкові реакції, гістологічні методи, 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 – α2-макроглобуліну та збільшення у два рази концентрації α1-інгібітора протеїназ у серці. У плазмі щурів з пітуїтрин-ізадриновим ушкодженням міокарда (ПІУМ) вірогідно 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 на активність антиоксидантних ферментів, ступінь окисної модифікації протеїнів в субклітинних фракціях лівого шлуночка та співвідношення ТБК/КПГ доводить, що корегування зазначених показників є невід'ємною частиною їхньої кардіопротекторної дії. Уперше встановлено, що низькі дози доксицикліну знижують рівень продуктів окисної 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 фіброзування тканин та формування постінфарктної серцевої недостатності.

Аналіз галектину-3 (AGE-R3), який може виступати як скавенджер-рецептор КПГ, 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 ПІУМ. 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 пошуку метаболічно обґрунтованих терапевтичних заходів. 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 КПГ-рецепторну активність. Результати роботи впроваджено в наукові дослідження, що виконуються на кафедрі внутрішньої медицини. За результатами роботи отримано патент на корисну модель, відтворення якого дозволяє оцінювати рівень КПГ у клінічних лабораторіях. Матеріали досліджень використовуються при викладанні курсу біохімії у розділах «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, 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, 2018).

Публікації результатів дослідження: за темою дисертації опубліковано 20 робіт, серед яких 9 статей (7 – 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.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні погляди на механізми розвитку карбонільно-окисного стресу за ішемії міокарда

Ішемія міокарда (ІМ) – найпоширеніша хвороба, на яку страждає значна частина населення і яка є найчастішою причиною смерті в світі. Незважаючи на значні успіхи у лікуванні цієї хвороби, розробку багатьох фармакологічних препаратів та втілення сучасних засобів терапії, серцева патологія залишається серйозною проблемою людства. Кількість людей з серцево-судинними захворюваннями становить близько 25 мільйонів [175], щорічно помирають від ІХС понад 7,4 мільйонів осіб, що становить 13,2 % від усіх смертей. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я у країнах Європи від цього захворювання помирають кожен шостий чоловік і кожна сьома жінка [18].

Відомо, що особливу роль у патогенезі порушень метаболізму при ІМ відіграє розвиток окисного стресу (ОС), який пов’язаний з порушенням балансу між постачанням та споживанням кисню ішемізованим міокардом. Недостатність кровопостачання серця в момент часткової або повної закупорки однієї чи декількох коронарних артерій, та за підвищення рівня артеріального тиску провокує гіпоксію при ІХС. Поновлення кровотоку при ішемії/реперфузії призводить до мікроемболізації, змін у клітинах крові, набряку та судинної компресії, що спричиняє ушкодження ендотелію [201].

Відновлення коронарного кровотоку після оклюзії судин – «двосічний меч», що може, з одного боку, покращити стан міокарда, а з іншого – маніфестувати додаткове ушкодження внаслідок нездатності кардіоміоцитів утилізувати збільшене надходження кисню. Це явище отримало назву «синдром реперфузії», частота якого становить близько 30 % [31]. Гіпероксидація, в свою чергу, може ініціювати окисний стрес у клітинах міокарда за рахунок

утворення надмірної кількості активних форм кисню (АФК) та розвитку дисбалансу у системі про та антиоксидантів. Окисний стрес призводить до перекисного окиснення ліпідів, порушення структури мембран кардіоміоцитів. Одночасно активується процес окисної модифікації функціонально важливих білків, зокрема, цитохромів дихального ланцюга, міоглобіну та інших структур. Так виглядає спрощена модель постперфузійного метаболічного кола розвитку і прогресування ішемічного ушкодження міокарда [41].

Клітинні механізми, що ініціюють продукування і потік АФК та інших радикалів і призводять до прогресування захворювання, можуть відрізнятись в залежності від типу ушкодження міокарда [54, 187]. Наприклад, накопичення сукцинату під час ішемії серцевого м’язу є достатнім для того, щоб викликати масове генерування АФК шляхом індукції зворотного електронного транспорту під час реперфузії. Ця консервативна метаболічна відповідь була запропонована як критичний процес, відповідальний за ушкодження при ішемії-реперфузії, і, відтак, є перспективною терапевтичною мішенню за ішемічного захворювання серця [78]. Проте його тривалий вплив на ішемічну кардіоміопатію чи серцеву недостатність ще не визначений.

Останнім часом з’явились роботи, в яких пов’язують ІМ не тільки з розвитком окисного, але й карбонільного стресу, за рахунок якого відбувається гостре чи хронічне збільшення рівня активних карбонільних сполук (АКС) та активуються процеси неферментативної глікації, що призводить до порушення метаболізму клітини і ушкодження її компонентів [27]. Обидва типи стресів пов’язані між собою і підсилюють один одного, формуючі «порочне коло» порушень метаболізму. Тому був запропонований термін «карбонільно-окисний стрес» [37, 157].

Раніше термін КОС вживали при дослідженні діабету та його ускладнень, але накопичення експериментальних даних свідчить, що він має місце і за відсутності гіперглікемії. Як показав аналіз джерел літератури, роль КОС при ішемії міокарда недіабетогенного походження досліджувалась мало, дані

стосовно розвитку та метаболічних наслідків КОС за умов ішемії міокарда обмежуються обговоренням механізмів дії вільних радикалів кисню та азоту, а роль продуктів окисної модифікації та неферментативної глікації білків висвітлена недостатньо і потребує більш детального дослідження.

1.2. Окисна модифікація білків як чинник дестабілізації метаболізму

1.2.1. Типи окисної модифікації протеїнів

Білки є основними мішенями дії АФК та АКС, оскільки вони є основними органічними складовими і відповідають за більшість метаболічних процесів у клітинах. Було показано, що білки акцептують до 50-75 % АФК [51], що призводить до їхньої окисної модифікації і змін функціональної активності. Активні карбонільні сполуки також викликають модифікації протеїнів, які пов'язані з карбонілюванням радикалів амінокислот і схожі з процесами глікації. Продукти, що утворюються за дії АФК та АКС, мають певні відмінності, тому в цьому огляді розглядаються окремо.

Окисна модифікація білків (ОМБ) є результатом ковалентної модифікації, що проходить під дією активних форм кисню (O_2^-, H_2O_2, $OH^{\bullet}$, $^1O_2$), активних форм азоту ($NO^{\cdot}$, $ONOO^-$), а також під впливом продуктів окисного стресу. Крім зазначених вище кисневих радикалів та активних форм азоту (АФА), індукторами ОМБ можуть бути метали змінної валентності (Cu^{2+}, Fe^{3+}), активні карбонільні сполуки, в тому числі такі продукти ПОЛ як малоновий діальдегід (МДА), 4-гідроксиноненаль (4HNE) та акролеїн [56, 213]. Дві альдегідні групи у складі МДА обумовлюють його взаємодію з аміногрупами білків, а 4HNE може утворювати циклічні сполуки з радикалами лізину, гістидину та цистеїну, які в подальшому перетворюються на карбонільні похідні [28, 122].

На сьогодні найбільш вивченим варіантом ОМБ є формування карбонільних похідних внаслідок окиснення амінокислотних залишків

поліпептидного ланцюга [16, 104]. При цьому окиснення залишків лізину, аргініну, гістидину, проліну призводить до формування альдо- або кетопохідних, а за окиснення залишків глутамінової та аспарагінової кислот відбувається розщеплення пептидного зв'язку з утворенням пірувільної групи на N-кінці поліпептидного ланцюга [174]. За даними літератури альдегідні похідні прийнято вважати ранніми, а кетопохідні – пізніми маркерами ОМБ [12]. Описані вище типи карбонілювання відносять до первинних. Механізми утворення вторинних охоплюють реакції взаємодії реактивних альдегідів з лізином, гістидином і залишком цистеїну, а також формування основ Шиффа та утворення кінцевих продуктів глікації [138].

Формування СО-груп може проходити не тільки за дії АФК та АФА, але й за участі металів змінної валентності (метал-каталізоване окиснення), яке супроводжується утворенням гідроксильного радикалу на обмеженому сайті та окисною модифікацією лише сусідніх залишків амінокислот [29]. Найбільш чутливі до цього типу окиснення радикали гіс, арг, ліз, мет та цис, а також ароматичних амінокислот [67]. В залежності від типу амінокислоти утворюються різні продукти їхньої модифікації. Так, за окиснення цистеїну формуються сульфінова та сульфонова кислоти та глутатіонтіоли, окислення гідроксильної групи треоніну призводить до утворення аміно-кетобутирату, а окиснення триптофану та подальші перетворення призводять до формування його кінуренінових похідних. Кінцевим продуктом окиснення тирозину є бітирозин, утворення якого призводить до агрегації білків. Проявом окисної модифікації триптофану та тирозину є зміни їхньої флюоресценції: у похідних триптофану рівень знижується, а формування бітирозинових зшивок призводить до підвищення інтенсивності флюоресценції [16].

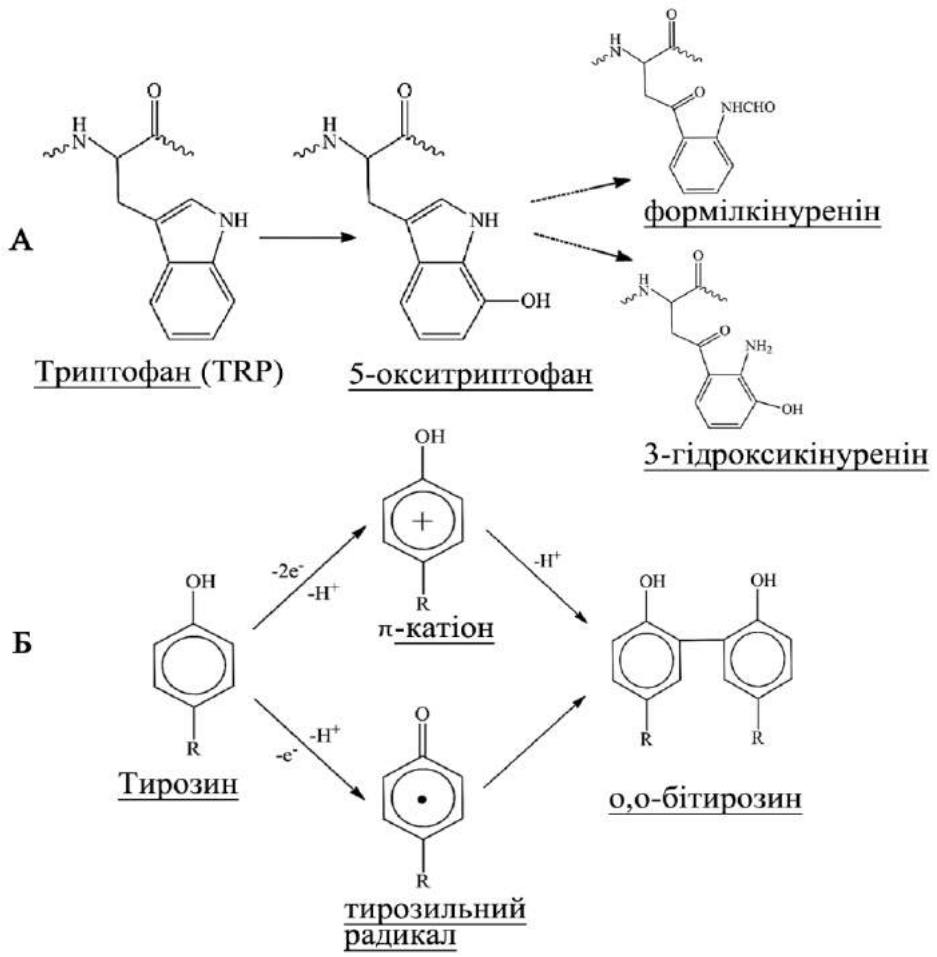

Рис. 1.1 **Окисна модифікація радикалів триптофану (А) і тирозину(Б)**

Окрему групу ОМБ складають нітротирозин та нітротіоли, що утворюються за умов підвищеного рівня АФА, але цей тип модифікації має селективний характер і залежить від просторової доступності радикалів тирозину [63].

1.2.2. Вплив окисної модифікації білків на метаболічні процеси

Окисна модифікація білків супроводжується зміною структури і функцій білків. В процесі окисної модифікації білки здатні змінювати молекулярну масу, що обумовлено процесами агрегації або фрагментації білкових молекул. Окисне ушкодження білків може бути як зворотним процесом, так і незворотним. Відомо, що зворотне карбонілювання деяких вільних амінокислот

за дії ферментативних процесів відповідає за повернення амінокислот до вихідного стану. Наприклад, 2-аміно-3-кетомасляна кислота може знову перетворитись на треонін за дії НАД-залежної треоніндегідрогенази, а продукт карбонілювання проліну – глутаміновий семіальдегід – можна відновити через проліндегідрогеназу [20, 224].

Вище обговорювалось, що найбільш розповсюдженим типом ОМБ є утворення карбонільних похідних, які можуть не тільки порушувати структуру та функції білків, але й брати участь у процесах сигналювання. Нещодавно була висунута гіпотеза, що зворотне первинне карбонілювання білка може регулювати події, пов'язані з передачею сигналу у клітини, та процеси подальших перетворень. Гіпотетична схема сигнальних механізмів, що пов'язані з первинним карбонілюванням, представлена на рис. 1.2.

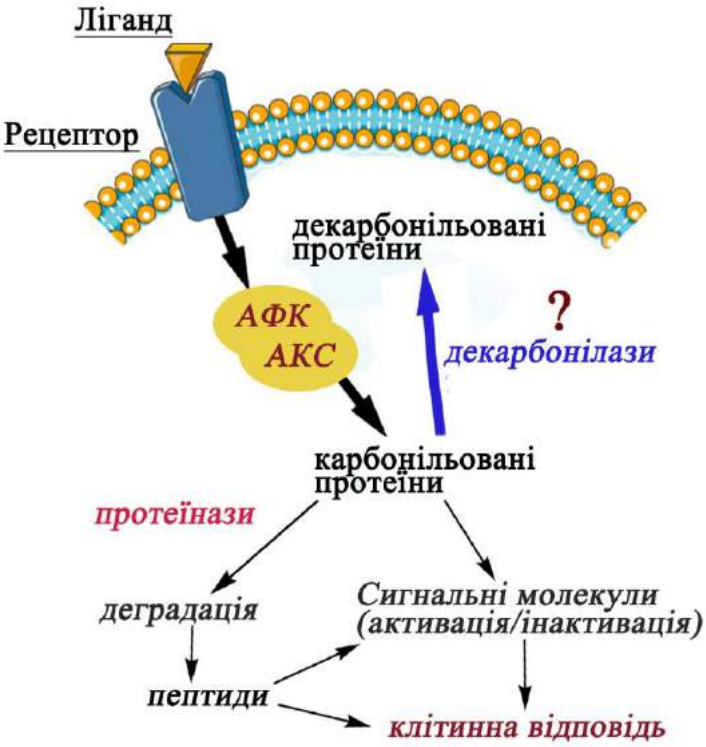

Рис. 1.2 **Схема сигналінгу, що включає первинне карбонілювання білка** (модифікація схеми Wong, 2012)

Згідно з цією гіпотезою, взаємодії рецепторів з лігандами викликають генерування АФК, що, у свою чергу, сприяє утворенню первинних карбонілів у

складі білка. Наслідки зворотного первинного карбонілювання можуть включати активацію/інгібування білків-мішеней, або їхню селективну деградацію протеасомами. Карбонілювання таргетного протеїну може бути оборотним за ще неідентифікованими декарбонілазами модифікованого білка [138, 224].

Запропонована схема сигналювання схожа з процесами регуляції метаболізму шляхом фосфорилювання-дефосфорилювання і може бути ще одним типом регуляції метаболізму шляхом хімічної модифікації, але ця гіпотеза потребує подальших досліджень.

Незворотне окиснення білків приводить до втрати ними біологічних властивостей, спричиняючи агрегацію чи деградацію. Агрегація білкових молекул відбувається за рахунок білок-білкових взаємодій, кон'югації з продуктами окиснення чи утворення ковалентних зв'язків. Так, утворення бітирозинових зшивок між окремими молекулами білків вважається однією з головних причин агрегації білків [17, 90, 113]. Формування ковалентних зшивок спонукає фізико-хімічні зміни властивостей білків, а саме – зниження їхньої розчинності за рахунок збільшення гідрофобності. Такі зшивки стійкіші до протеолізу, а білкові фрагменти, що накопичуються в клітині, мають токсичну дію, призводячи до апоптозу або некрозу клітини [118]. Накопичення продуктів неповного гідролізу протеїнів може бути також наслідком порушення балансу в системі фермент-інгібітор. Було показано, що однією з причин розвитку ендотеліальної дисфункції і ушкодження міокарда є окисна модифікація α1-антитрипсину та фібриногену [51]. Варто зазначити, що зв'язок між ступенем окисної модифікації білків та активністю ферментів, що забезпечують деградацію білків екстрацелюлярного матриксу, який є невід'ємною складовою серцево-судинної системи, практично не визначений.

1.3. Механізми та наслідки неферментативної глікації білків

1.3.1. Шляхи утворення активних карбонільних сполук та кінцевих продуктів глікації

Джерелами АКС в організмі можуть бути харчові продукти, що пройшли обробку за високої температури (екзогенні КПГ), а також метаболічні процеси, які можуть призвести до утворення ендогенних КПГ (рис. 1.3). Істотний внесок у формування останніх чинять реакції неферментативної глікації [27], поліолового шляху перетворення глюкози [119] та окисний стрес [214]. Відомо, що реакції неферментативної глікації починаються з утворення основ Шиффа при взаємодії вуглеводів (глюкози або фруктози) з аміногрупами радикалів амінокислот або азотистих основ. Ця оборотна реакція досягає стану рівноваги протягом 2-3-х годин. Основа Шиффа є нестабільною і через 30-40 годин може перейти в більш стабільний продукт – фруктозіламін або продукт Амадорі. Під час подальших реакцій розщеплення, дегідратації, окиснення і конденсації ці ранні продукти глікації перетворюються в стабільні КПГ. Крім того, в процесі гліколізу утворюються гліцеральдегідфосфат і діоксиацетонфосфат, дефосфорилювання яких може призводити до утворення таких активних карбонільних сполук (АКС) як гліоксаль і метилгліоксаль, які більш повільно метаболізуються, а їхня реактогенність щодо взаємодії з білками в 10-20 тисяч разів перевищує таку глюкози і фруктози [27, 207].

Крім гліколітичного розпаду глюкози, джерелом АКС може бути також поліоловий шлях перетворення глюкози, який відбувається під дією НАДФН-вмісної альдозоредуктази і НАД-вмісної сорбітолдегідрогенази. За нормальних умов цей шлях незначний і метаболічно спрямований на утворення фруктози з подальшим залученням її в синтез глюкозамінів. За гіперглікемії та деяких патологічних станів значна частина глюкози втягується в цей процес, утворюється велика кількість фруктози, метаболізм якої призводить до

утворення таких АКС як глюкозон і дезоксиглюкозон з подальшим формуванням КПГ [126, 99].

Карбонільні сполуки можуть утворитися не тільки з глюкози, а й за активації перекисного окиснення ліпідів і нуклеотидів, під час метаболізму кетонових тіл, а також при розпаді амінокислот треоніну і гліцину (рис. 1.3). В даний час у тканинах людини і тварин ідентифіковано близько 20 типів АКС, що утворюються ферментативними і неферментативними шляхами. [188, 215].

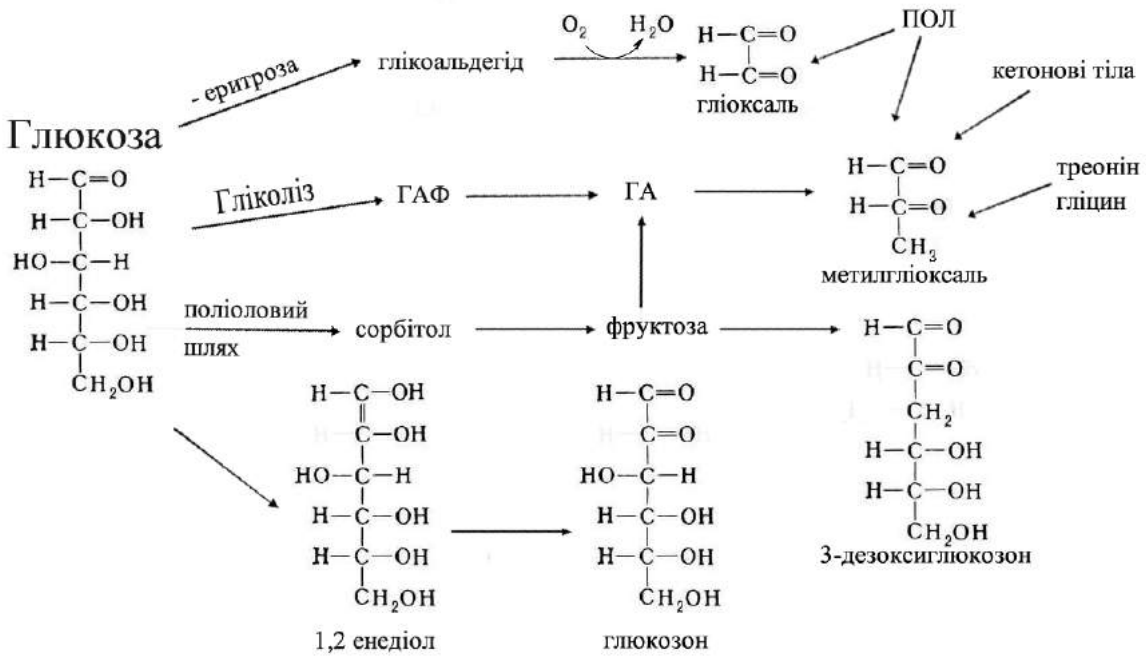

Рис 1.3 **Шляхи утворення активних карбонільних сполук**

Різноманітність субстратів і шляхів утворення АКС зумовлюють високу гетерогенність КПГ. У найбільшій кількості утворюються гідроімідазолони, які є похідними залишків аргініну, що зазнали модифікації гліоксалем, метилгліоксалем (MG-H1, MG-H2), і споріднені з ними структурні ізомери – похідні 3-дезоксиглюкозона (3DG-H). Модифікація радикалів лізину під дією АКС призводить до утворення таких аддуктів як Nδ-карбоксиметиллізин (КМЛ/CML), Nδ-карбоксиетиллізин (КЕЛ/CEL), піралін, а також гліоксаль- і метилгліоксальлізинові димери (GOLD і MOLD, відповідно). Серед відомих на

сьогоднішній день КПГ слід також відзначити пентозидин і глюкозепан. Останній вважається одним з найбільш поширених КПГ, його вміст у тканинах людини в 10-1000 разів вище, ніж будь-якого іншого типу перехресно-зшитих КПГ [142, 232].

Перераховані вище структури не вичерпують різноманіття КПГ та їхніх фізико-хімічних властивостей, тому були зроблені спроби їх класифікації. Із запропонованих варіантів класифікації цієї групи сполук найчастіше використовують ту, що заснована на фізико-хімічних властивостях, згідно з якою виділяють три типи КПГ: 1) флюоресціюючі перехресно-зшиті; 2) не флюоресціюючі перехресно-зшиті; 3) незшиті КПГ (рис. 1.4).

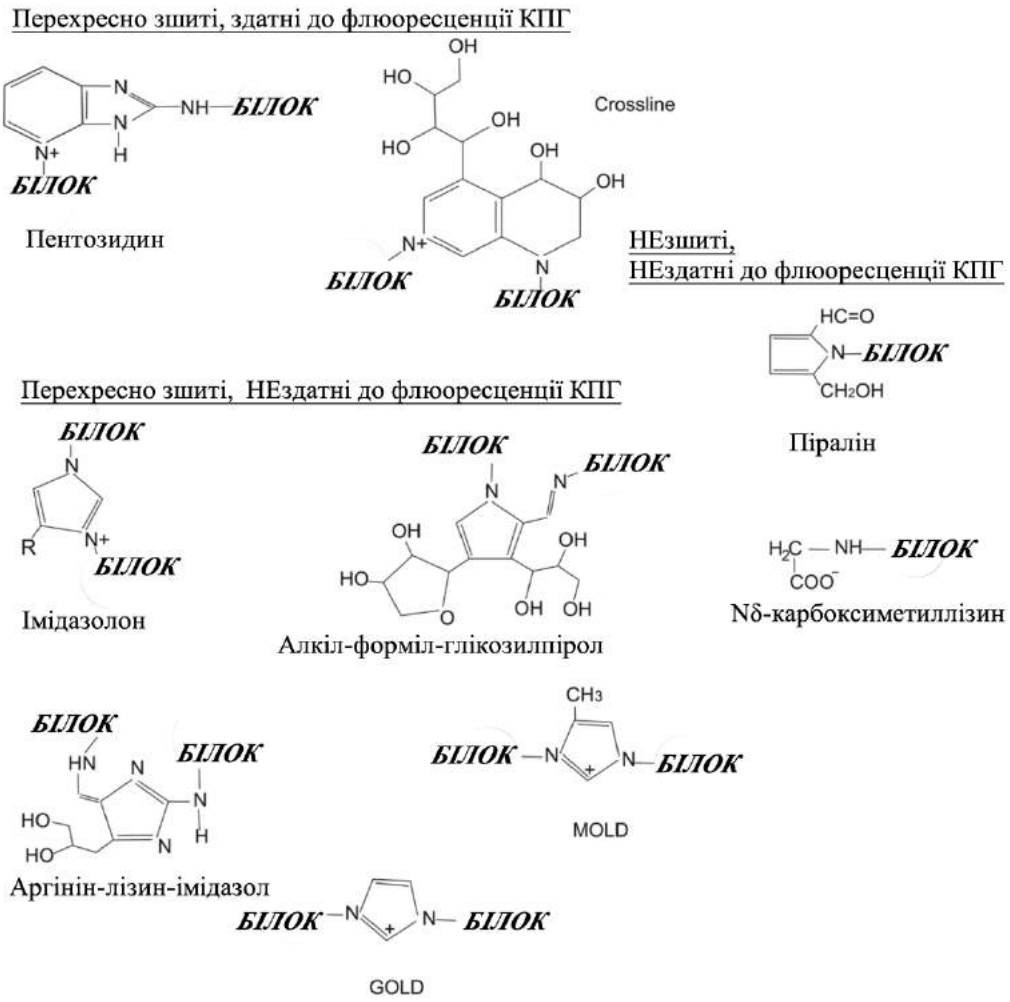

Рис. 1.4 **Найбільш розповсюджені типи КПГ**

Залежно від розмірів виділяють 2 типи КПГ: високо- (ВМ) і низькомолекулярні (НМ), що мають, відповідно, молекулярну масу вищу або нижче за 12 кДа. Останні утворюються з перших в процесі деградації білків і являють собою комплекс КПГ-модифікованих пептидів і амінокислот. Недавні дослідження показали, що ВМКПГ і НМКПГ відрізняються не тільки розмірами, а й біологічною активністю [83, 167]

1.3.2. Рецептор-незалежні ефекти глікації білків

Рецептор-незалежні кардіотоксичні ефекти КПГ зумовлені змінами структури і функціональної активності білків міокарда та судинного ендотелію, порушеннями в системі гемостазу і розвитком дисліпідемії.

Структурні-функціональні зміни тканинних білків. Неферментативна глікація клітинних білків і білків екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) призводить до порушення їхніх функцій і є пусковим механізмом гістопатологічних змін у серцевому м’язі та судинному ендотелії. Встановлено, що карбонільний стрес супроводжується дисфункцією мітохондріальних білків [144, 152], збільшенням АФК [91] і порушенням взаємодії клітин з ЕЦМ. Останнє пояснюється тим, що позаклітинне накопичення КПГ-модифікованих білків змінює структуру і функціональні властивості матриксу та матрикс-клітинних взаємодій. Так, КПГ-модифікований колаген I типу взаємодіє з різними розчинними білками плазми, в тому числі й з ліпопротеїнами низької щільності (ЛПНЩ), імуноглобулінами G, що, в свою чергу, призводить до формування проатерогенного стану, а глікація білків базальної мембрани сприяє утворенню поперечних зшивок, потовщенню базальної мембрани, зниженню еластичності судинної стінки і прискореному розвитку атеросклероза [50, 191]. Нещодавно була встановлена особлива роль у розвитку кардіоваскулярної дисфункції ВМКПГ. В експериментальних дослідженнях на щурах показано, що ін’єкції ВМКПГ викликали гіпертрофію стінки, збільшення

сферичності серця, зниження скоротливості серцевого м’яза при збереженій фракції викиду [127]. Тривала інфузія ВМКПГ стимулювала виражений фіброз серця [95, 128, 190].

Порушення функцій ендотелію при карбонільному стресі може бути викликано не тільки змінами його структурних білків, а й змінами взаємодії з білками плазми. Так, у дослідах *in vitro* було показано, що інкубація ендотеліальних клітин з альбуміном приводить до зменшення метаболічної і проліферативної активності, зниження життєздатності клітин ендотелію, посилення їхніх прокоагулянтних властивостей і активації запальних реакцій [13, 120, 181, 182].

Порушення гемостазу. Карбонільний стрес і утворення КПГ викликають також структурно-функціональні зміни факторів зсідання крові – антитромбіну III, тромбомодуліну та фактора Віллебранда. При цьому створюються умови для формування прокоагулянтного стану системи гемостазу. КПГ також впливають на стабілізацію фібринового згустку, зменшуючи продукцію антитромботичного простацикліну PGI_2 і збільшуючи активність інгібітору активатора плазміногену PAI-1 [193, 212].

Дисліпідемія. Дікарбонільний стрес і збільшення КПГ викликають зміни спектра і властивостей ліпопротеїдів крові. Показано, що модифікація ЛНГ метилгліоксалем індукує їх перетворення в дрібні, більш щільні частинки з високою афінністю до протеогліканів артеріальної стінки [177]. З іншого боку, метилгліоксаль викликає реструктуризацію апопротеїну А1, що призводить до збільшення щільності ЛПВЩ, зниження їхньої стабільності і часу напіввиведення [158, 210]. Такий різноспрямований ефект метилгліоксалю на ЛПНЩ та ЛПВЩ сприяє розвитку атеросклерозу.

Активація запальних процесів. Руйнівну дію КПГ на кардіоміоцити пов’язують також з активацією запалення і індукцією апоптозу – процесів, патогенетично пов’язаних з розвитком атеросклерозу і гострого інфаркту міокарда. Показано, що розрив атеросклеротичної бляшки (АСБ)

супроводжується вивільненням у кров медіаторів запалення і асоційований зі збільшенням в судинному руслі вмісту АКС і КПГ (частіше, метилгліоксалю та карбоксиметиллізину). Імуногістохімічні дослідження виявили накопичення КПГ переважно в макрофагах навколо некротичного кора ушкодженої АСБ та їхню колокалізацію з каспазою-3. При цьому рівень мРНК основного ензиму детоксикації КПГ гліоксалази в ушкодженій АСБ був на 13% нижче ніж у стабільній АСБ [101].

1.3.3. Рецептори та рецептор-залежні ефекти продуктів глікації

КПГ впливають на метаболізм безпосередньо або шляхом включення сигнальних внутрішньоклітинних механізмів після зв'язування з рецепторами. Специфічні рецептори КПГ (receptors for advanced glycated end-products – RAGE) відносяться до суперсімейства імуноглобулінових білків клітинної поверхні і представлені 4 формами: повноланцюгова форма (fulllength RAGE, fRAGE), вкорочена з N-кінця (N-truncated RAGE) і вкорочена з C-кінця (C-truncated RAGE), яка має 2 ізоформи – sRAGE і esRAGE (рис. 1.5).

Повноланцюгова форма RACE містить п'ять доменів: цитоплазматичний домен, який відповідає за передачу сигналу в клітину, трансмембранний домен, який відіграє якірну роль, варіабельний V домен, відповідальний за зв'язування КПГ, і два константних домені C1 і C2. Лігандами RAGE, крім КПГ, можуть бути кілька членів суперсімейства протеїну S100, β-амілоїдний білок (Aβ) і HMGB1 [160, 179].

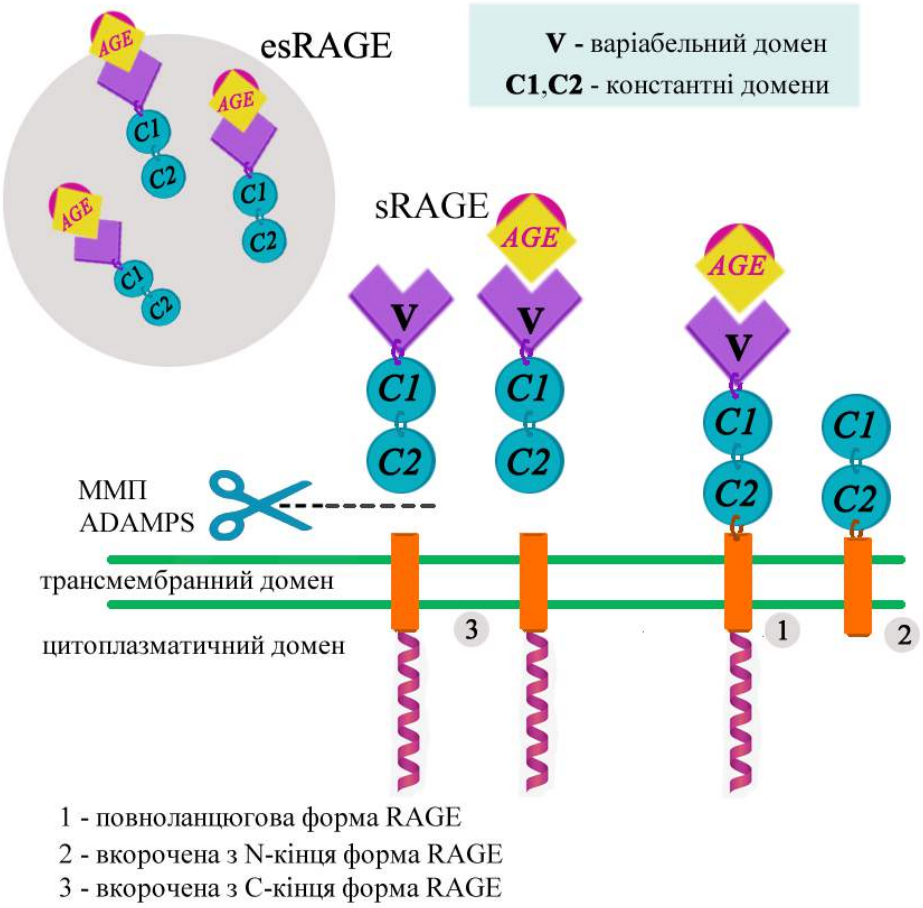

Рис.1.5 **Структурна організація рецепторів до КПГ**

У вкороченої з N-кінця форми (N-truncated RAGE), яка містить 303 амінокислоти, на відміну від повного рецептора, відсутній цитоплазматичний домен, відповідальний за внутрішньоклітинну передачу сигналу, та V-домен, тому цей рецептор не може зв’язуватись з КПГ [157]. Вкорочена з С-кінця форма складається з 347 амінокислот, містить сигнальну послідовність з 22 амінокислот і V-домен, але в ній відсутні цитозольний і трансмембранний домени, тому цей рецептор вивільняється з поверхні плазматичної мембрани клітин і циркулює в крові. Описано дві його ізоформи: загальний пул розчинних рецепторів КПГ (sRAGE) і ендогенні циркулюючі рецептори КПГ (esRAGE). sRAGE формується з повноланцюгової форми під дією дезінтегринів (серинових, цистеїнових протеїназ і матриксних металопротеїназ), які здійснюють гідроліз пептидного зв’язку між інтрацелюлярним і позаклітинним

С2 доменом рецептора [199], а esRAGE-форма синтезується на мРНК, що утворюється в результаті альтернативного сплайсингу мРНК нативного мембранного рецептора [143]. Загальний пул циркулюючих рецепторів включає обидва варіанти, причому у здорових людей рівень sRAGE майже в п’ять разів вищій за рівень esRAGE. Обидві ізоформи розчинних рецепторів можуть зв’язувати КПГ і діяти як пастки КПГ або конкурувати з мембранними рецепторами за зв’язування лігандів, забезпечуючи таким чином цитопротекторний ефект. Клінічні дослідження показали, що більш високі рівні sRAGE в плазмі пов’язані зі зменшенням ризику розвитку гіпертонії і гострого коронарного синдрому [125].

Кінцеві продукти глікації можуть також зв’язуватись з іншими рецепторами на поверхні клітин, загальна характеристика яких наведена у таблиці 1.1.

Таблиця 1.1.

Сімейства скавенджер-рецепторів КПГ

Групи рецепторів	Представники
AGER	AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galectin-3
Скавенджер-рецептори (SR)	SR – A (SR-AI/ SR-AII), SR-B B(CD36, SR-BI), SR-E E(LOX-1) H (FEEL-1; FEEL-2)

Зв’язування КПГ з рецепторами не тільки призводить до їх деградації, а й ініціює різні механізми внутрішньоклітинної сигналізації, що регулюють транскрипцію генів цитокінів, запальних ферментів, хемокінів та рецепторів до них, молекул адгезії, матриксних металопротеїназ та/або цитоскелетних компонентів, а також проліферацію, виживання, диференціювання та міграцію клітин, фагоцитоз і аутофагію. Сигнальні шляхи і функціональні наслідки взаємодії з RAGE залежать від типу клітини, ідентичності та локальної концентрації лігандів [70, 150, 152, 231].

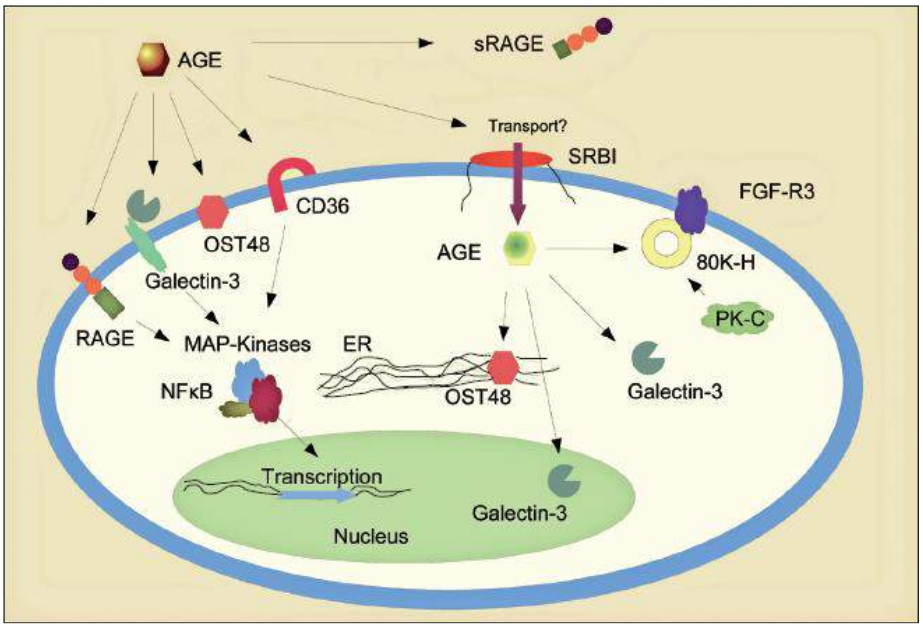

Рис. 1.6 **Рецептори КПГ, шляхи КПГ-сигналінгу та внутрішньоклітинних перетворень** (за Nass N., 2010)

Особливе місце серед КПГ-рецепторних комплексів займає AGE-R3/galectin-3. Цей комплекс складається з вуглевод-зв'язуючого С-кінцевого домену, домену, що містить повтори амінокислот про-глі-ала-тір і короткого N-термінального домену. AGE-R3/galectin-3 найчастіше локалізується в цитоплазмі, але в незначній кількості може виявлятись в ядрі, на поверхні клітин і в екстрацелюлярному просторі. Цей комплекс залучений у процеси міграції, адгезії, росту і диференціювання клітин, а також модуляції імунної відповіді [171, 217]. Показано також, що AGE-R3/galectin-3 разом з RAGE беруть участь у розвитку атеросклеротичних змін судинного ендотелію [87, 145].

Галектин 3 містить одну CRD-послідовність з розширеним N-кінцем, який грає роль в олігомеризації білка і може брати участь у взаємодії з іншими внутрішньоклітинними білками [94] Відомо, що самоасоціація, яка може проходити в межах однієї молекули або за рахунок міжмолекулярних кооперацій між різними молекулами галектину-3, залежить від його

концентрації та характеру взаємодії з лігандами [192]. Типи таких взаємодій і утворення олігомерних форм галектину показано на рис. 1.7:

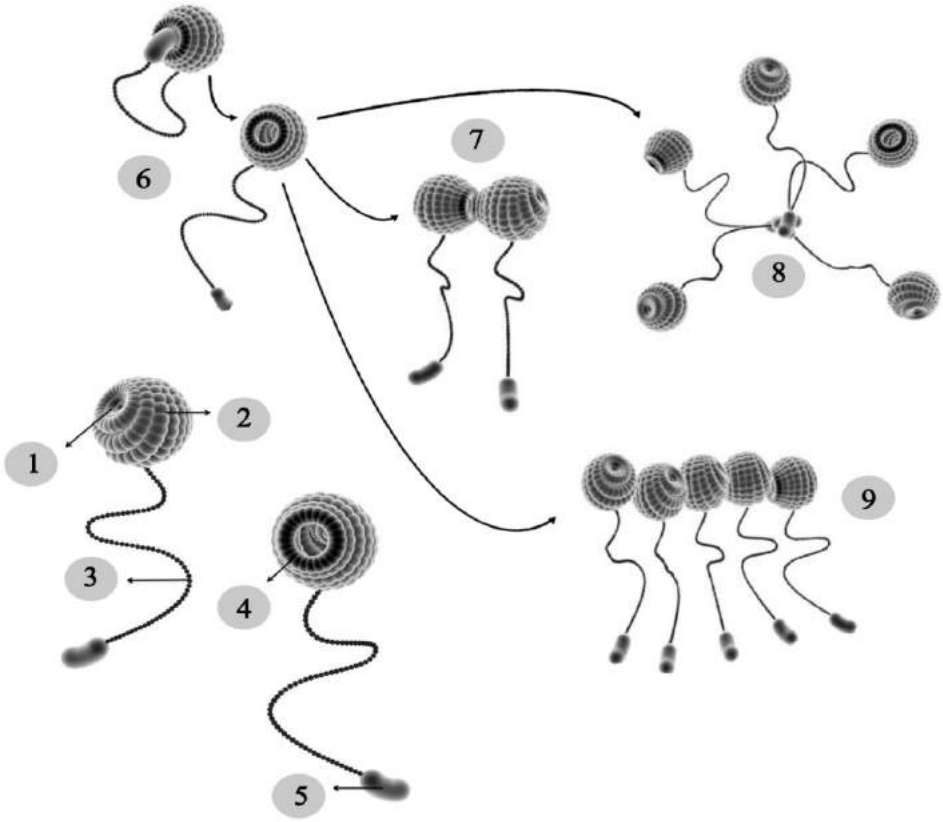

Рис. 1.7 **Доменна структура галектину-3(А) та типи взаємодій, що призводять до його олігомерізації (В)** (модифіковано з Suthahar, 2018)
1 –S-поверхня вуглеводного домену, 2 – вуглеводний домен, 3 – Н-домен , 4-F-поверхня вуглеводного домену, 5 – N-кінець Н-домену, 6 –закрита та відкрита конформація, 7 – димеризація, 8 – полімеризація N-типу, 9 – полімеризація С-типу.

Рецептор-залежні ефекти КПГ, що ведуть до серцево-судинних захворювань, обумовлені активацією процесів запалення, апоптозу, ангіогенезу, кальцифікації, генерування АФК в ендотеліоцитах, у клітинах гладких м’язів, моноцитарно-макрофагальної системи і тромбоцитах.

Було встановлено, що зв’язування КПГ, особливо CLM, з RAGE на поверхні моноцитів індукує продукцію інтерлейкіну 1, фактора некрозу пухлини, а також інсуліноподібного фактору росту, що веде до посилення

запальних реакцій і процесів хемотаксису [129]. Крім цього, КПГ-RAGE взаємодія веде до посиленого генерування активних форм кисню через НАДФ-оксидазу і індукцію ядерного фактора NF-kB. Останній активує клітини, що несуть на своїй поверхні білкові комплекси S100/calgranulin і HMGB1, які взаємодіють з Toll-like рецепторами (TLR) і запускають запальний процес [73, 165]. Запальні реакції провокують відкладення кальцію в судинному руслі і серцевій тканині, причому, характер кальцифікації залежить від типу рецептора, з яким зв'язуються КПГ. Показано, що мікрокальцифікація сприяє формуванню атеросклеротичної бляшки, в той час як макрокальцифікація стабілізує бляшку, виступаючи в якості завади запаленню [124, 218]. На жаль, поки що мало відомо про молекулярні механізми, що регулюють адаптивний перехід від мікро- до макрокальцифікації і стабілізацію атеросклеротичної бляшки, хоча розуміння цих процесів може бути основою для розробки нових підходів до лікування ішемічної хвороби серця.

Таким чином, окисна модифікація протеїнів може призводити до порушення багатьох процесів у тканинах та клітинах міокарду і запускати низку відповідних реакцій, що посилюють та ускладнюють ішемічний стан.

1.4. Шляхи запобігання окисної модифікації білків

Активні форми кисню та активні карбонільні сполуки постійно утворюються у клітинах навіть за фізіологічних умов, але в організмі функціонують системи, які підтримують рівень вищезазначених продуктів на низькому рівні. В організмі ссавців існує декілька основних механізмів, спрямованих на знешкодження АФК або АКС, та зниження рівня окисної модифікації білків, які розглянуто нижче.

1.4.1. Роль антиоксидантної системи у знешкодженні продуктів АФК, альдегід- та кетонфенілгідразонів

Окисна модифікація білкових молекул є нормальним фізіологічним процесом регулювання білкового обміну, але в результаті посилення процесів вільнорадикального окиснення, викликаного ішемією-реперфузією міокарда, відбувається зростання рівня АФК, що може сприяти підвищенню рівня окисної модифікації біомолекул, в першу чергу, ліпідів та протеїнів. Цей процес небезпечний не тільки через порушення структурно-функціональних властивостей фосфоліпідів мембран внаслідок активації ПОЛ, а й через накопичення окисно-модифікованих білків та продуктів протеолізу.

В організмі ссавців існує багатокомпонентна система антиоксидантного захисту (АОЗ), яка охоплює сукупність ферментів, що знешкоджують АФК та знижують негативні наслідки їхньої дії, а також низку неферментативних речовин, які, крім специфічних для них, виконують ще й антиоксидантну та репаративну функції. За нормальних умов ця система підтримує баланс АФК на певному рівні, а порушення в ній призводять до підвищення рівня АФК та ОМБ, тому стисло розглянемо основні учасники АОЗ.

Першою лінією АОЗ вважають ферменти, які або перешкоджають утворенню АФК, або зменшують їхній рівень. Серед цих ензимів варті уваги такі як супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатіонпероксидаза (ГП). Супероксиддисмутаза (СОД), що представлена трьома ізоформами (Fe-, Zn- Cu- та Mn-залежні), відіграє роль акцептора супероксидного радикалу. Під дією СОД утворюється H_2O_2, який розщеплюється каталазою до води та кисню. Особливу роль серед ензимів АОЗ відіграє глутатіонова ланка, складовими якої є глутатіон і ензими, що каталізують реакції зворотного я окиснення/відновлення. До таких ензимів відносять глутатіонпероксидазу (ГП), глутатіонредуктазу (ГР), глутатіонтрансферази (ГSTT) [3, 6, 168]. ГП відповідальна за руйнування та інактивацію пероксиду водню і гідропероксидів

ліпідів. Активність ГП зазвичай є у 3-4 рази нижчою за активність каталази, за винятком еритроцитів, де її кількість превалює над каталазою [121]. ГР каталізує оборотне НАДФН-залежне відновлення GSSG з утворенням двох молекул GSH, тому глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, що продукує НАДФН, також можна вважати учасником цієї системи [28]. Відомо, що відновлений глутатіон здійснює детоксикацію H_2O_2 і гідропероксидів, які виникають в результаті взаємодії АФК з поліненасиченими жирними кислотами мембран [68, 174]. ГSTT здійснюють детоксикацію токсичних сполук у гепатоцитах шляхом перенесення на них атомів сірки.

Окремою групою виступають ензими, що здатні відновлювати сульфоксиди – метіонінсульфоксидредуктази (оксидази) (MsrA та MsrB), тіоредоксинредуктази [208] – здатні до зворотного окиснення метіонінових залишків [107], а також знешкодження пероксидів за ішемії-реперфузії [130]. До складових АОЗ можна віднести також деякі ензими (протеази, фосфоліпази, ДНК-репаруючі та ін.), що здатні пригнічувати реактогенність АФК та АКС, знижувати наслідки ОМБ [58, 197].

Таким чином, у відповідь на підвищення в клітині концентрації O_2^-, H_2O_2 та інших АФК запускається система детоксикації, яка знаходиться під контролем редокс-чутливих генів, і збільшується рівень внутрішньоклітинних ферментативних антиоксидантів [79]. Роль яких зводиться до детоксикації первинних форм кисню і активації першої лінії захисту, наслідком чого є зниження рівня ОМБ.

1.4.2. Детоксикація активних карбонільних сполук

За фізіологічних умов АКС, які продукують ендогенні КПГ, метаболізуються під дією відповідних ферментів (рис.1.9): гліоксаль і метилгліоксаль окиснюються за участю глутатіону і ферментів гліоксалаз I і II. Перший метаболізується до гліколевої кислоти, другий – до лактату [178].

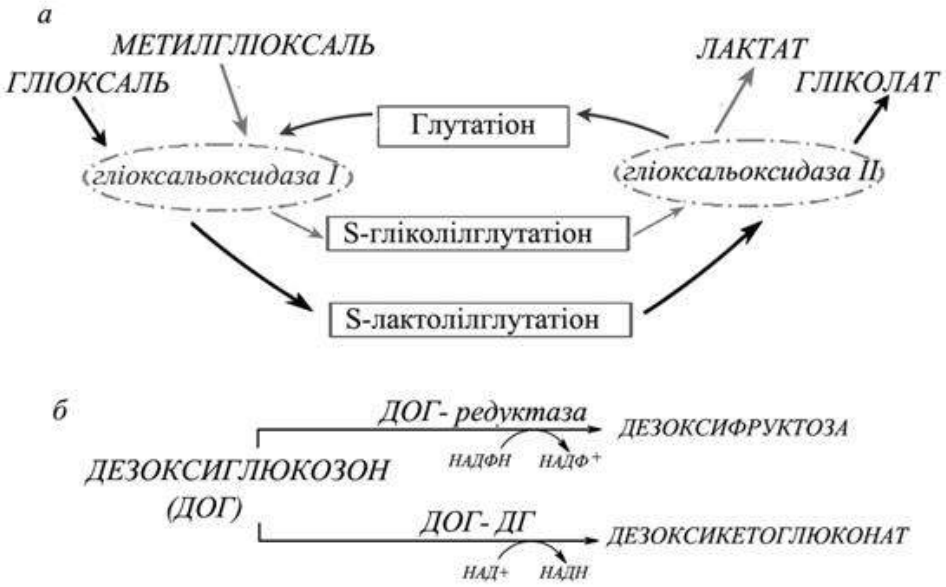

Рис. 1.9 **Шляхи знешкодження активних карбонільних сполук** (модифіковано з Rabbani N., 2016)

Дезоксиглюкозон відновлюється під дією дезоксиглюкозонредуктази або окиснюється під дією специфічної дегідрогенази [189]. Порушення активності цих ферментів може бути однією з причин збільшення вмісту КПГ і розвитку патологічних станів.

Високореактивні альдегіди, кетони, алкани, що утворюються за дії АФК на подвійні зв'язки ненасичених жирних кислот, можуть знешкоджуватись за впливу альдегіддегідрогеназ (АЛДГ). У клітинах людини визначено 6 ізоформ цього ензиму, найбільш вивченим серед яких є АЛДГ2 мітохондрій. Вона представлена тетрамерним не-Р450-детоксикуючим ферментом, що є ефективним у метаболізмі коротколанцюгових аліфатичних альдегідів (ацетальдегід и пропіональдегід). АЛДГ2 також бере участь в окисненні інших альдегідів, похідних ПОЛ, а саме 4-гідроксиноненалю та МДА [122, 140]. Захисна роль АЛДГ2 була продемонстрована Chen C., et al. у модельних експериментах, які показали, що активація цього ферменту за впливу

алостеричного активатора Alda-1 знижує ушкодження міокарда після ішемії-реперфузії [75].

Активність гліоксилаз, альдегіддегідрогеназ і альдегідредуктаз регулюється фактором транскрипції Nrf2, який контролює експресію великої групи генів. У свою чергу, активність Nrf2 залежить від ксенобіотиків і ендогенних електрофільних сполук та пригнічується специфічним репресорним білком Keap1, який є рецептором електрофільних сполук і адапторним білком убіквітинлігази Cu13. Електрофільні сполуки пригнічують репресорну активність Keapl шляхом модифікації його тіольних груп. Сигнальна система Keap1-Nrf2 також пригнічує залежну від цитокінів індукцію прозапальних генів шляхом зниження активності фактора транскрипції NF-кB [37].

1.4.3. Роль процесів протеолізу у знешкодженні продуктів окисної модифікації білків

В даний час протеоліз визнається одним з можливих механізмів захисту від накопичення окисно-модифікованих білків. Вважають, що протеоліз забезпечує останню лінію антиоксидантного захисту, видаляючи незворотно пошкоджені білки та забезпечуючи розщеплення їх до амінокислот [109].

Основною протеолітичною системою, відповідальною за видалення окиснених цитозольних і ядерних білків, є убіквітин-протеасомна. Ця складна протеолітична система містить основну протеасомну форму (20S протеасома) та кілька регуляторів. Всі ці компоненти впливають на окисний стрес різного ступеня. АТФ-стимульована 26S протеасома чутлива до окисного стресу, тоді як форма 20S є більш стійкою [176, 219]. Карбонілювання та глікація відбувається у всіх тканинах і біологічних рідинах організму людини: навіть в нормальних фізіологічних умовах від 1 до 5% білків містять КПГ-модифіковані ділянки. Такі білки розпізнаються убіквітин-протеасомною системою і підлягають протеолізу з утворенням глікованих пептидів і модифікованих

амінокислот, які далі можуть надходити в кров і видалятись у складі сечі [202, 211].

У еукаріотичних клітинах одним з компартментів з утилізації білків слугує лізосома, до якої надходять ушкоджені білки і піддаються деградації. Протеоліз у лізосомах є неспецифічним: там перетворюються мембрано-асоційовані білки, а також білки, захоплені під час ендоцитозу. Вважають, що окиснені білки стійкі до дії гідролаз і формують міцний побічний продукт. Накопичення окиснених продуктів ліпідної і білкової природи може негативно позначитись на цілісності лізосомальних мембран. Наявність продуктів окисного стресу всередині лізосом змінює їхню нормальну функцію і перетворює в нове джерело вільних радикалів, в результаті чого відбувається дестабілізація мембран лізосом, вихід гідролаз у цитозоль і, як наслідок, клітинне ушкодження [33].

Значне місце у деградації КПГ відіграють металопротеїнази, впливаючи на співвідношення НМКПГ/ВМКПГ [81]. Відомо, що у першу добу Q-IM активність ММП9 зростає на тлі низького рівня інгібітору TIMP-1 і колагенів I та III типів [102]. Отже при інгібуванні ММП підвищується кількість високомолекулярних форм КПГ. На жаль специфічний механізм внутрішньоклітинного протеолізу ендогенних КПГ ще недосліджений, але він є необхідним кроком у секреції НМКПГ.

Узагальнену схему шляхів знешкодження продуктів окисної модифікації білків представлено на рис. 1.8.

Таким чином, карбонільно-оксидативний стрес виникає не тільки в умовах генерування активних форм кисню та азоту, зниження діяльності антиоксидантних систем, а й за недостатньої діяльності протеасом і протеїназ. Кінцевими продуктами гідролізу білків є пептиди та амінокислоти, з яких здатні синтезуватись нові необхідні клітині білки.

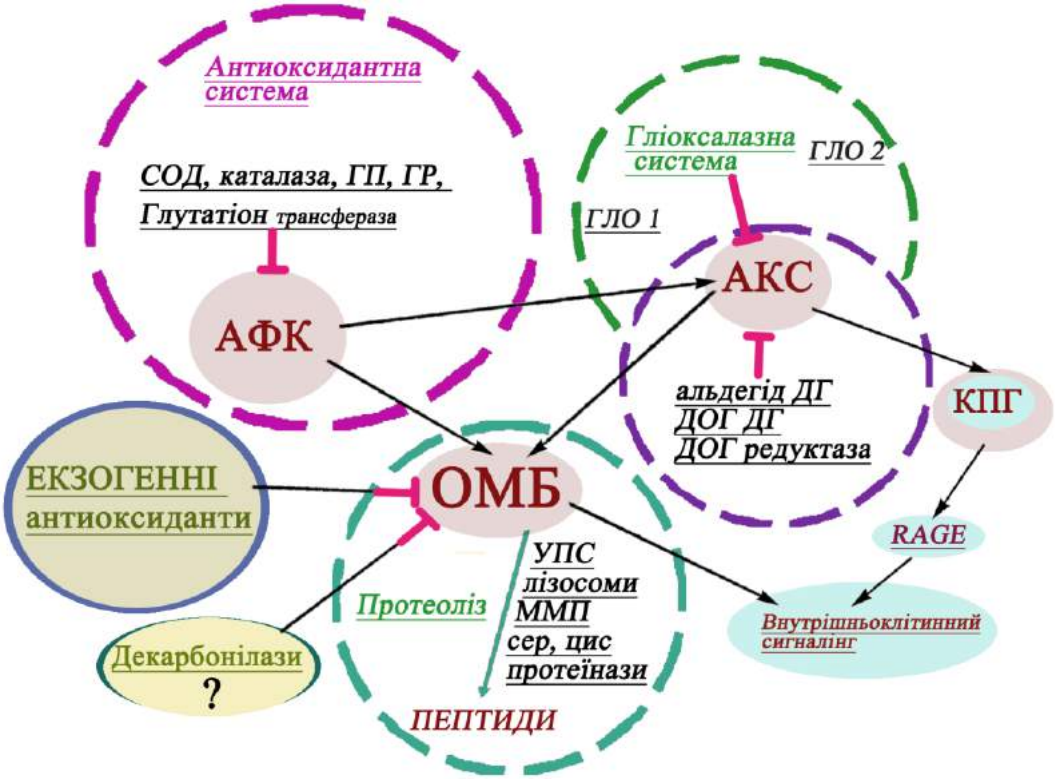

Рис 1.8 **Шляхи запобігання ОМБ та знешкодження модифікованих білків** Стрілки – шляхи утворення, перпендикуляри – шляхи знешкодження. УПС – убіквітин-протеасомна система, ММП – матриксні металопротеїнази, ГЛО – гліоксалази.

З цієї точки зору процес утворення карбонільних похідних є одним із засобів контролю якості структури білків за умови балансу між деградацією і синтезом білкових молекул.

1.4.4. Препарати, що запобігають окисній модифікації білків

Серед безлічі запропонованих препаратів і біологічно активних речовин, що запобігають розвитку карбонільно-окисного стресу та зменшують негативні наслідки ОМБ, акцентуємо увагу на тих з них, які використовуються в кардіології або можуть проявляти кардіопротекторні властивості.

Антиоксиданти. Завдяки своїм антиоксидантним властивостям біофлавоноїди широко використовуються в кардіології і досі займають пріоритетні місця серед препаратів, що доповнюють базову терапію. Лідируючі позиції серед цих препаратів займає кверцетин та його похідні. Виявилось, що крім антиоксидантної активності, він може ефективно пригнічувати утворення КПГ дозозалежним шляхом через зв'язування реакційноздатних дикарбонільних сполук [131]. До того ж ці аддукти зберігають антиоксидантну активність і здатність нейтралізувати АКС [134, 155]. Оскільки флавоноїди, як правило, погано розчинні у воді, не припиняються спроби збільшити їхню біодоступність. Нещодавно був запропонований корвітин, що є розчинною формою кверцетину. Встановлено, що він інгібує 5-ліпооксигеназу і продукцію лейкотрієнів, знижує рівень супероксид-аніона, нормалізує продукування прозапальних цитокінів, проявляє нейропротекторні властивості [35, 170], але вплив корвітину на показники карбонільного стресу за умов ішемії міокарда вивчені недостатньо. В той же час є дані, що деякі біофлавоноїди здатні зв’язувати АКС і проявляти тим самим протизапальний ефект [108].

Класичним потужним антиглікаційним препаратом вважається аміногуанідин (АГ) або піоглютазон, який захоплює дикарбонільні похідні і пригнічує NO-сінтазу, інгібує продукти Амадорі [184]. Встановлено, що АГ може бути ефективним у попередженні або уповільненні фіброзування судин і розвитку діастолічної дисфункції міокарда у літніх людей і тварин з діабетом, оскільки може руйнувати перехресні зшивки в молекулах колагену [191]. У пацієнтів з діабетом 1-го типу, ускладненим нефропатією і ретинопатію, за тривалого застосування препарату знижується протеїнурія, відновлюється швидкість клубочкової фільтрації, хоча у деяких пацієнтів, спостерігається прогресування ретинопатії. В цілому, гальмування утворення КПГ може призвести до клінічно значимого послаблення ускладнень діабету [59]. В той же час аміногуанідин може викликати побічні ефекти, що пов’язані зі здатністю інгібувати діаміноксидазу.

Антиоксидантними властивостями володіє також 2-оксоглутарат (2-ОГ, альфа-кетоглутарат) – центральний метаболіт циклу Кребса. Ця речовина бере участь у різних метаболічних процесах, серед яких утворення АТФ, синтез амінокислот, зниження співвідношення НАД$^+$/НАДН, що може впливати на рівень АФК. Останнім часом обговорюється здатність 2-ОГ проявляти антиоксидантні властивості за рахунок активації сигнальних шляхів CAR (constitutive-androstane-receptor), що регулюють експресію мРНК ключових антиоксидантних генів [151, 156, 229]. У модельних експериментах. Було показано,що за введення 2-ОГ підвищувалась кількість білків SOD1, SOD2, CAR, RXRα и UCP2 на тлі пригнічення рівнів експресії Nrf2 і Keap1 [106]. Багато досліджень вказують на те, що 2-ОГ може проявляти плейотропні ефекти, проте його роль у запобіганні ОМБ при ішемії міокарда залишається покі що нез’ясованою.

В останні роки з’явились публікації, в яких описуються антиоксидантні та антиглікаційні ефекти деяких кардіопротекторних препаратів таблиця 1.2.

Таблиця 1.2

Кардіотерапевтичні препарати, що запобігають глікації

Препарати	Механізм дії	Літературні посилання
Бенфотіамін	захоплює дикарбонільні похідні; знижує продукування КПГ, альбумінурію, ендотеліальну дисфункцію	[115]
Піридоксамін (вітамін В6)	захоплює дикарбонільні похідні, знижує продукування КПГ діабетичного походження (доклінічні результати)	[84]
Аладжебріум	Впливає на карбон-карбонові зв’язки, прямо руйнуючи КПГ (побічна дія при високих дозах)	[105]
Статини	знижують утворення АФК та КПГ, впливають на рівень розчинних RAGE; володіють протизапальними, антитромботичними, антиоксидантними	[172]

	властивостями; інгібують проліферацію клітин гладеньких м'язів, пригнічують ММП, циклооксигеназу 2, зменшують запальні реакції, експресію і активність ендотеліальної NO-синтази	

Аналіз літературних даних стосовно кардіопротекторної дії антибіотика тетрациклінового ряду доксицикліну показав, що цей препарат знижує постінфарктне ремоделювання лівого шлуночка [65]. Показано, що цей препарат проявляє захисний ефект у тваринних моделях серцевої недостатності [69], проте його точний молекулярний механізм досі невідомий. Зазвичай обговорюється його здатність інгібувати ММП, що відповідають за процеси ремоделювання серцевого м’яза, та відзначається різноспрямованість його дії в залежності від дози та тривалості застосування [88, 226]. Данні стосовно впливу доксицикліну на показники карбонільно-оксидативного стресу у клітинах постішемізованого міокарда поодинокі та дуже суперечливі.

В кардіології широко використовуються антагоністи альдостерону, серед яких особливу увагу привертає калій-зберігаючий діуретик еплеренон (фармакологічна форма – інспра), що застосовується як доповнення до стандартної терапії для зменшення ризику кардіоваскулярної захворюваності та летальності у стабільних пацієнтів з дисфункцією лівого шлуночка і клінічними проявами серцевої недостатності після перенесеного ІМ. Блокатори рецепторів альдостерону впливають на зниження протеолітичної активності ММП9 та зростання активності TIMP-1, зменшуючи постінфарктне ремоделювання, інтенсивність деградації сполучнотканинного матриксу міокарда [22]. Встановлено, що еплеренон зменшує ризик розвитку кардіоваскулярних ускладнень за рахунок зниження синтезу колагену, покращення функції ендотелію судин та постінфарктного ремоделювання лівого шлуночка [32, 62]. Як саме еплеренон впливає на запобігання наслідків ОМБ при серцевій дисфункції досі нез’ясовано.

Отже, механізми впливу зазначених препаратів істотно різняться, але для жодного з них не визначені механізми запобігання утворенню ОМБ/КПГ модифікованих протеїнів та їх детоксикації за ішемії міокарда, продукти яких в значній мірі відповідають за порушення метаболічних процесів за даного патологічного стану та виникнення ускладнень.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Всі процедури з експериментальними тваринами виконували згідно етичних норм, встановлених Законом України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» з 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. Виводили щурів з експерименту шляхом евтаназії, використовуючи тіопентал натрію в дозі 60 мкг/кг.

2.1. Реагенти та матеріали досліджень

Для дослідження використовували плазму, гемолізат еритроцитів та екстракти серцевого м’яза щурів.

Всі реагенти, що використовувались в цьому дослідженні, були чисті та хімічно чисті: Адреналін (ЗАО «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна); акриламід: бісакриламід (Bio-Rad Lab, США); N-бензоїл-D,L-аргінін-4-паранітроанілід гідрохлорид (Sigma, США); аміногуанідін (Sigma-AldrichInc, StLouis, MO, США); антитіла до галектину 3, антитіла до IgG кроля, кон’юговані з пероксидазою хрону або зв’язані з ФІТЦ (Abcam, США), 2-оксоглутарат (SGPlus, Malmo, Швеція); бичачий сироватковий альбумін (Sigma-Aldrich, St. Louis, США); відновлений глутатіон (AppliChem GmbH, Німеччина); доксициклін (РУП «Бєлмедпрепарати», Республіка Білорусь); пітуїтрин (Endokrininiai, Литва); ізадрин (ізопреналін гідрохлорид, Sigma, США); желатина (Sigma, США); забарвлені маркери для електрофорезу (Bio-Rad Lab, США); корвітин (Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна); інспра (еплеренон, Fareva Amboise, Франція); хініну гідрохлорид

(Buchler GmbH, Німеччина); 5,5 дітіобіс-2-нітробензойна кислота, тетраметилендіамін, тіобарбітурова кислота («Харківреахім», Україна); β-нікотинамід аденіндинуклеотид 2'-фосфат тетранатрієва сіль (Oriental yeast co., LTD, Японія); Кумасі G250 (SERVA, Німеччина), тіопентал натрію (ARTERIUM, Україна); тест-системи для визначення рівня глюкози, гемоглобіну, аспартатамінотрансферази («Філісіт-Діагностика», Україна) та альбуміну (Elitech, Франція); трипсин (Sigma, США). Всі інші хімікати та розчинники були на аналітичному рівні.

2.2. Моделі ішемічного ушкодження міокарда

В роботі було використано дві експериментальних моделі ішемічного ушкодження міокарду – адреналінова та пітуїтрин-ізадринова.

Дослідження проводили на щурах лінії Вістар, в залежності від типу моделі та задач дослідження експериментальні тварини було розподілено на відповідні групи. Контрольна група тварин отримувала підшкірні ін’єкції 0,9% хлориду натрію впродовж періоду моделювання ішемії.

Модель 1 – Адреналінова ішемія міокарда (АІМ) була індукована у щурів за схемою Л.Д. Хідірової [39], згідно якої тваринам вводили адреналін підшкірно впродовж 10 днів в дозі 1,8 мг/мл (0,2 мг/100 г маси). Експериментальні тварини були розподілені по 4 групах (n = 10). Перша група – контрольна, щурам вводили фізіологічний розчин, 2 група – АІМ; 3 група після моделювання АІМ отримувала корвітин (К) впродовж 5 днів підшкірно за схемою, що запропонована виробником та перерахована згідно міжнародних стандартів для експериментальних тварин. Згідно цієї схеми щури отримували в перший день 5,2 мг/100 г; 2-ий та 3-ій дні – по 3,5 мг/100 г; 4-ий та 5-ий дні – по 1,8 мг/100г ваги тварини. У 4-й групі щурів застосовували доксициклін (Д) після моделювання АІМ, який вводили перорально в дозі 4,2 мг/кг.

Модель 2 – Пітуїтрин-ізадрин-індуковане ушкодження міокарда (ПІУМ): моделювали комбінованим введенням пітуїтрину (0,5 ОД/кг) та ізадрину (100 мг/кг) підшкірно впродовж двох днів за схемою Бєленічева та ін. [2]. Згідно з цією схемою у перший день щури отримували 0,2 мл розчину пітуїтрину, через 20 хв – 0,4 мл розчину ізадрину, через 6 год повторювали ін'єкцію ізадрину. Через 24 год, знову вводили розчин пітуїтрину, після чого через 20 хв розчин ізадрину. Експериментальні тварини були розділені на групи по 10 тварин у кожній групі: 1 група – контрольна, щурам вводили фізіологічний розчин, 2 група – ПІУМ, в групі 3 (ПІУМ+К) після індукування ПІУМ вводили інтраперитонеально корвітин (водорозчинна форма кверцетину) впродовж 5 днів (доза 42 мг/кг) за схемою, що рекомендована виробником і описана вище. В інших експериментальних групах препарати вводили інтрагастрально за допомогою зонду: щурам 4-ої групи 5 днів вводили інспру в дозі 5 мг/кг; щури 5-ої групі отримували 1 % розчин 2-оксоглутарату (ПІУМ+2-ОГ) у питній воді *ad libitum* протягом 6 днів. Кожна тварина споживала в середньому 5-6 мл 2-ОГ-розчину на добу. У 6-й групі тварини з ПІУМ застосовували аміногуанідин (ПІУМ+АГ) 6 днів у дозі 200 мг/кг. У 7-й та 8-й групах експериментальним тваринам вводили доксициклін впродовж 6-ти днів у дозах 4,2 мг/кг (ПІУМ+Д1) та 16.8 мг/кг (ПІУМ+Д2), відповідно.

2.3. Біохімічні методи дослідження

2.3.1. Отримання клітинних фракцій серцевого м'яза [19]

Для дослідження використовували ізольовані неушкоджені серця щурів, ретельно відмиті від крові у холодному розчині 0,9 % KCl. Тканини серця подрібнювали та гомогенізували при 4 °C, додаючи буфери. У складі Буфера А – 0,05 М трис-HCl буфер, pH=7,2; у складі буфера Б – Буфер А з інгібіторами (феніл-метил сульфоніл фторид, соєвий інгібітор трипсину, тритон та NaCl).

Субклітинні фракції серцевого м’язу (СФСМ) отримували за схемою, що наведена на рис. 2.1.

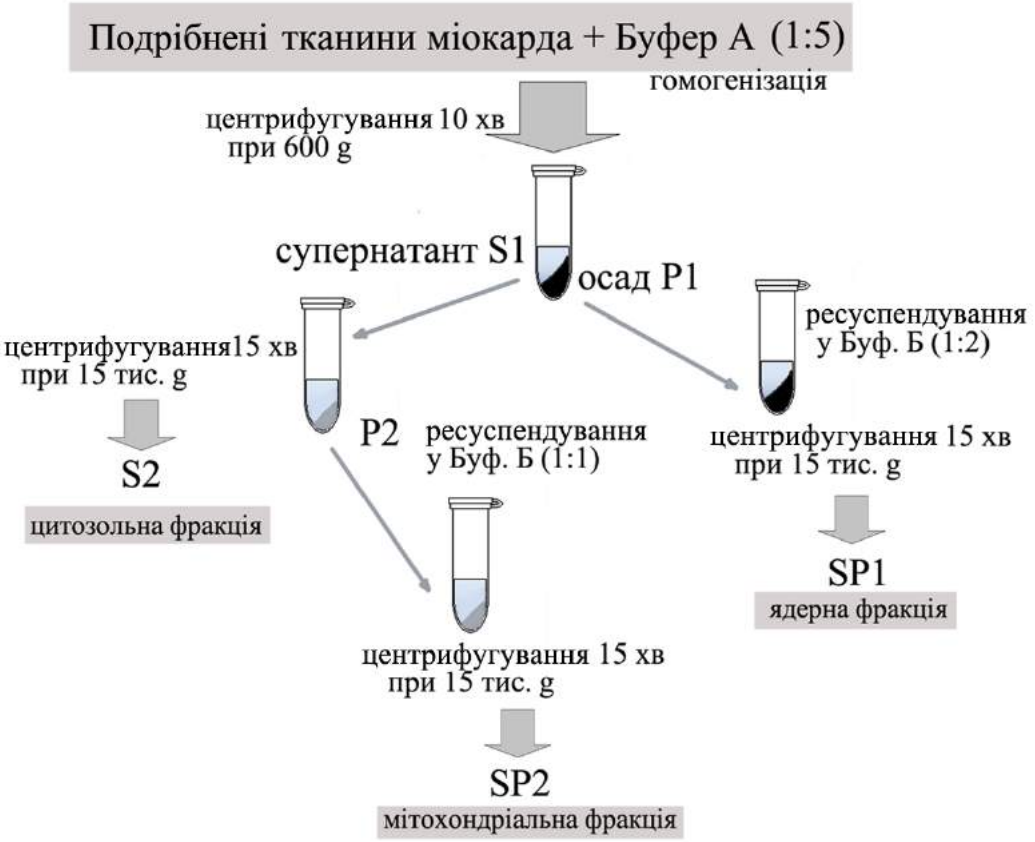

Рис. 2.1 **Схема отримання субклітинних фракції серцевого м’язу**

2.3.2. Визначення концентрації загального білка, гемоглобіну та глюкози у плазмі експериментальних тварин

Визначення вмісту загального білка в плазмі або екстрактах проводили за мікрометодом Бредфорд [60], що заснований на реакції взаємодії між барвником Кумассі (Coomassi Brilliant Blue G-250) та аргініном і гідрофобними залишками амінокислот. Оцінку ступеня забарвлення проводили на фотометрі HUMAREADER (Німеччина) при довжині хвилі 630 нм. В якості еталону використовували стандарт білка з концентрацією 50 мг/мл. До 0,02 мл плазми, розведеної 1:100, додавали 0,2 мл реактиву Бредфорд, інкубували 10 хв за

кімнатної температури, після чого вимірювали оптичну густину при 630 нм. Концентрацію білка виражали у г/л або мг/мл.

Визначення концентрації альбуміну у плазмі проводили за допомогою тест-набору Elitech (Франція). Метод заснований на утворенні забарвлених комплексних сполук при взаємодії альбуміну з бромкрезоловим зеленим у присутності детергенту. Інтенсивність забарвлення проби при довжині хвилі 630 нм прямо пропорційна концентрації альбуміну. Розрахунок концентрації альбуміну проводили за формулою:

$$C\ [г/л] = (E_{досл} / E_{кал})\cdot 50,$$

де $E_{досл}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{кал}$ – оптична густина стандартного розчину;

50– концентрація альбуміну у стандартному розчині, г/л.

Визначення концентрації глюкози в плазмі проводили глюкозооксидазним методом за допомогою комерційного набору «Філісіт-Діагностика» (Україна). Розрахунок концентрації глюкози проводили за формулою:

$$C\ [ммоль/л] = (10\cdot K\cdot E_{досл})/E_{кал},$$

де C – концентрація глюкози у дослідній пробі, ммоль/л;

10 – концентрація глюкози у калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{досл}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{кал}$ – оптична густина калібрувальної проби;

K – коефіцієнт розведення.

Визначення рівня гемоглобіну у крові експериментальних тварин проводили з використанням комерційного набору «Філісіт-Діагностика». За цією методикою гемоглобін в присутності окислювача та ціанід-аніонів утворює у водному розчині ціанметгемоглобін, забарвлення якого пропорційне

концентрації гемоглобіну крові. Оптичну густину вимірювали при 540 нм на фотоелектроколориметрі. Розрахунок результатів проводили за формулою:

$$C\ [г/л] = (E_{досл}/E_{калібр}) \cdot 150\ г/л,$$

де C – концентрація гемоглобіну в крові, г/л;

150 – концентрація гемоглобіну в калібрувальному розчині, г/л;

$E_{досл}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{кал}$ – оптична густина калібрувальної проби.

2.3.3. Отримання гемолізату еритроцитів

Еритроцити осаджували шляхом центрифугування крові з антикоагулянтом протягом 15 хвилин при 200 g, промивали фізіологічним розчином 3 рази впродовж 10 хвилин із повторенням центрифугування. Промиті еритроцити переносили у одноразові пробірки типу Еппендорф (об'єм 0,1 мл) і заморожували.

2.3.4. Отримання глікованого альбуміну [135]

Глікований альбумін готували відповідно до методу, описаного Ledesma-Osuna et al. Стисло: у пробірку з 0,6 мл розчином глюкози (40 мг/мл) додавали 0,6 мл БСА (20 мг/мл) і 0,6 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 8,0 та заморожували при -15 °C, витримуючи цю температуру протягом 24 годин, потім розморожували інкубували 4 години при +60 °C. Після цього 1,2 мл H_2O додавали до цієї суміші та 3 рази діалізували протягом 6 годин проти дистильованої H_2O для видалення від вільної глюкози. Рівень глікації контролювали за допомогою вимірювання флуоресценції на флюориметрі Hoefer DQ 2000 з використанням хвилі збудження 365 нм і випромінювання 460 нм. Концентрацію альбуміну доводили до 1 мг/мл, розливали по аліквотах та

зберігали при -80ºС. Флюоресценція глікованого альбуміну в нашому експерименті дорівнювала 500 умовних одиниць (УО).

2.3.5. Методи оцінки окисної модифікації білків [1, 15, 103]

Визначення альдегідфенілгідразонів (АФГ) (ранній маркер деструкції білкових молекул) та кетонфенілгідразонів (КФГ) (пізній маркер окисної деструкції білка) оцінювали за методом Дубініної та ін.

Метод заснований на реакції взаємодії окиснених залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням альдегідних та кетонових груп. В ході дослідження до 0,1 мл плазми/гомогенату додавали 0,1 фізіологічного розчину (холоста проба – 0,2 мл), потім - по 0,4 мл 2,2 % розчину 2,4-ДНФГ та інкубували за +37°С впродовж 1 год. Після інкубації додавали 0,05 мл 20 % трихлороцтової кислоти та ставили у холодильник на 10 хв. Наступний етап – центрифугування 15 хв при 3000 об/хв при +15°С. Отриманий супернатант видаляли. Осад відмивали сумішшю етанол:етилацетат 1:1, центрифугували 15 хв при 3000 об/хв, отриманий супернатант видаляли.

До осаду додавали 1,5 мл 8 М сечовини та інкубували на водяній бані 3 хв 100 °С 3 хв. Охолоджували проби та визначали рівень АФГ та КФГ за оцінкою оптичної густини при довжині хвилі 370 нм та 430 нм відповідно. Розчином порівняння слугував 0,5 М фосфатний буфер.Розрахунок результатів проводили за формулою:

$$C\ [\text{мкмоль/мл}] = 0{,}909 \cdot E,$$

де E – оптична густина дослідної проби;

0,909 – коефіцієнт перерахунку на розведення.

Після визначення вмісту ОМБ у гомогенатах розраховували їхню кількість на мг білка [(мкмоль/мл)/мг білка].

Визначення рівня флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації (фКПГ) здійснювали за допомогою методу флюоресцентної спектроскопії [148] у власній модифікації [45]. Флюориметр Hoefer DQ 2000 калібрували, використовуючи фізіологічний розчин у якості негативного контролю та розчин хініну гідрохлориду (60 мг/л) у якості стандартного розчину з флюоресценцією 1000 УО (F1000). Вимірювали флюоресценцію зразка, розведеного 1:10 фізіологічним розчином, та глікованого альбуміну. Всі вимірювання виконувались за довжин хвиль збудження:емісія 365 нм/460 нм. Вміст флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації визначали за наступною формулою:

$$\text{фКПГ [мг/мл]} = (C \cdot F_{досл})/(F_{г.а.} \cdot K),$$

де C – концентрація глікованого альбуміну (мг/мл);

$F_{досл}$ – флюоресценція зразка плазми (УО);

$F_{г.а.}$ – флюоресценція глікованого альбуміну (УО);

K – коефіцієнт розведення плазми/фракції серцевого м’яза.

Визначення рівня ТБК-активних продуктів проводили за методом Ohkawa [30, 161]. Стисло: до 0,2 мл плазми (дослід) або 0,2 мл розчину H_2O (контроль) додавали 2 мл 1 % фосфатної кислоти та 0,6 мл 1% тіобарбітурової кислоти, пробірки з сумішшю інкубували на водяній бані при 100 °С впродовж 50-45 хв, потім охолоджували під проточною водою. Оптичну густину кожного зразка вимірювали при 540 та 590 нм проти контролю. Вміст ТБКАП визначався за формулою:

$$C\ [\text{нмоль/мл}] = \frac{(\Delta E) \times 10^6 \times 2{,}8}{1{,}56 \times 10^5 \times 0{,}2},$$

де $\Delta E = E_{540} - E_{590}$;

2,8 мл – загальний об’єм проби;

0,2 мл – об’єм плазмии;

10^6 – коефіцієнт перерахунку ммоль у нмоль.

$1,56^{x}10^{5}$ – молярний коефіцієнт екстинкції комплексу малонового діальдегіду (МДА) з ТБК, 156000 $М^{-1}$ $см^{-1}$.

При визначенні вмісту ТБКАП у гомогенатах розраховували їхню кількість на мг білка.

2.3.6. Визначення активності ензимів антиоксидантної системи

Оцінка активності каталази. Активність каталази вимірювали методом, основаним на здатності пероксиду водню утворювати стабільний кольоровий комплекс з молібдатом амонію з максимальним поглинанням при 410 нм [7, 24, 96]. Схема дослідження наведена у таблиці 2.1:

Таблиця 2.1

	Контрольна проба (контр.)	Дослідний зразок (досл.)
	0.1 мл (H_2O dist)	0.1 мл плазми
0.2 % розчин NaN_3	0.1 мл	-
0,03 % розчину H_2O_2	2 мл	2 мл
Зразки інкубували 1 хв при + 25 ° С, а потім додавали		
0.2 % розчину NaN_3	-	0.1 мл
4 % розчину $(NH_4)_2MoO_4$	1 мл	1 мл
центрифугували 2 хв при 300 g, абсорбцію супернатанту вимірювали при 405 нм		

Розрахунок активності каталази проводили за формулою:

$$\text{Активність [мкмоль/с*л]} = (\Delta E \times V \times 1000)/(\varepsilon \times t),$$

де $\Delta E = E_{контр} - E_{досл}$,

V – об’єм проби, мл;

1000 – перерахунок на 1 л;

ε = 22,2 $М^{-1}см^{-1}$ – коефіцієнт молярної екстинкції H_2O_2 ;

t – 60 с, час інкубації.

Визначення активності глутатіонпероксидази. Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали в гемолізаті еритроцитів, розведеному фізіологічним розчином у співвідношенні 1:40 за методом Разиграєва А. [34]. Цей метод базується на неензиматичній утилізації відновленого глутатіону (GSH) як субстрату при поглинанні 410 нм після інкубації з реагентом Елмана (5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (ДТБНБК)). Коротко: 0,65 мл розчину А, який містив 0,1 М трис-HCl буфер (pH 7,4), 12 мМ азиду натрію, 6мМ ЕДТА, змішували з 0,1 мл гемолізату еритроцитів, додавали 0,25 мл 2 мМ розчину GSH та 0,25 мл 1,8 мМ розчину H_2O_2 з концентрацією 1,8 мМ, інкубували при 25 °С протягом 15 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1,5мл 7,5% розчину метафосфорної кислоти, після чого проводили центрифугування при 300 g впродовж 5хв. До супернатанту додавали 0,025 мл реагента Елмана та вимірювали оптичну густину при 405 нм. Розрахунок результатів проводили за формулою:

$$\text{Активність ГП [МО GSH/г Hb]} = (E_{405} \times 167{,}75 \times 10^3) / [Hb],$$

де E_{405} – відновленого глутатіону [мкмоль] у досліджуваній плазмі;

$167{,}75 \times 10^3$ – коефіцієнт перерахунку на 1 л;

[Hb] – концентрація гемоглобіну у дослідній пробі [г/л].

Визначення активності глутатіонредуктази. Активність глутатіонредуктази (ГР) визначали в гемолізаті еритроцитів, керуючись методикою Kryl'skii та ін. [123]. Ферментативну активність ГР оцінювали за споживанням НАДФH_2 у присутності GSSG за зменшенням абсорбції при 405 нм.

У суспензійну суміш, що містила 0,2 мл 4 мМ розчину окисненого глутатіону (GSSG), добавляли 0,1 мл розведеного 1:8 гемолізату крові та інкубували протягом 5 хв при 37 °С. У дві пробірки відбирали по 0,1 мл суміші. В одну з пробірок (дослідна проба) додавали 0,01 мл 5,35 мМ/л НАДФH_2-розчину, друга слугувала контролем. Зразки інкубували протягом 10 хв при

37°С, реакцію зупиняли додаванням 0,1 мл 10 % ТХО, після чого НАДФН$_2$ додавали до контролю. Зразки інкубували протягом 10 хв, потім центрифугували 15 хв при 300g. До 0,1 мл супернатанту додавали 10 мкл реактиву Елмана з концентрацією 10 мМ. Результат розраховували за формулою:

$$\text{Активність ГР [МО НАДФН/г Hb]} = \frac{\Delta E \text{ x } 1{,}201 * 10^6 \text{x } 84}{13100 \text{ x } 10^2 k},$$

де $\Delta E = E_{конт.} - E_{досл}$;

1,201 – кінцевий об’єм проби (мл);

10^6 – коефіцієнт перерахунку на 1л;

84 – коефіцієнт розведення зразка;

13100 – коефіцієнт молярної екстинкції ДТБНБК;

10 – час інкубації, хв.

к – коефіцієнт перерахунку на GSSG.

Оцінка активності супероксиддисмутази. Активність супероксиддисмутази (СОД) оцінювали за здатністю дисмутації супероксиду, що продукується під час аутоокиснення кверцетину в лужному середовищі [25]. Стисло, до 1,5 мл С реагенту добавили до 0,1 мл гемолізату крові (1:25). С реагент готували ex tempore за схемою: до 1,25 мл фосфатного буфера 0,02 М, pH = 7,8 додавали до 0,25 мл тетраметилендіаміну (ТЕМЕД) 0,005 М, що був проготований на 0,5 мМ ЕДТА (кінцевий pH розчину дорівнював 10,0). У холосту пробу замість розчину гемолізату вносили 0,1 мл фізіологічного розчину. Сумарний об'єм усіх зразків доводили дистильованою водою до 1,6мл. Реакція була ініційована додаванням 0,05 мл кверцетину (0,5 мМ у диметилсульфоксиді). Вимірювали абсорбцію при 410 нм. Вміст СОД виражали в (нг/мл) на 1г Hb.

$$\text{СОД [нг/мл·г Hb]} = (\Delta E \times 100\%) / \text{г Hb},$$

де $\Delta E = (E \text{ контр.} - E \text{ досл.}) / E \text{ холоста}$.

2.3.7. Методи оцінки показників протеазно-інгібіторної ланки

Визначення активності трипсиноподібних ензимів (ТПЕ) досліджували за методом К. М. Веремеєнко у модифікації [8]. В основі методу лежить кольорова реакція п-нітроаніліну, який утворюється при розщепленні синтетичного безбарвного субстрату N-бензоїл-D,L-аргінін-4-паранітроанілід гідрохлориду (БАНІ) під дією ТПЕ. Стисло: до 25 мкл (розведеної у 5 разів у 0,05 М фосфатному буфері, pH =7,9) плазми додавали 125 мкл розчину БАНІ, потім інкубували 20 хв при 37°С до появи жовтого забарвлення. У якості контрольної проби використовували розчин трипсину (17,6мМ · 10^{-3}). Зупиняли реакцію додаванням 50 мкл 2 М оцтової кислоти в усі зразки крім контролю. Ступінь забарвлення вимірювали при довжині хвилі 410 нм і розраховували активність ТПЕ за калібрувальним графіком (рис. 2.2.), який будували за рівнем забарвлення різних концентрацій п-нітроаніліну. Активність ТПЕ у плазмі крові/розчинній фракції білків виражали у міжнародних одиницях у 1 мл дослідного зразку на мг білка (МО/мл·мг).

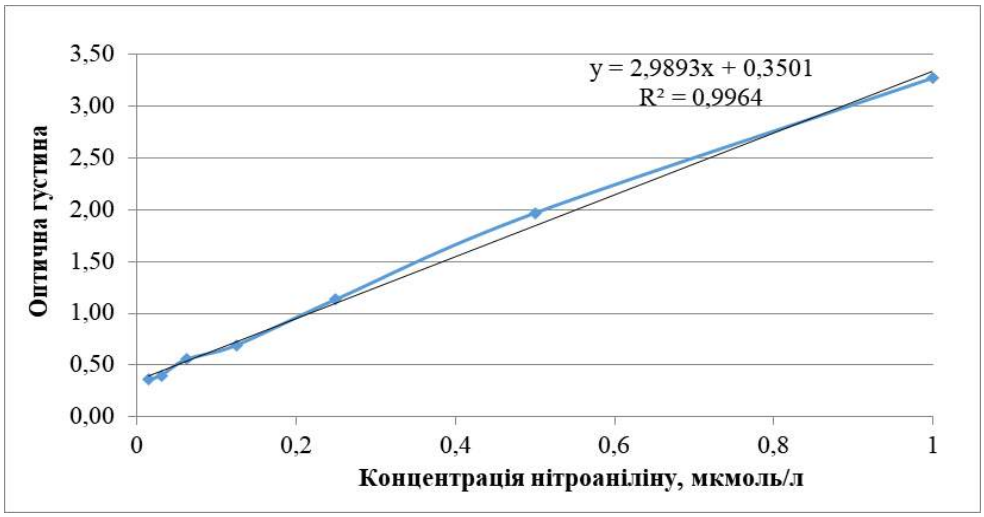

Рис. 2.2. **Графік залежності оптичної густини від концентрації нітроаніліну**

Желатин-зимографія. Для дослідження відносної активності ММП2 та ММП9 у плазмі та гомогенаті було використано метод желатин-зимографії,

який проводили шляхом вертикального електрофорезу у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ), кополімеризованому з желатиною [46]. Стандартні та досліджувані зразки розводили у ЗФР (плазму у 20 разів, екстракти серця – в залежності від концентрації загального білка) та інкубували 20 хвилин при 37°С, потім додавали буфер Леммлі (рН 6,8) у співвідношенні 1:1. Загальна кількість білка у лунках була від 1 до 3 мкг. Електродний буфер містив 0,025 М тріс, 0,192 М гліцин, 0,01 % ДСН, рН 8,3. Концентрування у верхньому гелі відбувалось при силі струму 20 мА, фракціонування у нижньому – при 30 мА. Електрофорез проводили у холодовій камері при +4°С протягом 4 годин. Подальші маніпуляції проводили при кімнатній температурі. Після закінчення ЕФ гелі промивали чотири рази по 15 хвилин розчином 2,5 % Тритону Х-100, потім витримували при +37 °С у інкубаційному буфері, що містить 0,025 М тріс-HCl, 5 мМ $CaCl_2$, 0,9 % NaCl, 0,05 % NaN_3, рН 7,5. Час інкубації для плазми 18-20 годин, екстракти серця – 48 годин. Фарбування гелів після відмивання проводили розчином Кумассі діамантового синього G250 у суміші етанол: оцтова кислота: вода 2,5 :1 : 6,5. Залишки фарби відмивали у знебарвлюючому розчині, що містив 50 % етанол та 7 % оцтову кислоту. Електрофореграми зберігали у 7 % оцтовій кислоті. Желатинази ідентифікували за прозорими смугами на синьому фоні (рис. 2.3.).

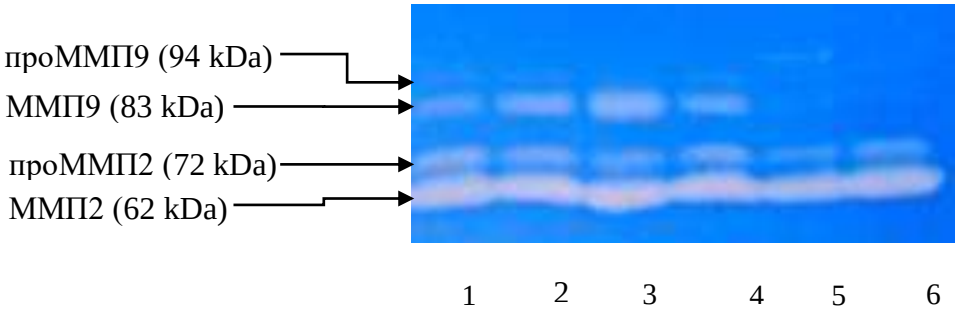

Рис.2.3. **Зразок електрофореграми плазми крові щурів**

1-4 – при АІМ, 5 – при АІМ на тлі застосування корвітину, 6 – контроль

Для визначення відповідних зон лізису досліджуваних ММП використовували забарвлені маркери для ЕФ та позитивний контроль на ці

ензими. Електрофореграми фотографували і обчислювали активність желатиназ за допомогою програми Sorbflil TLC. Активність желатиназ визначали в умовних одиницях (УО) відносно їхньої активності у стандартному зразку, що була прийнята за 100 УО.

Визначення α1-інгібітора протеїназ. Вміст α1-інгібітора протеїназ (α1-ІП) досліджували за методом К. М. Веремеєнко [8], що базується на здатності α1-ІП пригнічувати гідроліз трипсином хромогенного субстрату БАНІ. За методикою у дослідні зразки плазми крові додавали надлишкову кількість трипсину. Вміст α1-ІП розраховували за різницею між відомою кількістю доданого у дослідну пробу трипсину та трипсину, що залишився після взаємодії з інгібіторами, які є у цій пробі. В ході експерименту дослідні проби порівнювали зі зразком, в який трипсин додавали після зупинки реакції 5 % розчином фосфорновольфрамової кислоти. Для розрахування концентрації α1-ІП будували калібрувальний графік і робили серії стандартних розчинів трипсину, під дією яких відбувався гідроліз БАНІ. Концентрацію α1-ІП розраховували за формулою:

$$C = (n \times 100 \times 1000)/(0{,}02 \times 24000),$$

де C – концентрація α1-ІП, мкмоль/л;

n – кількість зв’язаного з α1-ІП трипсину, мкг;

100 – розведення плазми;

1000 – коефіцієнт перерахунку на 1 л плазми;

0,02 – кількість плазми, мл;

24000 – молекулярна маса трипсину.

Визначення α2-макроглобуліну. Вміст α2-макроглобуліну (α2-МГ) досліджували за методом К. М. Веремеєнко [8], згідно якого надлишок трипсину, який додають до зразків плазми крові, забезпечує повне насичення α2-МГ трипсином. Незв’язаний з α2-МГ трипсин блокують соєвим інгібітором трипсину. Трипсин у комплексі з α2-МГ може розщеплювати субстрат БАНІ, в

той час як соєвий інгібітор не впливає на цей комплекс. Кількість ферменту у комплексі з α2-МГ визначали за калібрувальним графіком, який будували подібно до визначення вмісту α1-ІП. Концентрацію α2-МГ розраховувли за формулою:

$$C = (n \times 20 \times 1000)/(0{,}3 \times 1000000) \times \cdot 15,$$

де C – концентрація α2-МГ (г/л);

n – кількість трипсину, зв'язаного з α2-МГ (мкг);

20 – розведення плазми;

1000 – коефіцієнт перерахунку на 1 л плазми;

0,3 – об'єм плазми, мл;

1000000 – коефіцієнт перерахунку на 1 г трипсину.

2.3.8. Визначення галектину-3 (AGE-R3)

Визначення AGE-R3 проводили методом імуноблотингу з використанням специфічних антитіл до цього лектину. Білкові фракції розділяли за методом вертикального гель-електрофорезу у 10% ПААГ у присутності натрію додецилсульфату [136]. В кожну лунку вносили дослідні зразки, що містили 5 мкг білка. Після закінчення електрофорезу білки переносили на нітроцелюлозну мембрану [206] під дією електричного струму 300 mA впродовж 2-х годин, після чого сайти неспецифічного зв'язування блокували 1 % розчином БСА. Після відмивання у ТФБ (3 рази по 10 хв) проводили інкубацію з антитілами до AGE-R3 (розведення 1:400), інкубували 12 год при 4 °С, після чого блотограму ретельно відмивали робочим розчином ТФБ. Для візуалізації зон, що містять AGE-R3 використовували два типи вторинних антитіл: ФІТЦ- мічені та кон'юговані з пероксидазою хрону. Мембрани з ФІТЦ- міченими антитілами візуалізували за допомогою Red™Imaging System (Alpha Innotech), а при використанні кон'югату вторинних антитіл мічних з пероксидазою з кореня хрону, мембрану забарвлювали

розчином діамінобензидину та H_2O_2. Блотограми фотографували та обчислювали денситометрично за допомогою програми Sorbflil TLC.

2.4. Фізіологічні та гістологічні методи дослідження

Тест відкритого поля. Дослідження фізіологічної активності щурів проводили за тестом Буреша у відкритому полі [4], використовуючи пофарбовану у білий колір підлогу з фанери (80×80 см), яка поділена чорними лініями на 16 квадратів (20×20 см) і розташована на ніжках 50 см заввишки. На перетині ліній чотирьох внутрішніх квадратів знаходилось 9 нірок (d = 4 см). Щура розміщували в кутку, орієнтуючи до центру, і фіксували на відео всі прояви поведінки протягом 3 хв. Тестування проводили в однакові фази світлового циклу. Для запобігання впливу відволікаючих факторів поверхню поля обробляли 70 % розчином етанолу після кожної тварини. У ході поведінкового тестування визначали кількість ліній, які перетнула тварина, вертикальні стійки, зазирання у нірки, дефекацію. Така методика дозволяє одночасно дослідити локомоторну, дослідницьку активність та вегетативно-емоційний стан тварин.

Електрокардіографія. Функціональний стан міокарда оцінювали по закінченні експерименту за оцінкою ЕКГ у другому стандартному відведенні з використанням комплексу КАРДІОЛАБ 2000 «ХАІ-Medica» (Україна). Електричну активність серця оцінювалася за такими параметрами: частота серцевих скорочень (ЧСС, уд/хв), тривалості серцевого циклу (інтервал R-R мс), тривалість Q-хвилі (Q, мс), тривалість R-хвилі (R, мс), тривалість QRS-комплексу (QRS, мс), інтервал QT (мс), електрична вісь серця (вісь QRS), напруженість зубців Q, R, S і T (мВ) [42].

Гістологічні дослідження [53, 93]. Серця фіксували в 10 % формаліні, приготованому на ЗФР (pH 7,4) протягом 24 год за кімнатної температури, дегідратували в розчинах із зростаючими (70, 80, 95 та 100%) концентраціями ізопропанолу 1 год у кожній концентрації за кімнатної температури, потім двічі у ксилолі. Після цього всі зразки парафінізували. За допомогою ротаційного мікротому Thermo Scientific Microme HM355 (Thermo Fisher Scientific, Німеччина) робили зрізи завтовшки 5 мкм, розміщали на слайд SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser, Menzel GmbH & Co KG, Брауншвейг, Німеччина) та висушували. Фарбування отриманих гістологічних зрізів проводили у двох варіантах: PAS - D (Periodic acid-Schiff-diastase) для виявлення глікогену та PAS – забарвлені без попередньої обробки. Первинна діастаза необхідна для знебарвлення глікогену. Першу серію попередньо інкубували протягом 20 хвилин при 37°C з альфа-амілазою (A3176, Sigma-Aldrich, США) для видалення глікогену. Після цього зразки промивали у проточній воді протягом 5 хв, а потім обробляли кислотою протягом 5 хв, промивали у дистильованій воді та забарвлювали реагентом PAS 10 хв. Після промивання в водопровідній воді протягом 5 хв, слайди відновлювали в гематоксиліні Мейер протягом 30 секунд і ще раз промивали у проточній воді. Отже, порівняльна оцінка парних секцій PAS-D/PAS дозволяє оцінити розподіл глікогену в кардіоміоцитах, виключаючи інші PAS-позитивні речовини. Всі забарвлені зразки оцінювались три рази двома незалежними гістопатологами за допомогою мікроскопа Zeiss Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина).

Для гістологічної характеристики використовували такі показники як запальна інфільтрація та інтенсивність фарбування PAS-кардіоміоцитів. Всі гістологічні особливості оцінювались у дев'яти різних областях зору (FOV) для одного зразка при збільшенні ×400. Поля зору були вибрані для максимального висвітлення субепікардіальних, інтрамуральних та субендокардіальних шарів міокарда щурів, об'єднуючи три поля зору для одного шару.

2.5. Статистична обробка даних

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-Уітні для малих вибірок. Рівень відмінностей розглядався як статистично значущій при ймовірності помилки ($P < 0,05$). Аналіз залежності показників проводили за допомогою коефіцієнтів кореляції Спірмена та Пірсона.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Показники окисної модифікації та шляхи її запобігання за умов адреналінової ішемії міокарда (модель 1)

Висока частота серцево-судинних захворювань в умовах техногенного прогресу значною мірою обумовлена впливом стрес-факторів різного ґенезу. Враховуючи, що стрес пов'язаний з підвищенням рівня катехоламінів у крові, в результаті чого розвивається аритмія, гіпертонія та в багатьох випадках, як наслідок, ішемічна хвороба серця, в наших дослідженнях була використана модель ішемії міокарда, що запропонована Хідіровою та ін., детальний опис якої наведено в розділі 2 .

3.1.1. Зміни фізіологічних та біохімічних параметрів у щурів під дією адреналіну та вплив на них кардіопротекторних препаратів

Результати дослідження свідчать, що введення адреналіну експериментальним щурам впливає на фізіологічний стан та окремі біохімічні показники. По закінченні введення препаратів у тварин спостерігалось пригнічення поведінкових реакцій внаслідок погіршення фізичного стану (апатія, млявість, тахікардія, заніміння кінцівок після ін'єкцій, дисфункція сечового міхура). Смертність у досліджуваних групах тварин склала 18 %.

У контрольній групі щурів показники ЕКГ відповідали значенням, що наведені у літературі [21]: відсутній зубець Q, зубець P-позитивний, зубець S одразу переходив у T, формуючи інтервал S-T, амплітуда зубця R складала, в середньому, 0,61±0,01 мВ, а зубця T – 0,25±0,01 мВ. Частота серцевих скорочень (ЧСС) становила 349,4±7,8 ударів за хвилину (уд/хв) (рис. 3.1а).

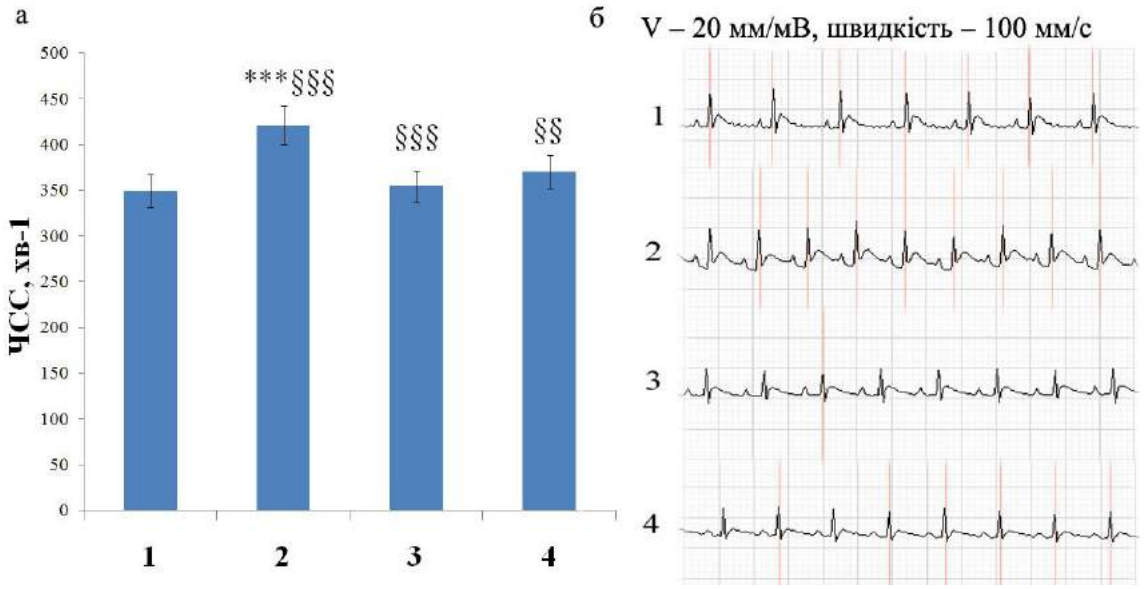

Рис. 3.1 Частота серцевих скорочень (а) та електрокардіограми (б) експериментальних тварин

1 – контрольна група, 2 – щури з адреналін-індукованою ішемією (АІМ), 3 – щури з АІМ після введення корвітину, 4 – введення доксицикліну після набутої АІМ. *** – P<0,001 – вірогідна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи; §§§ –P<0,001 – вірогідна різниця по відношенню до групи АІМ.

За даними ЕКГ у 60 % експериментальних тварин після закінчення введення адреналіну зафіксовано набуту ішемію міокарда: у 2-й групі тварин було зафіксовано підвищення ЧСС на 20 % відносно групи контролю, зміна амплітуди зубця R та елевацію сегменту ST відносно ізолінії на 1,90±0,11 мм. Показано, що зубець S зливається з позитивним зубцем T (рис. 3.1б), розширюється сегмент ST, що свідчить про формування зони трансмурального ушкодження м’язових волокон внаслідок гострого порушення коронарного кровотоку. Інші дані щодо розрахунку показників ЕКГ наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Показники ЕКГ у експериментальних щурів (M±m, n=10)

Показники ЕКГ	Групи тварин			
	Контроль	АІМ	АІМ+К	АІМ+Д
Тривалість інтервалу RR±RR, мс	161,6±2	129,6±2**	166±3§§	172,4±3§§
Тривалість інтервалу PQ, мс	50±2,45	40,5±5,53	54,7±4,40	49,6±2,93
Тривалість інтервалу QT, мс	75,1±3,22	70,25±1,73	80,7±0,67	77,0±4,17
Тривалість комплексу QRS, мс	15,6±0,44	14,25±0,76	18,25±1,18	16,05±0,89
Вольтаж зубця P, мВ	0,05±0,01	0,08±0,01	0,06±0,02	0,07±0,01
Вольтаж зубця T, мВ	0,04±0,01	0,22±0,02***	0,05±0,01	0,11±0,01***
Вольтаж зубця R, мВ	0,53±0,06	0,45±0,07	0,51±0,03	0,49±0,07

–P<0,01,* – P<0,001 – вірогідність різниці у порівнянні з показниками контрольної групи;

§§ –P<0,01,§§§ – P<0,001– вірогідність різниці по відношенню до групи АІМ

Введення адреналіну також вплинуло на зміни поведінкових реакцій експериментальних тварин, що проявлялось пригніченням локомоторної активності щурів другої групи та зменшенням рухової активності. Застосування К та доксицикліну приводило до нормалізації ЧСС та покращеня результатів ЕКГ. Введення К впродовж п’яти днів призводило до відновлення положення сегменту ST у третій групі, прямі ознаки ішемії на ЕКГ були відсутні, але зміна тривалості комплексу QRS, характерна для вогнищевих ушкоджень міокарда, залишалась довшою по відношенню до контролю на 15%. За дії доксицикліну 10% щурів спостерігали незначне зміщення сегменту ST над ізолінією, що не

перевищувало 0,15 мм. Також відбувалось розширення та підвищення амплітуди зубця Т.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших авторів [40], згідно з якими антиоксиданти надають двофазний іонотропний ефект на скорочувальну активність папілярного м'яза щурів, дія якого полягає у забезпеченні синхронного скорочення всіх компонентів апарату мітрального клапану [36], зменшуючи частоту тахікардії. Такий ефект може бути пов'язаний з активацією β-адренорецептора та збільшенням цАМФ і Ca^{2+} в кардіоміоцитах. Антиаритмічна дія може бути пов'язана з модуляцією функціональної активності натрієвих і кальцієвих каналів у кардіоміоцитах.

Таблиця 3.2

Рівень АсАТ та глюкози у експериментальних щурів (M±m, n=10)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	АІМ	АІМ+К	АІМ+Д
Глюкоза [ммоль/л]	4,73±0,40	6,7±0,53*	4,8±0,25	6,1±0,43
АсАТ [мкмоль/мл*год]	0,49±0,32	0,65±0,53*	0,58±0,25	0,55±0,43

* – P<0,01 – різниця вірогідна у порівнянні з показниками контрольної групи

Дослідження рівня глюкози та кардіоспецифічного ферменту АсАТ також свідчить про ушкодження міокарду за умов АІМ (таблиця 3.2).

Як видно з наведених даних, моделювання АІМ супроводжується вірогідним підвищенням рівня внутрішньоклітинного ферменту АсАТ на тлі значних змін рівня глюкози. За введення обох зазначених вище препаратів спостерігали тенденцію до зниження рівня АсАТ, хоча повного відновлення активності цього фермента в плазмі крові не відзначалось. Отже сукупність отриманих фізіологічних та загальнобіохімічних показників свідчить про ушкодження міокарда ішемічного характеру, що частково нівелюється введенням К та Д.

3.1.2. Показники окисної модифікації протеїнів та ензимів антиоксидантної системи у експериментальних щурів

При дослідженні показників окисної модифікації білків у експериментальних тварин нами було встановлено, що за АІМ вміст альдегідо- і кетопохідних у плазмі зростав у порівнянні з інтактною групою у 1,5 раза та у 1,2 раза, відповідно (рис. 3.2).

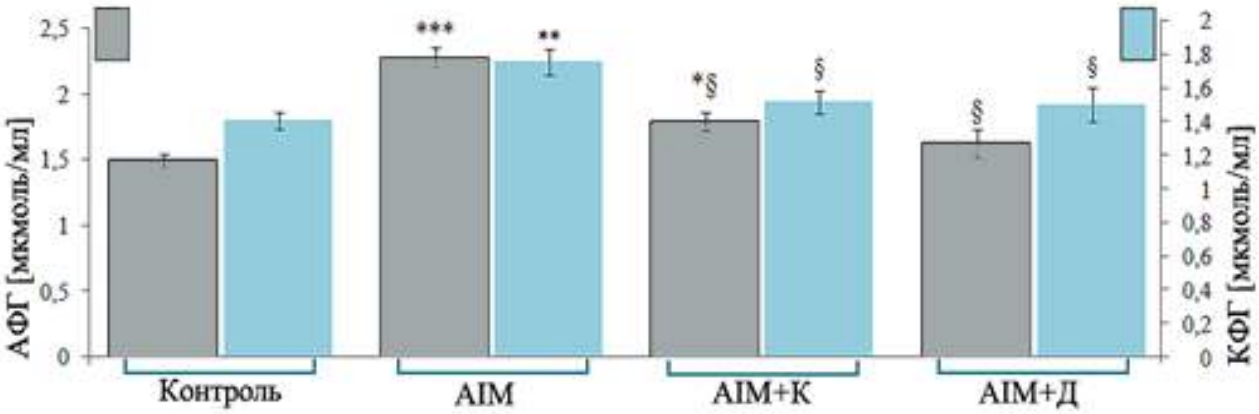

Рис. 3.2 **Вплив корвітину та доксицикліну на показники окисної модифікації білків (M±m, n=10)**

* – 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 в експериментальних групах тварин вірогідно знижувало показники ранньої модифікації протеїнів: значення АФК у третій та четвертій групах на 20 % та 25 %, відповідно; КФК – у третій та четвертій групах на 12-13 %.

Відомо, що за вільнорадикального окиснення відбувається також ліполіз клітинних мембран, накопичення продуктів ПОЛ і загалом ТБКАП, тому додатковим етапом нашого дослідження було визначення рівня ТБКАП у плазмі та цитозольній фракції серця щурів (табл. 3.3.)

Таблиця 3.3

Вплив корвітину та доксицикліну на рівень ТБКАП у експериментальних тварин (M±m, n=10)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	АІМ	АІМ+К	АІМ+Д
ТБКАП у плазмі [нмоль/мл]	0,78±0,18	2,16±0,24 ***	1,39±0,21 ***§	1,22±0,08 ***§
ТБКАП (ЦФ) [нмоль/мл/мг білка]	0,105±0,06	0,143±0,06**	0,106±0,08 §§	0,112±0,05 §

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

Як видно з наведених у таблиці 3.3 даних, за умов АІМ у тварин другої групи відбувалось вірогідне підвищення вмісту ТБКАП у крові та цитозольній фракції серця. Ці зміни спостерігались на фоні незначного підвищення глюкози, що мало місце, скоріше за все наслідок гіперглікемізуючого ефекту адреналіну. Застосування корвітину та доксицикліну призводило до значного зниження концентрації ТБКАП у крові та цитозольній фракції серця, але у крові рівень ТБКАП не досягав значень контрольної групи.

Рівень кінцевих продуктів глікації фКПГ у плазмі експериментальних тварин з АІМ підвищився у 2 рази порівняно з контролем і становив 0,112±0,009 мг/мл (у контролі – 0,068±0,003 мг/мл)(рис. 3.3).

Застосування корвітину призводило до нормалізації рівня фКПГ у плазмі щурів третьої групи. За введення доксицикліну спостерігалась тенденція до зниження цього показника, але не до контрольних значень.

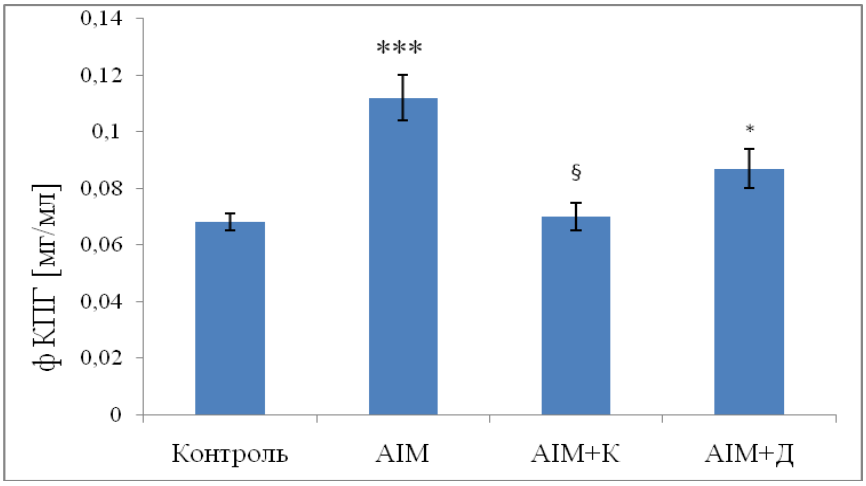

Рис.3.3 **Вплив корвітину та доксицикліну на рівень фКПГ у експериментальних тварин (M±m, n=10)**

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

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

Результати дослідження активності ферментів АОС представлені у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

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 Hb]	80,02±6,85	120,91±3,21**	97,13±7,18§§	102,86±3,59*

* – 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.

Як видно з наведених даних, активність досліджуваних антиоксидантних ферментів у плазмі крові та гемолізаті еритроцитів за умов АІМ достовірно зростала, за виключенням каталази, активність якої знижувалась. Застосування корвітину та доксицикліну призводило до підвищення активності каталази та зниження активності глутатіонпероксидази, при цьому вона була вищою відносно контрольної групи.

Різноспрямованість змін каталази та ГП пояснюється різною спорідненістю їх до вмісту перекису водню. Діюча речовина корвітину – кверцетин – є «пасткою» вільних радикалів, який здатен зменшувати їхню кількість та ушкоджувальну дію [26, 173]. Вірогідно, саме цей механізм зумовлює зниження кардіотоксичного ефекту високих доз адреналіну.

3.1.3. Зміни показників протеазно-антипротеазного балансу у експериментальних тварин

3.1.3.1. Зміни активності трипсиноподібних ензимів та неспецифічних інгібіторів протеолізу у експериментальних тварин

Результати визначення активності трипсиноподібних ензимів та неспецифічних інгібіторів протеолізу представлені у табл. 3.5.

За наведеними у таблиці даними у плазмі крові щурів з АІМ ці показники не змінюються, за виключенням α2-макроглобуліну, кількість якого достовірно знижувалась. У тканині серця кількість α1-інгібітора протеїназ була збільшеною у 2 рази.

При застосуванні корвітину та доксицикліну основні зміни стосувались α2-макроглобуліну: під впливом доксицикліну його кількість у плазмі крові різко знижувалась і була у 5 разів нижче за показники щурів з групи АІМ, а при застосуванні корвітину взагалі не визначалась.

Таблиця 3.5

Активність трипсиноподібних ензимів, 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*
ІП1 у плазмі щурів, [мкмоль/л]	339,1±14,7	332,9±15,9	322,1± 12,7	326,7± 12,3
ІП1 (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***

* – P<0,05; *** – P<0,001 – різниця вірогідна у порівнянні з показниками контрольної групи, ЦФ – цитозольна фракція білків серцевого м’язу, ТПЕ – трипсиноподібні ензими; ІП1 – α1-інгібітор протеїназ; α2-МГ – α2-макроглобулін.

3.1.3.2. Активність матриксних металопротеїназ 2/9 у експериментальних тварин

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, на тлі незмінної активності ММП2 (рис. 3.4).

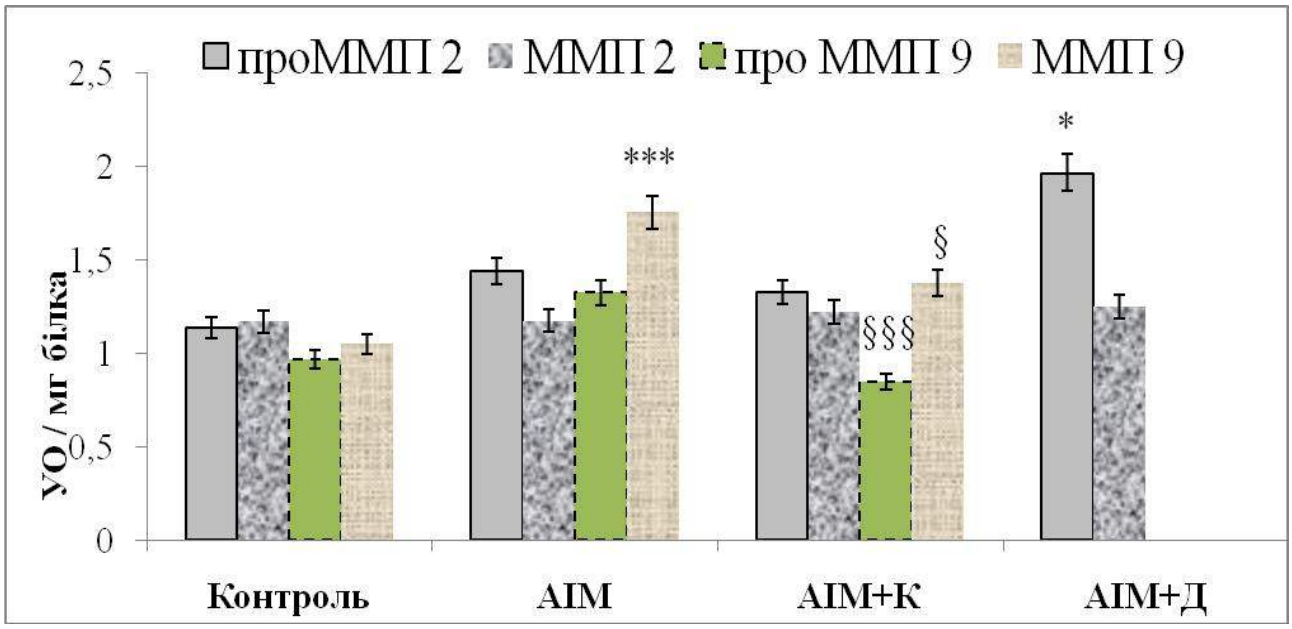

Рис. 3.4 **Активність ММП2 та ММП9 у плазмі щурів з АІМ (M±m, n=10)**

* – 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’язу, навпаки, ММП9 не визначалась, а обидві форми ММП2 достовірно збільшувались (рис. 3.5).

За умов застосування корвітину відбувалось суттєве зниження активності усіх досліджуваних форм ММП у плазмі крові у порівнянні з другою групою. Виразних змін зазнавала проММП9, активність якої сягала навіть нижче контрольних значень.

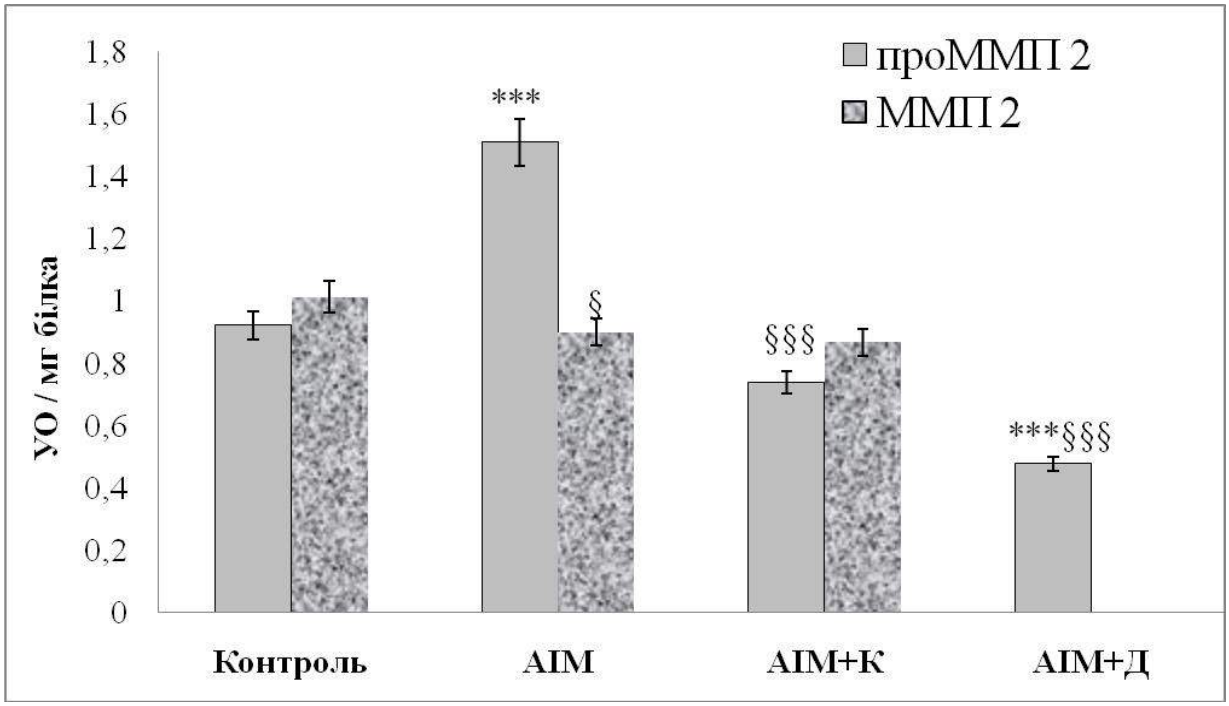

Рис. 3.5 **Активність ММП2 та ММП9 у розчинній фракції серцевого м'язу щурів з АІМ (M±m, n=10)**

* – 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 серцевому м'язі вірогідно зменшувалась активність проММП2. Окремо слід зауважити, що у розчинній фракції білків серця ані проММП9, ані ММП9 не визначались у жодній з досліджуваних груп. Таке саме явище мало місце і за визначення цього ферменту у плазмі крові на тлі застосування доксицикліну. Втім, активність проММП2 у цій групі щурів перевищувала таку при АІМ на тлі значного падіння її активності у серцевому м'язі. Слід зазначити, що за умов нашого експерименту у серцевому м'язі після дії доксицикліну визначалась лише проММП2.

Згідно з літературними даними, доксициклін знижує активність ММП2 і блокує апоптоз клітин, активуючи протеїнкіназу В – продукт генів Akt. Доведено, що ця кіназа інгібує апоптоз, бере участь у регулюванні клітинного циклу, індукує синтез білків і є ключовим білком у регуляції процесів росту

тканин та розвитку м’язової дистрофії [162]. Як вказано вище, наслідки дії доксицикліну залежать від дози та тривалості його застосування. Слід зауважити, в роботі ми використовували високі дози доксицикліну, що відповідають його антимікробній дії, а за даними літератури, саме низькі дози цього препарату здійснюють регулюючу дію на процеси ремоделювання лівого шлуночка після інфаркту міокарда [66].

Отримані результати не суперечать даним інших дослідників, в яких показано наявність позитивного кореляційного зв’язку між активністю желатиназ та інтенсивністю вільнорадикального окиснення [5]. Зниження ТБК-активних продуктів у фракції розчинних білків серця після застосування корвітину та доксицикліну асоційоване зі зменшенням активності желатиназ. Крім цього, доксициклін проявляє властивості інгібітора желатиназ [66], тому має потужний антижелатинолітичний ефект у серцевому м’язі.

Підвищення рівня ОМБ у позаклітинному просторі призводить до утворення міжмолекулярних сшивок у структурі колагену, еластину і фибронектину. Результатом чого стає жорсткість і зниження гнучкості, збільшується його сприйнятливість до механічних впливів. Утворення ОМБ продуктів на бічних ланцюгах колагену та зміна їх заряду впливають на його ділянки контакту з клітинами і іншим матриксом. Змінені окисненені структури матриксу стають більш схильними до протеолізу [80].

Можна зробити припущення, що за умови прогресування окисної модифікації в міжклітинному матриксі також може і регулюватись активність матриксних ферментів, а саме, окислення може провокувати перетворення проферментів у зрілі форми. Цікаво відзначити, що ОМБ також стимулюють продукування запальних цитокінів, що активують матриксні металлопротеінази, тим самим викликаючи деградацію колагену і дилятацію лівого шлуночка [98].

3.2. Показники окисної модифікації та шляхи її запобігання за умов пітуїтрин-ізадринового ушкодження міокарда (Модель 2)

Оскільки модель адреналін-індукованої ішемії міокарда характеризується високою смертністю тварин, для подальших досліджень була використана модель Бєленічева та ін., що базується на комбінованому введенні пітуїтрину та ізадрину. За механізмом дії пітуїтрин є коронароспастичним агентом, синтетичним аналогом антидіуретичного гормону. Ізадрин (ізопреналін, ізопротеренол) – неселективний агоніст β-адренорецепторів, за хімічною природою є аналогом ізопропілнорадреналіну. Зазвичай цей лікарський засіб використовують для лікування брадикардії, блокади серця та, іноді, астми. Протокол введення зазначених препаратів для моделювання ішемії міокарда та характеристика експериментальних груп тварин, що досліджувались в роботі, наведено у розділі 2. Нижче представлено результати досліджень за цією моделлю.

3.2.1. Зміни фізіологічних параметрів за ПІУМ та вплив на них кардіопротекторних препаратів

Введення пітуїтрину та ізадрину впродовж двох днів за зазначеною вище схемою призвело до зміни фізіологічних та біохімічних показників у дослідних щурів, які свідчили про розвиток ушкодження міокарда в подальшому позначено як ПІУМ.

За комбінованого введення цих препаратів у 2-й групі щурів спостерігали поліурію, підвищення температури, апатію, тахікардію, зниження рухової активності у порівнянні з контролем. Маса контрольних та експериментальних тварин протягом експерименту не відрізнялась і становила 200 ± 20 г, але спостерігались зміни поведінкових реакцій, що проявлялись у зниженні локомоторної та дослідницької активності (перетинання ліній, заглядання у нірки), завмиранням у кутах та підвищення кількості болюсів.

За результатами перевірки електричної активності серцевого м’язу спостерігали зміни показників ЧСС у тварин з ПІУМ, що представлені на рис.3.6.

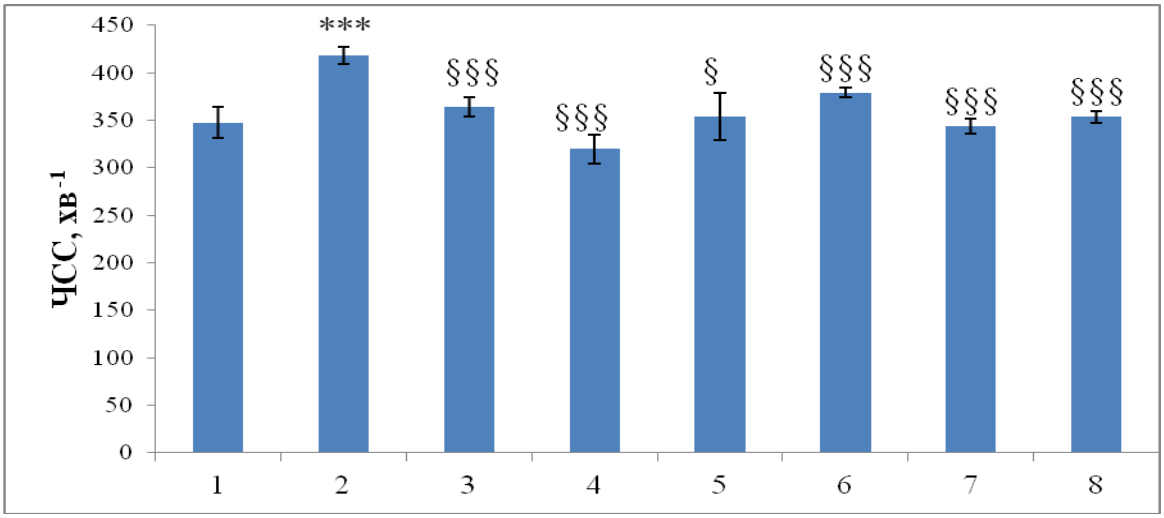

Рис. 3.6. **Зміни ЧСС у дослідних тварин за ПІУМ (M±m, n=10)**

V – 20 мм/мВ, швидкість – 100 мм/с; 1 – контроль; 2 – ПІУМ; 3 – ПІУМ +К;4 – ПІУМ +Е; 5 – ПІУМ + ОГ; 6 – ПІУМ +АГ; 7 – ПІУМ+Д1; 8 – ПІУМ +Д2

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

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

Було зафіксовано достовірне підвищення ЧСС (P < 0,001) до 418,43 ± 9,40 $хв^{-1}$ (в контролі 347,71 ± 16,60 $хв^{-1}$), збільшення зубця Т (0,15 ± 0,04 мВ) та його розширення, зменшення амплітуди R зубця до 0,46 ± 0,01 мВ (норма 0,56 ± 0,01 мВ) та інтервалу R-R, який склав 149,6 ± 6,01 мс (163,32 ± 9,19 мс у контролі). Одночасно було встановлено елевацію сегмента S-T вище ізоелектричної лінії (1,81 ± 0,10 мм) та його розширення. Ці результати свідчать про порушення електричної провідності серця, що є характерним для ішемічного ушкодження міокарда. Крім того, за цієї патології відбуваються й зміни амплітуди зубців та тривалості інтервалів на ЕКГ: на тлі порушень ритму збільшується амплітуда зубця Р (0,09 ± 0,02 мВ) та його площа, що свідчить про появу шлуночкових аритмій. Отже, використана нами схема введення обраних препаратів

викликала ушкодження серцевого м’язу, подібне за клінічними проявами та показниками ЕКГ до гострого періоду ІХС у людей.

Покращення конфігурації ЕКГ було відзначено у щурів 3-ї групи після введення корвітину: амплітуда Р-хвиль збільшилась до значень контрольної групи, елевація ST-сегмента не виявлялась. Помірне поліпшення ЕКГ спостерігалось в групі тварин, які отримували 2-ОГ. Виявлено відновлення амплітуди R-хвилі та зменшення сегменту ST порівняно з другою групою, хоча підйом хвилі S залишався на рівні 1,32 ± 0,01 мм.

Застосування аміногуанідину сприяло зниженню ST-сегменту до ізолінії, амплітуда QRS залишалась низькою. За використання аміногунідину ІМС, навпаки, залишався високим і перевищував такі параметри контрольної групи на 18,6 %.

Після застосування еплеренону у тварин проявлялась позитивна динаміка показників ЕКГ: вірогідне зниження ЧСС до значень контрольної групи ($P \leq 0,001$) та відновлення амплітуди зубця R, хоча у 40 % щурів 4-ї групи зберігалась елевація сегменту ST з подовженням інтервалу QT. Препарат застосовували у дозах, запропонованих для пацієнтів із ІХС, з урахуванням видових особливостей щурів. Наші результати свідчать, що еплеренон у дозі 5 мг/кг протягом 5 днів нормалізує серцевий цикл та амплітуду ЕКГ, але недостатньо для повного відновлення всіх параметрів.

Застосування доксицикліну призводило до зниження ЧСС: у сьомій групі цей показник повернувся до норми і склав 343,81 ± 7,46 $хв^{-1}$, у восьмій – 353,64 ± 6,16 $хв^{-1}$. Амплітуда зубця R нормалізувалась, але у сьомій групі зубець Т залишався розширений і низький. Доксициклін у дозі 4,2 мг/кг стимулював зниження ІМС, а за використання високих доз доксицикліну ІМС, навпаки, залишався високим і перевищував такі параметри контрольної групи на 12,1 %, відповідно. Отже, низькі дози доксицикліну проявляють виражений відновлювальний ефект на фізіологічний стан та функції серцевого м’яза після експериментально набутої ішемії міокарда.

3.2.2. Гістологічні зміни у щурів з ПІУМ та вплив на них антиоксидантів

За результатами гістологічних досліджень у всіх груп тварин з ПІУМ було виявлено майже однакові гістопатологічні зміни у зразках міокарда лівого шлуночка, які відрізнялися лише їх тяжкістю та розподілом всередині серця (рис. 3.7).

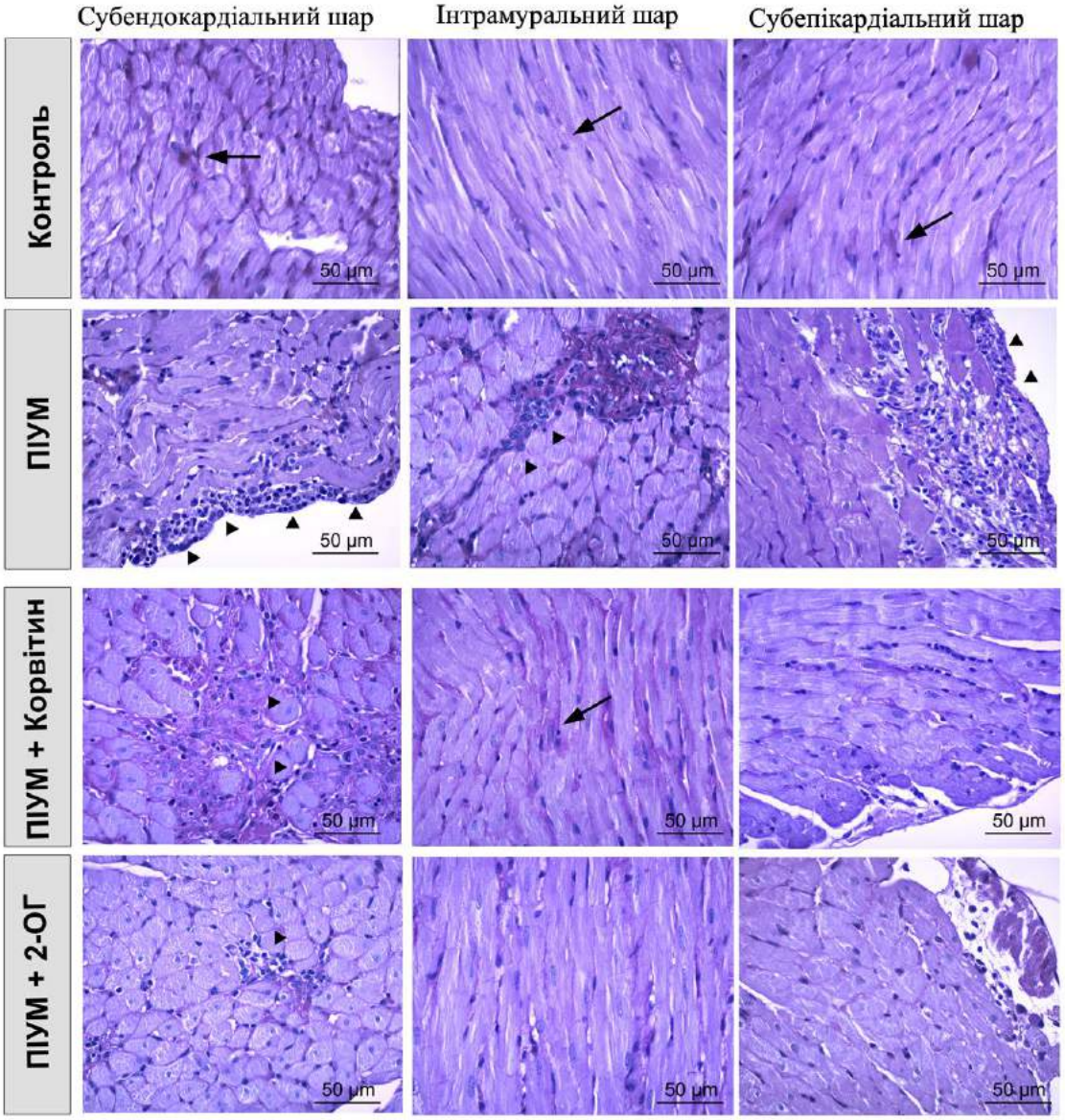

Рис. 3.7 **Гістологічне дослідження серця у тварин з ПІУМ**

Стрілки: відкладення глікогенну; трикутники: запальний інфільтрат. Фарбування PAS (збільшення – 400X).

Ці стереотипні зміни охоплювали некротичні кардіоміоцити та запальні інфільтрати періваскулярних та інтерстиціальних локалізацій, що містять в основному лімфоцити, гістіоцити, моноцити та деякі плазматичні клітини. Також було відзначено мінімальні ознаки інтерстиціального фіброзу. Крім того, у деяких зразках цих груп спостерігалась гіперемію капілярного шару та розділення м'язової тканини на пучки з розпухлими окремими волокнами. Вакуолізована цитоплазма та конденсовані темні ядра представлені некротичними структурами в кардіоміоцитах. Забарвлення PAS-technik показало очевидне виснаження глікогену навколо уражень, що спричиняє серцевий напад. Важливо зазначити, що розподіл цих змін в досліджуваних групах змінювався в субендокардіальному, інтрамуральному та субепікардіальному шарах міокарда.

Мікроскопічні порівняння лівого шлуночка щурів на тлі ПІУМ показали, що постішемічні та постнекротичні зони містять найбільше виснаження глікогену в саркоплазмі кардіоміоцитів та значні запальні інфільтрати, розташовані переважно в субепікардіальному шарі. Периваскулярний набряк та інтерстиціальний фіброз виявлялись у всіх сегментах міокарда цієї групи. Отже, на 6-й день спостереження було продемонстровано, що у тварин за ПІУМ декілька дрібних вогнищ, як правило, зливаються та складаються з інфільтратів лімфоцитів-макрофагів та окремих поліморфноядерних лейкоцитів. Крім фокальних інфільтратів, спостерігалась дифузна мононуклеарна інфільтрація строми міокарда, а фокуси некротизованих кардіоміоцитів знаходились переважно в субепікардіальному шарі.

У тварин третьої досліджуваної групи, що отримували корвітін після індукції ПІУМ, спостерігались менш виражені запальні зміни у міокарді: зменшувалась кількість лімфоцитарно-макрофагальних інфільтратів, переважно розташованих на субендокардіальних та субепікардіальних рівнях. Вогнища некрозу та руйнування міофібрилів, а також прояви периваскулярного набряку та набряку судинної стінки вважались незначними. Найбільшвеликі зони

відкладенні глікогену спостерігались переважно у інтрамуральному шарі міокарда (рис. 3.7).

Шестиденне введення 2-ОГ щурам з ПІУМ характеризувалось значним зниженням запальної реакції та збільшенням вмісту глікогену в кардіоміоцитах. Запалення в міокарді цих тварин було найменш вираженим у порівнянні з вищеописаними групами. Зміни в мікроциркуляції були порівняні з показниками другої групи. Кількість глікогену у кардіоміоцитах цієї групи була значно вищою, ніж в групі з ПІУМ, але меншою за таку у контролі та групі з ПІУМ на тлі застосування корвітіну, що представлено напівкількісним аналізом накопичення глікогену у табл. 3.6:

Таблиця .3.6

Напівкількісний аналіз тяжкості запалення в лівому шлуночку та накопичення глікогену в кардіоміоцитах

	Контроль	ПІУМ	ПІУМ +К	ПІУМ +2-ОГ
Рівень запалення	–	++++	++	+
Акумуляція глікогену	++++	+	+++	++

Позначаючи 0 як відсутність забарвлення глікогену, + слабка реакція, + + - помірна, +++ - сильна і ++++ дуже сильне забарвлення глікогену.

Крім загальної фізіологічної корекції та кардіопротекторного ефекту, препарати також стимулювали поліпшення опорно-рухової та пізнавальної діяльності у щурів (рис. 3.8).

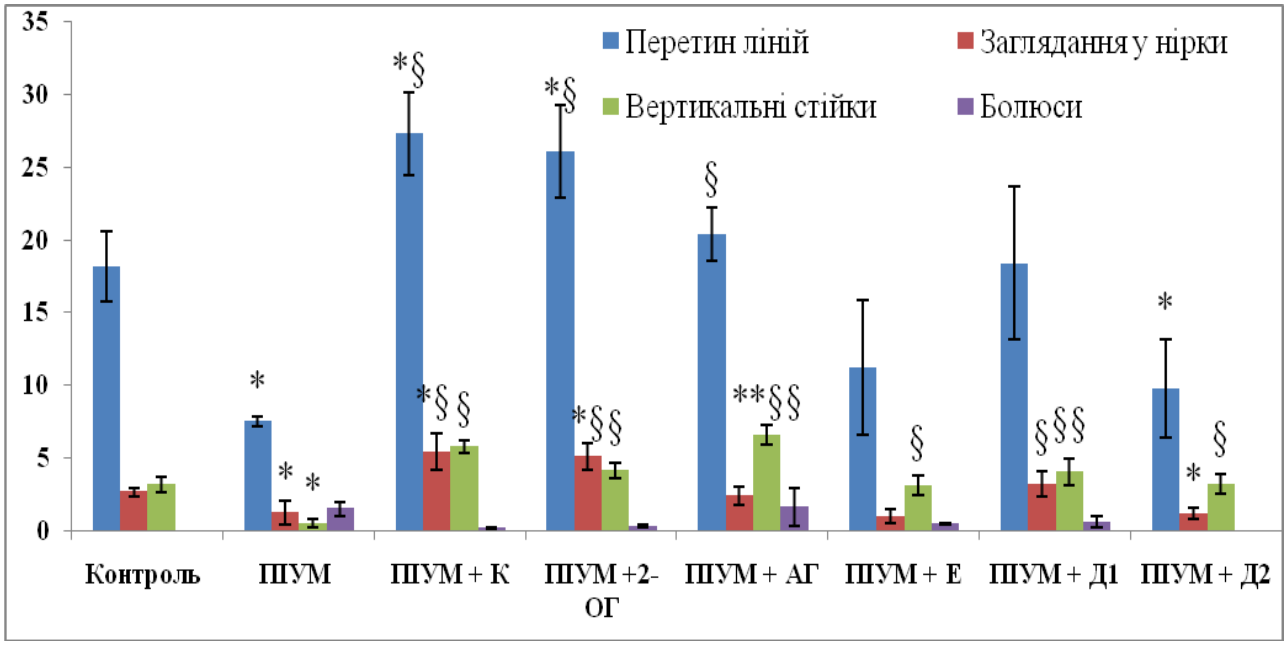

Рис 3.8. **Поведінкові реакції у експериментальних тварин**

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

§ – P<0,05, §§ –P< 0,01 – відносно до групи з ПІУМ

На рис. 3.8 можна побачити, що за пітуїтрин-ізадринового ушкодження серця тварини були менш активні у порівнянні з контрольною групою, достовірно зменшувалась активність при перетині ліній у відкритому полі, кількість заглядань у нірку та вертикальних стійок. При застосуванні корвітину та 2-оксоглутарату тварини відновлювали свою активність у порівнянні з пітуїтрин-ізадриновим ушкодженням, більш того спостерігалось збільшення активності у тварин у порівнянні навіть з контролем (рис 3.8). Менш виражені зміни спостерігались за впливу аміногуанідину, при чому больовий синдром залишався незмінним у порівнянні з ПІУМ-групою. За дії інших препаратів також спостерігалось відновлення пізнавальної активності, хоча рухова активність несуттєво знижувалась.

3.2.3. Показники карбонільно-окисного стресу у плазмі крові

Результати визначення показників КОС представлені у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Показники карбонільно-окисного стресу, активність АсАТ та рівень глюкози у щурів з ПІУМ (M±m, n=10)

Групи тварин / Показники	Контроль	ПІУМ	ПІУМ +ОГ	ПІУМ+АГ	ПІУМ+К
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**§§§
АФГ [мкмоль/мл]	1,571±0,08	2,19±0,11***	1,75±0,04*§	1,72±0,24§	1,88±0,06*§
КФГ [мкмоль/мл]	1,46±0,11	1,71±0,07***	1,50±0,05§	1,33±0,21§§	1,54±0,08§
фКПГ [мг/мл]	0,07±0,003	0,09±0,004***	0,07±0,01§§§	0,07±0,01§§§	0,08±0,002**§
АсАТ [мкмоль/мл*год]	0,49±0,03	0,64±0,01***	0,71±0,02§§§	0,49±0,04§§	0,57±0,02§§
Глюкоза [ммоль/л]	4,71±0,57	6,03±0,63*	7,63±0,62**§	5,02±0,28§	4,91±0,29§

АФГ – альдегідфенілгідразони, КФГ – кетонфенілгідразони, фКПГ – кінцеві продукти глікації. * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,001 – відносно групи контролю; § – P<0,05, §§ – P< 0,01, §§§ – P< 0,001 – відносно групи з ПІУМ.

Як видно з наведених у таблиці 3.7 даних, рівні ТБКАП, АФГ, КФГ та фКПГ у плазмі тварин з ПІУМ збільшились відносно контрольної групи у 2,8, 1,4, 1,2 та 1,3 раза, відповідно, при чому ці зміни спостерігались на тлі нормального рівня глюкози та підвищеної активності АсАТ (P<0,001). Кореляційний аналіз показав наявність позитивного зв’язку між ТБКАП та фКПГ (r = 0,61, P <0,05).

Використання корвітину протягом 6 днів призвело до вірогідного зниження вмісту ТБКАП та фКПГ, в той час як за введення 2-ОГ відбувалось

повернення досліджуваних показників практично до контрольних значень (таб. 3.7). Характерно, що під дією цього препарату концентрація глюкози становила 7,63 ± 0,62 ммоль/л, що перевищувало таку в групі з ПІУМ.

Схожі зміни спостерігались після застосування аміногуанідину, але пізні продукти окисної модифікації білків (КФГ) були більш чутливі до дії цього препарату, свідоцтвом чого було вірогідне зниження їхнього рівня.

Дослідження впливу доксицикліну та еплеренону показало, що ці препарати також знижують рівень ОМБ. Як видно з представлених у табл. 3.8 даних, доксициклін знижує ступень окисної модифікації, не впливаючи на рівень глікемії, причому ступінь змін залежить від дози препарату.

Таблиця 3.8

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

Групи тварин / Показники	Контроль	ПІУМ	ПІУМ +Д1	ПІУМ +Д2	ПІУМ + Е
ТБК-активні продукти [нмоль/мл]	0,74± 0,09	2,09±0,11 ***	1,06±0,14 **§§§	1,28±0,18* §§§	1,26±0,12 **§
АФГ [мкмоль/мл]	1,571± 0,08	2,19±0,11 ***	1,45±0,13 §§§	1,62±0,17§	1,69±0,15 §
КФГ [мкмоль/мл]	1,46± 0,11	1,71±0,07 ***	1,41±0,05 §	1,54±0,17*	1,47±0,05 §
фКПГ [мг/мл]	0,07± 0,003	0,09±0,00 4***	0,07±0,01 §§§	0,08±0,01§	0,06±0,04 §§§
АсАТ [мкмоль/мл*год]	0,49± 0,03	0,64±0,01 ***	0,56±0,02 §§§	0,51±0,03§ §§	0,51±0,04 §§
Глюкоза [ммоль/л]	4,71± 0,57	6,03±0,63 *	6,98±0,36 **	6,32±0,56*	4,72±0,41 §§

АФГ – альдегідфенілгідразони**,** КФГ – кетонфенілгідразони, 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 ПІУМ**.**

В дозі 4,2 мг/кг доксицикліну (Д1) рівень АФГ знижувався у 1,5 раза, КФГ – у 1,2 раза; ТБКАП – у 2 рази відносно контролю. Значно менші зміни зазначених показників мали місце при застосуванні доксицикліну у дозі 16.8 мг/кг, хоча тенденція змін була схожою з дією Д1. Результати дослідження впливу еплеренону на АФГ та КФГ свідчать, що цей препарат знижує рівень пізніх продуктів ОМБ, фКПГ та нормалізує рівень глюкози.

3.2.4. Зміни показників окисної модифікації білків у серцевому м'язі

За умов ПІУМ рівень ТБКАП, фКПГ та АФГ та КФГ збільшується в усіх фракціях. Найбільш суттєве підвищення спостерігалось у цитозольній фракції для АФГ та КФГ (рис. 3.9), причому рівень ранніх форм ОМБ, а саме АФГ, збільшувався в більшій мірі ніж пізніх, тобто КФГ.

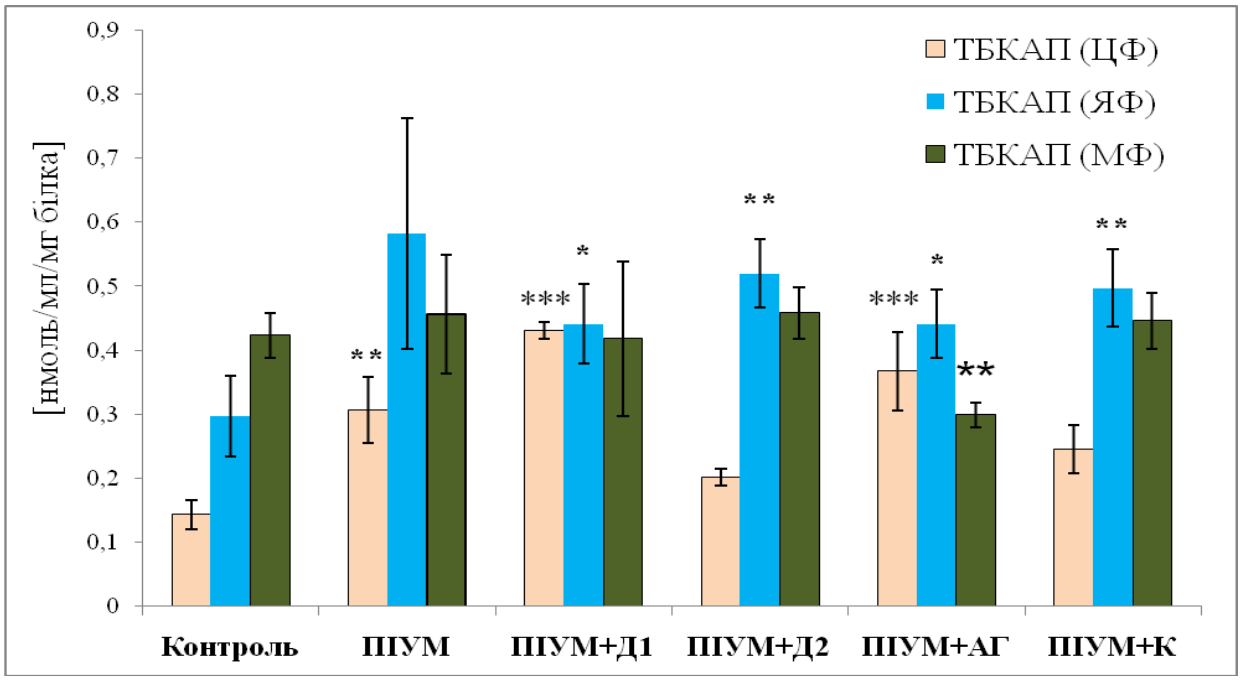

Рис. 3.9 **Рівень ТБКАП у субклітинних фракціях серця за впливу доксицикліну та антиоксидантів (M±m, n=10)**

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 ПІУМ.

В ядерній фракції зміни АФК та КФГ були недостовірними. На відміну від показників АФК та КФГ, рівень флуоресціюючих кінцевих продуктів глікації більше зростав у ядерній фракції, що може пояснюватись додатковим внеском ДНК-флюоресценції.

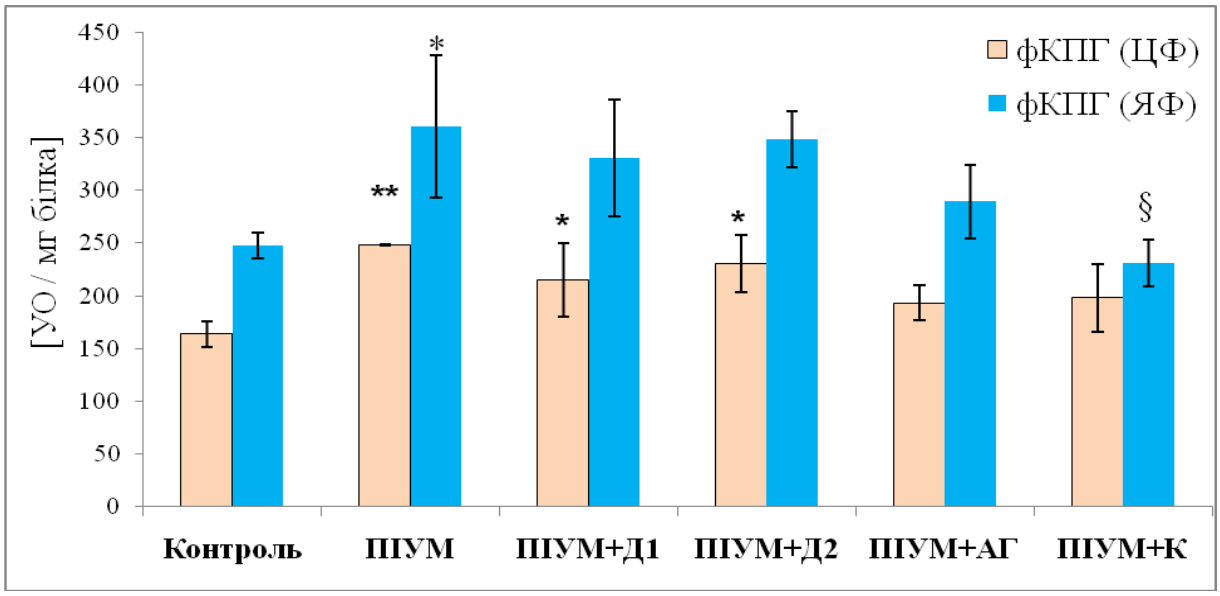

Рис. 3.10 **Рівень фКПГ у субклітинних фракціях серця за впливу доксицикліну та антиоксидантів (M±m, n=10)**

ЦФ – цитозольна фракція, ЯФ – ядерна фракція; *–P<0,05; ** –P<0,01, *** – P<0,001 – відносно до групи контролю; § –P<0,05, §§ –P<0,01– відносно до групи з ПІУМ.

Під впливом доксицикліну спостерігались різноспрямовані зміни досліджуваних показників. За дією малих доз цього препарату визначалось зменшення продуктів окисної модифікації та кінцевих продуктів глікації (рис. 3.10), 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 аміногуанідину. Зміни ТБКАП у всіх субклітинних фракціях серця під дією високих доз цього антибіотика співпали зі змінами, що спостерігались за дії корвітину (рис. 3.11).

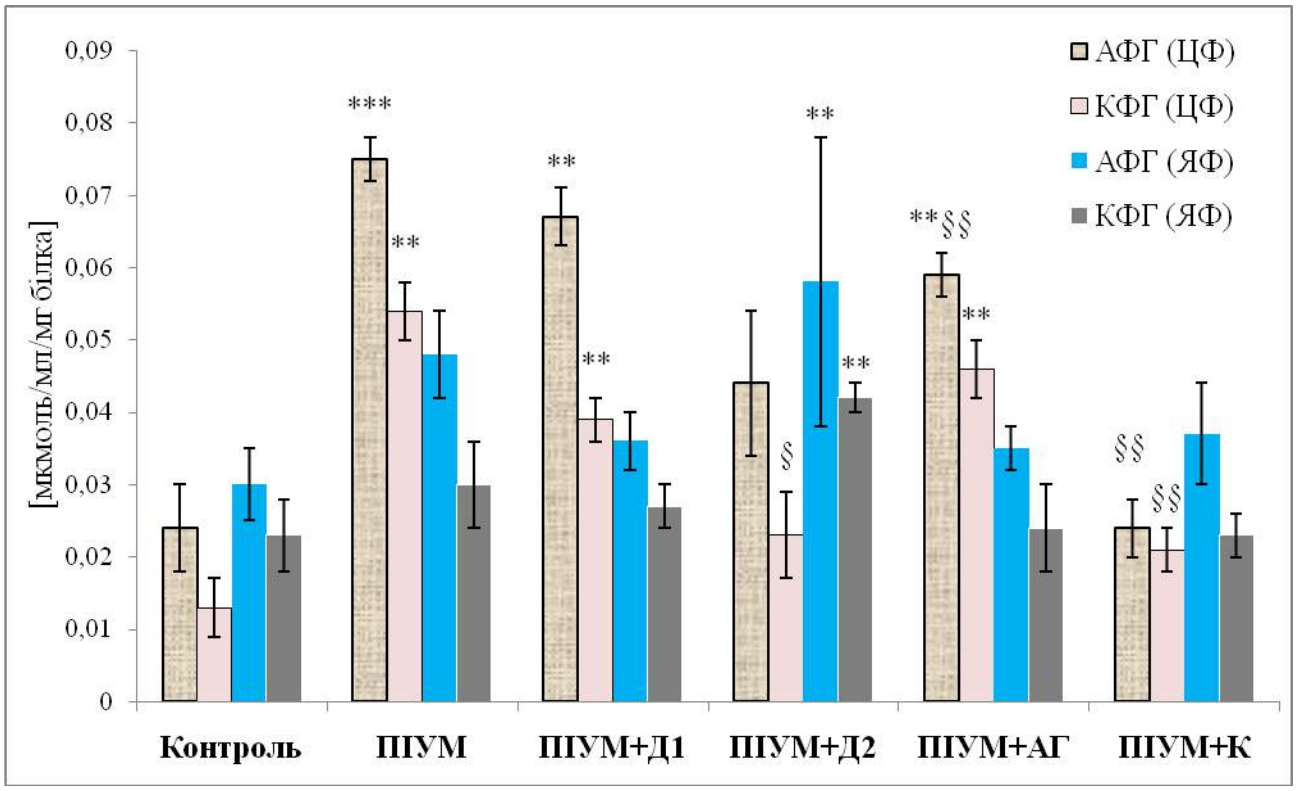

Рис. 3.11 **Показники окисної модифікації білків в цитозольній (ЦФ) та ядерній (ЯФ) фракціях міокарда (M±m, n=10)**

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

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

3.2.5. Активність ензимів антиоксидантної системи

Комбіноване введення пітуїтрину-ізопротеренолу також призводило до різних змін активності ферментів антиоксидантної системи, що представлено на рис 3.12 – 3.14. Найбільш суттєві відмінності мали відношення до ферментів, задіяних у нейтралізації пероксиду водню. Рівень каталази в плазмі крові 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.

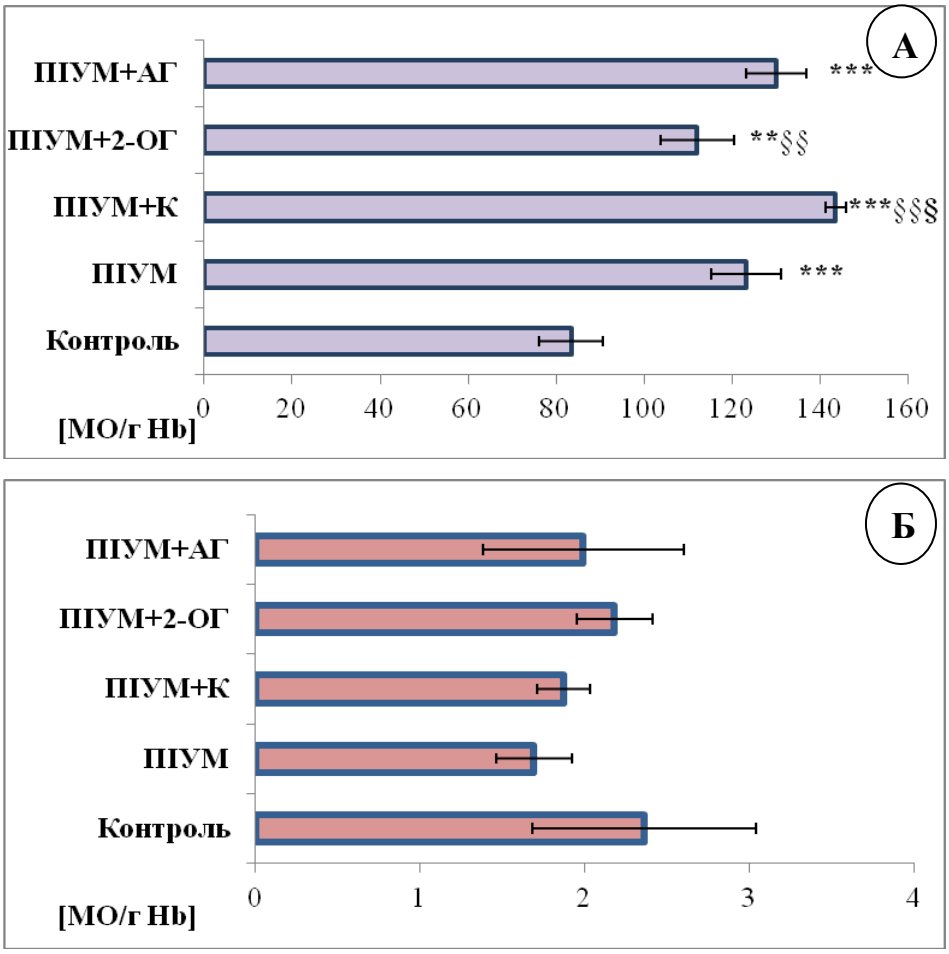

Рис.3.12. **Активність глутатіонпероксидази (А) та глутатіонредуктази (Б) у щурів з ПІУМ за впливу антиоксидантів (M±m, n=10)**

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

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

За отриманими даними, в еритроцитах щурів з ПІУМ мало місце незначне підвищення рівня СОД та зростання активності ГП на тлі несуттєвого зниження ГР (рис 3.12). Отже, відбувається підвищення швидкості утворення пероксиду водню за умов ПІУМ.

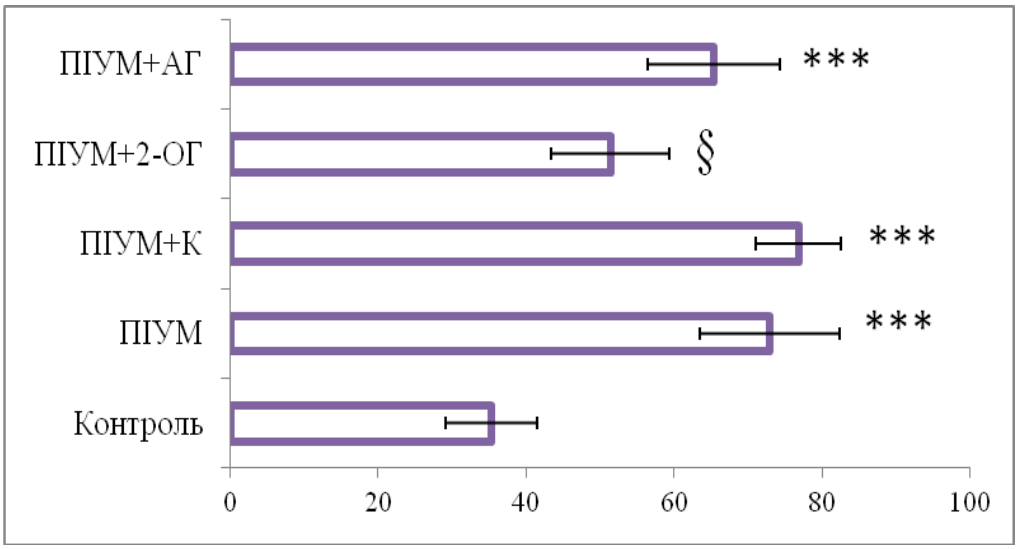

Рис. 3.13 **Співвідношення ГП/ГР**

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

§ – P<0,05відносно до групи з ПІУМ.

Вміст і активність зазначених ферментів збільшилась у тварин, які отримували корвітин у порівнянні з групою з ПІУМ, за винятком СОД, рівень якої був значно нижчим (рис. 3.14), ніж в контролі та групі з ПІУМ. Застосування 2-ОГ призводило до зниження активності антиоксидантних ензимів майже до норми. Відношення активності ГП до активності ГР (індекс ГП/ГР) було у два рази вищим у щурів з ПІУМ порівняно з контрольною групою і не змінювалось після введення К (рис 3.13). Застосування 2-ОГ призвело до зменшення індексу ГП/ГР на 30% у порівнянні з ПІУМ але значення не досягнули значень контрольної групи.

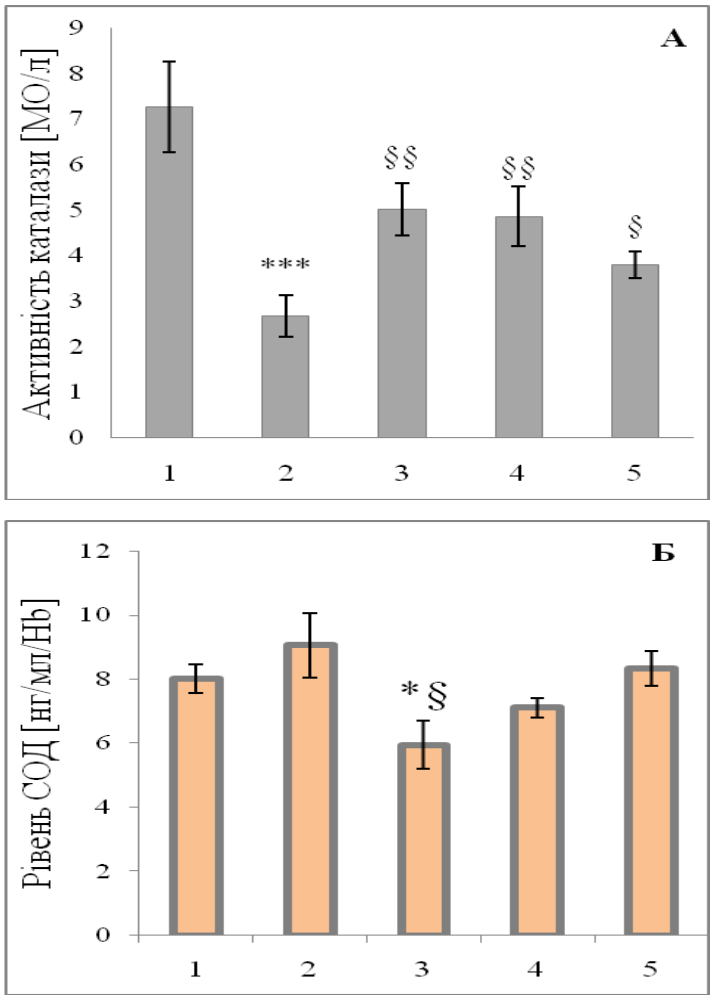

Рис. 3.14 **Зміни активності каталази (А) та СОД (Б) у щурів з ПІУМ при застосуванні антиоксидантів (M±m, n=10)**

1– контрольна група, 2 – щури з ПІУМ; 3 –ПІУМ + К; ПІУМ +2-ОГ; ПІУМ+АГ.

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

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

Характерні зміни активності ферментів АОЗ спостерігались за впливу доксицикліну та еплеренону (табл. 3.9). Застосування доксицикліну в дозі Д1 призвело до нормалізації активності ГР та СОД у еритроцитах, підвищення рівня каталази у 2 рази у порівнянні з групою ПІУМ. Активність ГП у цій групі збільшилась на 70 % та 14 % відносно контрольної групи та групи з ПІУМ, відповідно. Для дози Д2 (16,8 мг/кг) аналогічні розрахунки становили 22 % та 85 %.

Таблиця 3.9

Вплив доксицикліну та еплеренону на активність ензимів системи антиоксидантного захисту в крові експериментальних тварин (M±m, n=10)

Групи тварин	СОД [нг/мл/Hb]	ГП [МО/г Hb]	ГР [МО/г Hb]	Каталаза у плазмі [МО/л]
Контроль	8,01±0,44	83,42±7,16	2,36±0,68	7,25±0,81
ПІУМ	9,10±0,90	123,29±7,90 ***	1,69±0,23	2,67±0,46**
ПІУМ + Е	3,8±0,54 ***§§§	124,16±8,67 ***	1,74±0,25	5,61±1,2*
ПІУМ +Д1	8,09±1,38	140,98±14,03 ***	2,31±0,88	4,32±0,21*
ПІУМ +Д2	10,05±1,54	150,35±6,98 ***§§§	1,76±0,61	3,27±0,03**

СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатіонпероксидаза, ГР – глутатіонредуктаза (еритроцити),

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

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

За результатом дослідження активності ензимів системи АОЗ проводили розрахунок індексу окисного стресу (ІОС), що запропонований S. K. Jaiswal та ін. [112], за наступною формулою: ІОС=ТБКАП/рівень (СОД+ГП+ГР), рис. 3.15.

Як видно з рис. 3.15, значення ІОС в групі тварин з ПІУМ у 2 рази перевищувало контрольні показники, а при застосуванні антиоксидантів та еплеленону поверталось до нормальних значень, причому, результати у групі, де застосовували доксициклін у малих дозах, співпадали з такими, що приймала

корвітин – класичний антиоксидант. Найбільш суттєве зниження ІОС було зафіксовано у щурів на тлі приймання аміногуанідину, що пояснюється його впливом не тільки на окисну модифікацію але й на процеси не ферментативної глікації білків.

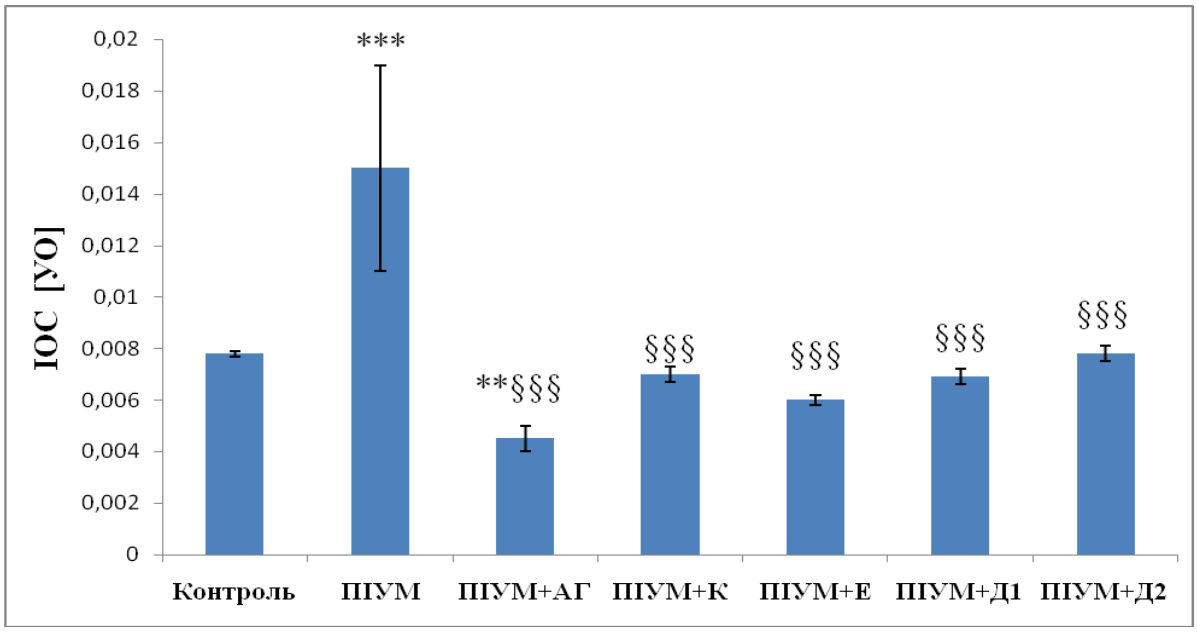

Рис. 3.15 **Індекс окисного стресу у експериментальних щурів (M±m, n=10)**
** – P<0,01, *** – P<0,001 – відносно до групи контролю;
§§§ – P<0,001 – відносно до групи з ПІУМ.

3.3. Активність матриксних металопротеїназ 2/9 у експериментальних щурів

За результатами нашего дослідження встановлено, що за умов ПІУМ у плазмі крові щурів вірогідно підвищується відносна активність зрілої та латентної форм ММП2 та спостерігається тенденція до збільшення обох форм ММП9 (рис. 3.16). Відносна активність металопротеїназ у тварин з ПІУМ варіювала у великому діапазоні. Особливо великі розбіжності спостерігались при оцінці рівня зрілих форм ММП2/9: ММП2 – від 1,19 до 3,50 УО/мг білка, ММП9 – від 1,46 до 2,51 УО/мг білка.

Отримані результатиі співпадють з даними інших дослідників стосовно підвищення експресії та активності матриксних металопротеїназ при ішемічному ушкодженні міокарда [82, 169].

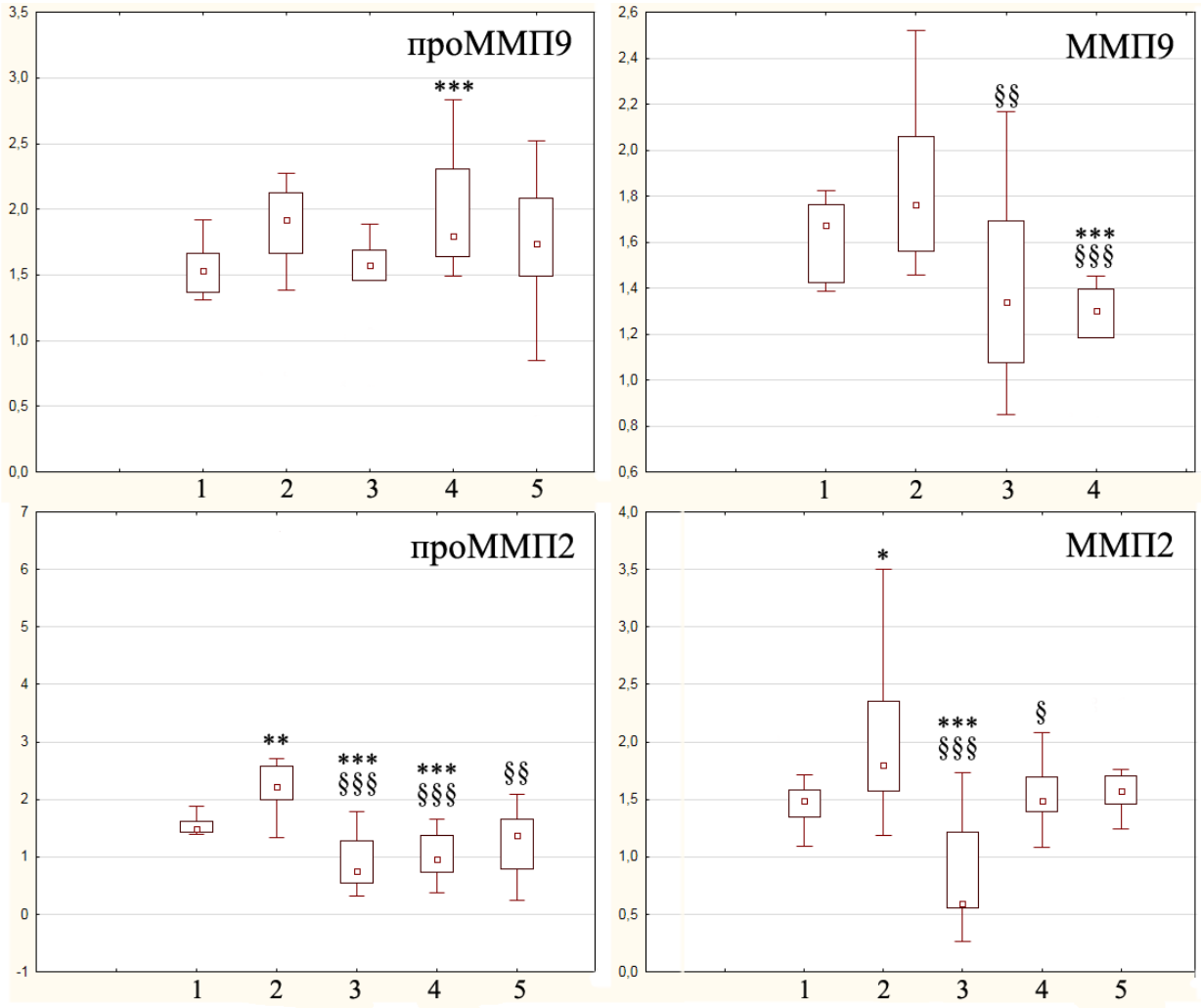

Рис. 3.16 **Активність ММП2/9 у плазмі щурів за умов ПІУМ (M±m, n=10)**
1- контроль, 2- ПІУМ, 3- ПІУМ+К, 4- ПІУМ+Д1, 5- ПІУМ+Д2.
* –P<0,05; ** –P<0,01; *** –P<0,001 – відносно до групи контролю;
§ –P<0,05, §§ –P< 0,01, §§§ –P< 0,001 – відносно до групи з ПІУМ.

Застосування корвітину після ПІУМ призводило до зниження всіх форм досліджуваних ММП, особливо значущі зміни мали місце для ММП2, активність якої була нижче контрольних значень (P<0,001). Здатність кверцетину знижувати рівень ММР2/9 та проявляти антиканцерогенний ефект

була показана раніше на лінії клітин пухлини простати [216]. Зміни рівня експресії ММР-2 та ММР-9 за впливу флавонїдів при серцево-судинної недостатності є предметом дискусії. Одні автори доводять збільшення експресії цих ензимів за дії флавоноїдів [141], але більшість дослідників стверджує, що ці препарати знижують кількість ММП2/9, впливаючи на рівень сиртуїну 1 (SIRT1), який пригнічує апоптоз клітин та фіброзування тканин [196, 222]. Отримані в нашій роботі результати узгоджуються з даними цих авторів і з нашими результатаи відносно зниження явищ некрозу у серцевому м’язі експериментальних тварин після застосування корвітину.

Зниження активності ММП2/9 визначалось також за дії доксицикліну. За отриманими даними достовірно підтверджується здатність Д пригнічувати експресію та активність проММП2 ($P< 0,001$), причому, низькі дози цього антибіотика мали більш виражений ефект, ніж високи. Інші зміни мали місце за дії Д на ММП9. Якщо латентна форма цього ензиму збільшувалась на тлі застосування малих доз Д, то зріла форма, навпаки, вірогідно знижувалась за цих умов і була нижче за контроль. За впливу високих доз Д індивідуальні значення активності проММП9 коливались у досить значних межах (від 0,42 до 3,16 УО/мг білка), зріла форма взагалі не визначалась за умов нашого дослідження. Отже високі дози Д призводять до загального зниження протеолітичної активності матрикс-деградуючих ензимів. Різниця впливу різних доз Д на ММП2 та ММП9 пояснюється їхньою тканиноспецифічністю. Відомо, що обідві желатинази розщеплюють колаген типу IV, але ММР-9 також деградує колаген типу I, III і V в інтерстиціальному просторі та перетворює мембранозв'язаний латентний TGF-β в активну форму шляхом протеолітичного розщеплення і таким чином знижує запальні процеси [159].

Враховуючи, що надмірне вироблення ММП в умовах захворювання призводить до багатьох патологічних особливостей, включаючи розпад тканин, запалення, загибель клітин і фіброз, зниження активності, але не повне

пригнічення, ММП2/9 за дії Д слід вважати фактором, що запобігає фіброзуванню тканин, в тому числі й серцевого м'яза.

3.4. AGE-R3 у плазмі крові за умов ПІУМ та за впливу кардіопротекторних препаратів

Дослідження вмісту AGE-R3 у плазмі крові експериментальних щурів за допомогою імуноблотингу з використанням специфічних антитіл до AGE-R3 та вторинних ФІТЦ-мічених антитіл показало наявність 4-х зон з молекулярною масою (ММ) 32-33 кДа, 66-70 кДа, 95-98 кДа и 120-125 кДа (рис. 3.17).

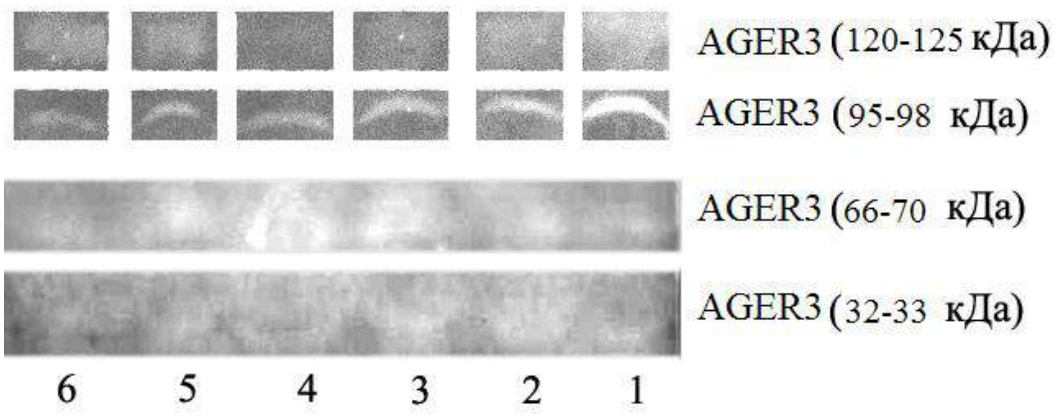

Рис. 3.17 **AGE-R3 у плазмі крові експериментальних тварин**
1– контрольна група, 2 – щури з ПІУМ; 3 – ПІУМ + К; 4 – ПІУМ + Е; 5 – ПІУМ + АГ, 6 – ПІУМ + Д1.

За різних літературних джерел в середньому молекулярна маса AGE-R3 дорівнює 29-35 кДа [147, 160, 238], тобто знайдена на блотограмі зона з ММ 32-33 кДа є мномерною формою AGE-R3. Було проведено аналіз інших зон на блотограмі відносно їх молекулярних мас, і це дозволило зробити висновок, що білки у зоні 66-70 кДа являють собою димерну форму AGE-R3, а отже 95-98 кДа – тримерна і 120-125 кДа відповідає тетрамерній формі AGE-R3.

Молекула AGE-R3 загалом складається із трьох основних частин: сфероподібного вуглеводного домену, довгого «хвосту» та амінокислотного N

кінця. Біоактивація таких рецепторів може відбутися у разі самооб'єднання між собою або самоасоціації (мультимеризації) з утворенням решіток між моно AGE-R3 [192]. Основні типи внутрішньо-молекулярних взаємодій AGE-R3 включають взаємодії між N кінцями H-доменів двох молекула, або взаємодії класичної галактозид зв'язуючої F-поверхі вуглеводних доменів між собою, і зазвичай модулюються різними лігандами. Формування таких типів олігомерних структур описано у розділі 1.3.3, рис. 1.7.

Розрахунок інтенсивності та ширини цих зон показав, що у щурів з ПІУМ змінюється кількість форм AGE-R3: 32-33 кДа AGE-R3 вірогідно зменшується, а форми 66-70 та 120-125 AGE-R3 – збільшуються. Слід відзначити, що співвідношення моно- та олігомерних форм змінюється під дією кардіопротекторних препаратів, що досліджувались в роботі (рис. 3.18).

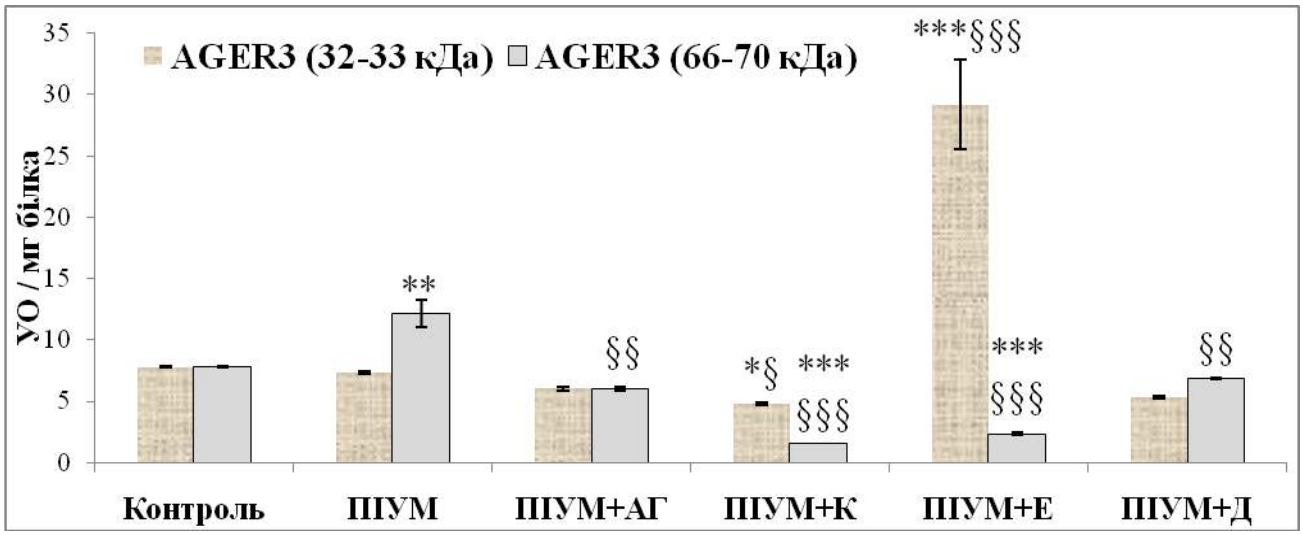

Рис. 3.18 **Моно- та димерні форми AGE-R3 у плазмі крові експериментальних тварин (M±m, n=10)**

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

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

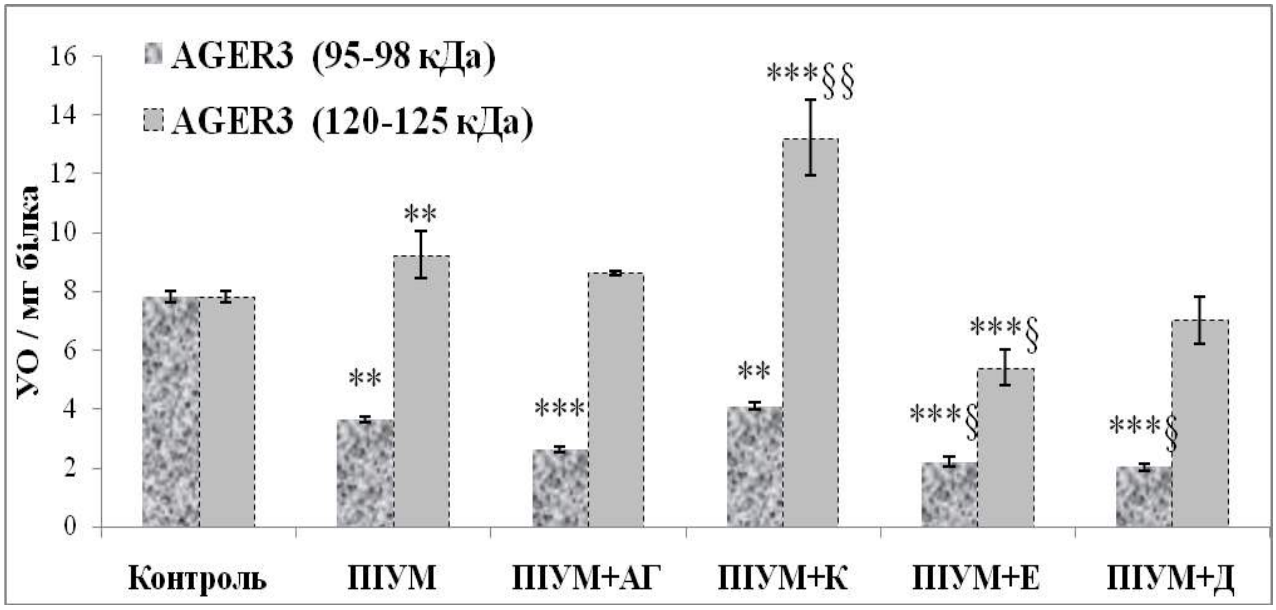

Рис. 3.19 **Олігомерні форми AGE-R3 у плазмі крові експериментальних тварин (M±m, n=10)**

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

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

Як видно з рис. 3. 19 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. Особливо різкі зміни розподілу моно- и тетрамерних форм мали місце за дії корвітину. Антагоніст альдостерону еплеренон, навпаки, підвищує вміст мономерних форм на тлі зменшення його олігомерних форм.

РОЗДІЛ 4
ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ УЗАГАЛЬНЕННЯ

4.1. Обгрунтування наявності ішемічного ушкодження міокарда у експериментальних тварин

Серцево-судинні захворювання являють собою складні мультифакторні патології, в яких задіяні як генетичні, так і екологічні чинники, що значно ускладнює профілактику, діагностику та прогнозування цих захворювань у людини. Тваринні моделі, які надають важливу інформацію про патофізіологію цих захворювань, були визнані важливими інструментами для оцінки нових терапевтичних стратегій, прогнозування перебігу та попередження цих патологічних станів. Найчастіше для дослідження метаболічних порушень за ішемії міокарда використовують моделювання цього стану у щурів за допомогою хірургічних, фармакологічних або електричних маніпуляцій. Кожна із запропонованих моделей має свої переваги та недоліки.

У дослідженні було використано дві фармакологічні моделі експериментальної ішемії міокарда – адреналінова та пітуїтрин-ізадринова. Перша з них заснована тому факті, що гіперкатехолемія є одним з основних патогенетичних чинників розвитку як стресового, так і ішемічного ушкодження міокарда. Відомо, що тривала активація симпатичної нервової системи та підвищення рівня катехоламінів є факторами, які впливають на виживаність та якість життя людини після гострого ІМ [92]. Порушення серцевої функції внаслідок гіперсекреції адреналіну відіграють важливу роль у розвитку постінфарктного ушкодження міокарда. Втім, молекулярні механізми, що лежать в основі змін міокарда в результаті викиду адреналіну та подальшої реперфузії після гострої ішемії, залишаються, в основному, непомітними. Однією з основних причин клітинного ушкодження за цих умов вважається

ініціація катехоламінами перекисного окиснення ліпідів, обумовленого підвищенням АФК, та перепрограмування експресії генів у кардіоміоцитах [85, 227].

Аналіз ЕКГ показав, що щоденне підшкірне введення 0,1 % розчину адреналіну в дозі 0,2 мг/100 г маси тварини впродовж 10 днів викликає тахікардію та зміни електричної активності серцевого м’яза, аналогічні тим, що мають місце при гострому інфаркті міокарда у людини. Ці зміни спостерігаються на тлі підвищення рівня глюкози та активності аспартатамінотрансферази у плазмі крові, що підтверджує наявність ішемічного ушкодження міокарда. Слід підкреслити, що аналіз фізіологічних та біохімічних показників проводився через 6 днів після закінчення ін’єкцій адреналіну. Підвищення рівня глюкози у експериментальних щурів може свідчити про активацію глюконеогенезу та постачання глюкози в серце, але ушкоджені кардіоміоцити не застосовують це джерело енергії в повному обсязі.

Застосування корвітину призводить до відновлення функціонального стану серця, рівня глюкози та активності АсАТ, водночас як прийом високих доз доксицикліну не призводить до повного відновлення стану міокарда.

Друга фармакологічна модель експериментальної ішемії міокарда, що застосовувалась для дослідження окисної модифікації протеїнів та шляхів її запобігання, заснована на комбінованому введенні коронароспастичного агента пітуїтріну (фармакологічна форма вазопресину) та ізопротеренолу, який є агоністом β-адренорецепторів [2]. Фармакологічна індукція серцевого ураження введенням ізопротеренолу (ізопреналіну) була вперше запроваджена Багдоном та його колегами ще в 1963 році, але й досі у різних модифікаціях широко застосовується при дослідженні кардіопротекторних препаратів [100, 137, 228]. Механізми, запропоновані для пояснення ушкодження міокарда, викликаного ізопротеренолом, різноманітні та охоплюють генерацію цитотоксичних вільних радикалів внаслідок дисбалансу між потребою серця у

кисні та його постачанням, активацію пероксидації мембранних фосфоліпідів, яка стимулює серйозні ушкодження кардіоміоцитів [57, 116].

Дослідження поведінкових реакцій експериментальних тварин у відкритому полі показало, що у них достовірно зменшується рухова та пізнавальна активність, яка обумовлена не тільки больовим синдромом, але й порушенням діяльності мозку. Аналіз літературних даних свідчить, що схожі зміни поведінки тварин мають місце за фокальної моделі церебральної ішемії [76]. Таким чином, обрані схеми експериментального ушкодження міокарда призводять до порушення кисневого забезпечення не тільки міокарда, а й мозку. У літературі розглядаються різні причини розладів мозкового кровообігу, що призводять до виражених порушень когнітивних функцій, дезадаптації та інвалідизації. Серед можливих факторів розвитку хронічної ішемії серцевого м’яза та головного мозку обговорюються такі, як накопичення прозапальних і проатерогенних окиснених ліпопротеїнів низької щільності внаслідок активації ПОЛ, збільшення фактора некрозу пухлин α, апоптозу, порушення прокоагуляційної ланки системи гемостазу та активації фібринолізу [194].

Результати гістопатологічного дослідження сердець підтверджують наявність морфологічних змін у експериментальних щурів. Так, через 6 днів після ін’єкцій пітуїтрину та ізопротеренолу у тканинах серця виявляють ознаки каріопікнозу та каріорексису, набухлість цитоплазми, фрагментацію м’язових волокон і денатурацію білка у вогнищах запалення, що свідчить про значні ураження серцевого м’яза. Зниження рівня глікогену у неушкоджених кардіоміоцитах, які залишились навколо некротичних вогнищ, узгоджується з тим, що дефіцит кисню внаслідок ішемії стимулює мобілізацію глікогену та утворення АТФ. З іншого боку, наявність реактивних запальних інфільтратів у некротичних ділянках сприяє збільшенню кількості вільних радикалів, посилюючи їхній негативний вплив. Отже, вираженість запальної реакції може свідчити про поширення некротизованих ділянок у лівому шлуночку [146, 180].

Порівняння результатів гістологічних досліджень з роботами інших авторів [61, 100, 137] показало, що обрана нами схема індукції ішемії міокарда викликає зміни у фізіологічному стані тварин та ушкодження серцевого м’яза, подібні до клінічних проявів інфаркту міокарда у людей, і супроводжується відповідними змінами в ЕКГ та гістології серця.

4.2. Розвиток карбонільно-окисного стресу та посттрансляційні неензиматичні модифікації протеїнів за експериментальної ішемії міокарда

За умов експериментальної ішемії міокарда спостерігалось підвищення рівня продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБКАП) та флуоресціюючих КПГ, причому між цими показниками визначалась кореляція в обох використаних моделях (r = 0,65 при застосуванні адреналінової моделі, r = 0,6 при моделюванні ПІУМ). Слід зазначити, що за умов обох моделей визначалось незначне підвищення рівня глюкози. Відомо, що ТБКАП відображають концентрацію малонового діальдегіду (МДА), що утворюється внаслідок деградації нестабільних ліпідних пероксидів. Цей показник на сьогодні розглядається як стандартний маркер перекисного окиснення ліпідів, індукованого окисним стресом і є одним з важливих та незалежних предикторів коронарних захворювань [200, 221]. Насамперед АФК, кількість яких збільшується під час окисного стресу, можуть безпосередньо впливати на білки з утворенням окисно-модифікованих протеїнів, а також на цукри, фосфоліпіди та амінокислоти з утворенням карбонільних похідних (кетоамінів, кетоальдегідів та дезоксиглюкозонів), які вважаються найбільш розповсюдженим варіантом ОМБ серед яких і карбоксиметиллізин та пентазідин [17, 104].

Отже, карбонільно-окисний стрес може бути джерелом формування ОМБ, неензиматично глікованих білків та утворення кінцевих продуктів глікації, що й було підтверджено результатами наших досліджень.

Дослідження ступеня окисної модифікації білків за визначенням ранніх (альдегідфенілгідразони) та пізніх (кетонфенілгідразони) продуктів, результати якого представлені в розділі 3, показало, що за експериментальної ішемії міокарда в плазмі крові вірогідно збільшується рівень обох маркерів карбонільно-окисного стресу (табл. 3.7 та 3.8).

Враховуючи, що патогенетична роль продуктів ОМБ зумовлена їхньою гено- та цитотоксичністю, спроможністю викликати загибель клітин за типом апоптозу або некрозу [209], ми провели дослідження показників ОМБ в окремих субклітинних фракціях експериментальних тварин, результати якого наведено на рис. 3.11 (розділ 3). Дослідження показників КОС у клітинних фракціях показало, що за умов ПІУМ рівні ТБКАП, фКПГ та ОМБ збільшуються в усіх фракціях. У цитоплазматичній фракції спостерігали суттєве підвищення АФГ на фоні помірного зростання КФГ. В ядерній фракції зміни АФК та КФГ були недостовірними. Отримані результати співпадають з літературними даними, згідно якими під впливом стресу в організмі тварин різного віку відбувається зменшення активності ферментів катаболізму ендогенних альдегідів у різних тканинах та субклітинних фракціях [10, 13], що призводить до ендогенної інтоксикації і розвитку патологічного стану [38]. На відміну від АФГ та КФГ, рівень флюоресціюючих кінцевих продуктів глікації істотно зростав у ядерній фракції, що може пояснюватись додатковим внеском ДНК-флуоресценції. Слід зазначити, що у мітохондріальній фракції було зафіксовано лише незначне підвищення ТБКАП, що, на перший погляд, суперечить очікуваним змінам, адже за даними літератури, саме в мітохондріях утворюється найбільша кількість вільних радикалів, і вони є найбільш чутливими до окисного стресу [186]. З іншого боку, окисний стрес призводить до фрагментації мітохондрій, порушення структури та проникності їхніх

мембран [139], що може частково пояснювати слабку реакцію на ТБКАП у мітохондріальній фракції.

Карбонільно-окисний стрес та його негативні наслідки можуть бути результатом не тільки збільшення АФК та АКС, а й порушення активності ферментів антиоксидантної системи: СОД, каталази та системи глутатіону. За нашими даними, ішемія міокарда призводила до різноспрямованих змін активності даних ензимів.

Рівень СОД у гемолізаті еритроцитів практично не змінювався через 6 днів після завершення ін'єкцій пітуїтрін-ізопротеренолу**.** Цей фермент є першою «лінією захисту» від АФК. Під дією цього ферменту супероксидний аніон (O^{2-}), який в основному формується в дихальному ланцюзі мітохондрій, а також під дією ксантин- та НАДФН-оксидази, інактивується. Відсутність підвищення активності цього ферменту у ішемізованих щурів під час дослідження може пояснюватись тим, що значна частина O^{2-} вже інактивована в реакції дисмутації, яка може відбуватись не тільки за рахунок СОД, а й шляхом відновлення Fe^{3+} у реакції Хабер-Вайса [49]. З іншого боку слід зазначити, що активність СОД може залежати від концентрації субстрату, бо при високих концентраціях період напіввиведення супероксиду дуже короткий . – 0,05с на 0,1 мМ), при невеликих концентраціях (14 год на 0.1 nM) – довготривалий. СОД має високий показник K_M , що дорівнює приблизно – 7 х 10^9 $M^{-1}s^{-1}$, і ця реакція лімітується тільки дисмутацією між молекулами супероксиду [220].

Серед ферментів, що знешкоджують перекис водню, реєструвались різноспрямовані зміни: активність каталази в плазмі крові знижувалась майже у 5 разів, тоді як у активність глутатіонпероксидази в еритроцитах, навпаки, підвищувалась у 1,5 раза. Відомо, що активність глутатіонпероксидази превалює над іншими ферментами антиоксидантного захисту за високої, а каталаза за низької швидкості утворення перекису водню [114]. Спираючись на отримані результати, можна сказати, що ПІУМ у щурів супроводжується швидким утворенням пероксиду водню.

Також слід зазначити, що зміни активності каталази та глутатіонпероксидази можуть бути пов'язані з різною чутливістю цих ферментів до глікооксидації. Зазвичай глікаційні реакції є повільними, але в умовах карбонільно-окисного стресу, який розвивається при ішемічному стані, швидкість утворення КПГ значно збільшується і може вплинути на функціональну активність білків. Отримані результати узгоджуються з результатами інших досліджень, які демонструють високу чутливість каталази до неферментативної глікації, що призводить до зниження активності цього ферменту при старінні. На відміну від каталази, глутатіонпероксидаза має низьку чутливість до активних карбонільних сполук, тому її активність практично не залежить від віку та процесів глікації, і регулюється рівнем перекису водню [53]. За даними літератури, глутатіонпероксидаза має низьку чутливість до активних карбонільних сполук, тому її активність практично не залежить від віку та процесів глікації, і регулюється рівнем пероксиду водню [89].

Слід зауважити, що, на відміну від багатьох інших окисних посттрансляційних модифікацій, карбонілювання біомолекул є незворотним процесом, тому карбонільовані білки та ліпіди мають бути деградованими або знешкодженими шляхом метаболічних перетворень за допомогою різних механізмів детоксикації [64]. Деградація модифікованих білків залежить від активності специфічних протеаз характеру та ступеня модифікації. Відомо, що окиснені білки чутливі до деградації, тоді як карбонільовані білки формують перехресні зшивки з утворенням агрегатів, що ускладнює процес протеолізу [64, 154]. Глікооксидація може заподіяти порушення роботи протеолітичних ферментів, зниження деградації та накопичення білка в тканинах, спричиняючи їх фіброзування [230]. Показано, що глікація тіольних груп в активному центрі цистеїнових протеїназ призводить до порушення їхньої активності, контролю за укладанням та видаленням модифікованих білків з клітини [97]. У попередніх дослідженнях було встановлено зниження активності трипсиноподібних

серинових протеїназ у серцевому м’язі щурів з доксорубіциновою кардіоміопатією [11], проте за короткотривалості дослідження гістологічних ознак фіброзу міокарда не було виявлено.

Враховуючи, що окисна модифікація протеїнів з утворенням карбонільних похідних відбувається як у клітині, так і поза її межами, було проведено аналіз активності загального пулу серинових протеїназ та їхніх інгібіторів у крові щурів з експериментальною ішемією міокарда. Отримані під час дослідження результати свідчать, що за адреналінової ішемії міокарда активність трипсиноподібних ензимів практично не змінюється, але порушується протеазно-інгібіторний баланс за рахунок зміни співвідношення основних інгібіторів серинових протеїназ – α1-інгібітора протеїназ (α1-ІП) та α2-макроглобуліну (α2-МГ). Кількість α1-ІП у крові мала тенденцію до зниження, в той час як у цитоплазмі його кількість підвищувалась майже у 2 рази. Водночас рівень α2-МГ вірогідно зменшувався, що призводило до підвищення співвідношення α1-ІП/α2-МГ, яке становило 45,1, тоді як за норми – 36.2. Відомо, що α2-МГ має протизапальні властивості, отже його зниження може свідчити про розвиток запального процесу у щурів. α1-ІП1 також володіє протизапальними та захисними властивостями, нещодавно з’явились роботи, в яких доводиться антиішемічна дія цього інгібітора [205]. На даний час захисну дію α1-ІП проти ішемії/реперфузії пов’язують з інгібуванням каспази-1, що призводить до збереження життєздатності та запобігання значного ремоделювання міокарда [204].

Велику роль у процесах ремоделювання міокарда після ішемічного епізоду відіграють матриксні металопротеїнази, що відносяться до сімейства цинкових протеїназ. За результатами досліджень основних колагенолітичних ферментів ММП2 та ММП9 встановлено незначне підвищення латентних форм обох ензимів на тлі вірогідного збільшення активності ММП9 у плазмі крові щурів з адреналіновою ішемією міокарда. У гомогенаті серця, навпаки, вірогідно збільшувалась латентна форма ММП2. Подібні зміни активності

ММП2 спостерігали у плазмі щурів після моделювання ПІУМ, але підвищення цієї ММП було більш вираженим (P<0,05). Отримані дані свідчать про стимуляцію експресії досліджуваних матриксних металопротеїназ не тільки в серцевому м’язі, а й у інших клітинах. Раніше відповідний феномен було продемонстровано при дослідженні доксорубіцин-індукованої кардіоміопатії [11]. Протягом останнього десятиліття стало відомо, що ММП2 має численні внутрішньоклітинні мішені в міоцитах серця. Встановлено, що ММП2 розщеплює компоненти саркомеру. Підвищення його внутрішньоклітинної активності після ішемії-реперфузії сприяє травмі серця, тому інгібування активності цього ферменту може мати позитивний ефект. Але описані на сьогодні інгібітори ММП2/9 не отримали вагомого клінічного підтвердження [110]. Варто також зазначити, що наші результати стосовно активності ММП у крові та серці за експериментальної ішемії міокарда збігаються з результатами, отриманими під час аналогічних досліджень за церебральної ішемії [72], що є ще одним поясненням описаного в попередньому розділі порушення поведінкових реакцій експериментальних тварин.

Таким чином, корекція активності антиоксидантних ферментів, рівня інгібіторів серинових протеїназ та активності матриксних металопротеїназ може мати суттєве значення у запобіганні негативним наслідкам окисної модифікації білків.

4.3 Роль антиоксидантів та кардіопротекторних препаратів у запобіганні окисної модифікації білків

Оскільки ішемія міокарда пов'язана з генеруванням активних форм кисню (АФК) та активацією процесів окисної модифікації біомолекул, значна увага приділяється пошуку препаратів, що можуть проявляти кардіопротекторні властивості за рахунок гальмування зазначених процесів або активації знешкодження токсичних продуктів карбонільно-окисного стресу. До зазначеної групи препаратів відносяться антиоксиданти – біофлавоноїд кверцетин (скавенджер АФК), аміногуанідин (інгібітор процесу глікації), 2-оксоглутарат (метаболіт циклу Кребса). Незважаючи на велику кількість досліджень стосовно механізмів дії, роботи, присвячені впливу цих речовин на показники карбонільно-окисного стресу та шляхи їх знешкодження при ішемії міокарда, практично відсутні. Одним зі способів знешкодження ОМБ-КПГ може бути їх деградація під дією протеолітичних ферментів. За даними літератури утворення модифікованих білків призводить до активації убіквітин-протеасомної системи [202, 211]. Останнім часом з'явились нові дослідження щодо кардіопротекторної дії доксицикліну (Д). Цей тетрацикліновий антибіотик здатний інгібувати матриксні металопротеїнази та протеоліз у екстрацелюлярному матриксі. Разом з тим присутність багатозаміщеного фенольного кільця може забезпечити нейтралізацію вільних радикалів [88], відтак в роботі була висунута гіпотеза про здатність цього препарату пригнічувати КОС в залежності від дози. В кардіології широко застосовують антагоністи альдостерону, серед яких особливу увагу привертає калій-зберігаючий діуретик еплеренон (фармакологічна форма – інспра), що застосовується при лікуванні серцевої недостатності після перенесеного ІМ, проте механізм його лікувальної дії остаточно нез'ясований. Аналіз літературних даних наводить на думку, що цей препарат може впливати на

посттрасляційні модифікації, процеси сигналінгу та деградації модифікованих протеїнів [22, 23].

Отримані нами результати свідчать, що застосування аміногуанідину, 2-оксоглутарату, корвітину, доксицикліну та еплеренону за експериментальної ішемії позитивно впливає на загальний фізіологічний стан щурів, посилюючи локомоторну та дослідницьку активності, поліпшує морфофункціональні характеристики серцевого м’яза, відновлюючи параметри ЕКГ та пульсу, а також покращує гістологічну картину міокарда. Всі зазначені препарати знижували рівень ТБКАП, АФГ, КФГ та КПГ у плазмі крові щурів з індукованою ішемією міокарда, але ступінь їх відновлювальної дії відрізнялась. Серед досліджуваних антиоксидантів найбільш потужний нормалізуючий ефект на рівень вищеперелічених показників ОМБ визначено за дії аміногуанідину, що пояснюється його впливом на всі ланки розвитку карбонільно-окисного стресу та процеси сигналювання, які «запускаються» взаємодією АФК, АКС та КПГ з відповідними рецепторами [47]. Встановлено, що АГ не тільки інгібує NO-синтазу та нітрозилювання білків, а й ранні етапи неферментативної глікації, пов’язані з утворенням продуктів Амадорі [184]. Крім цього, АГ знижує стрес ендоплазматичного ретикулуму та активує процеси аутофагії модифікованих протеїнів [166].

Еплеренон та доксициклін також знижували рівень ОМБ у експериментальних щурів, причому, їх відновлювальний ефект стосовно рівня АФГ (ранні продукти ОМБ) та КПГ (друга хвиля окисної модифікації) в крові перевищував ефекти антиоксидантів. Слід зазначити, що еплеренон проявляв більш виражені властивості за знешкодженням карбонілів у порівнянні з корвітином, майже не впливаючи на рівень глюкози. Отримані результати збігаються з роботами інших дослідників, згідно яких у щурів з метилгліоксаль-індукованою гіпертензією та кардіоренальним ушкодженням спостерігали зниження рівня Nε-карбоксиетиллізину (нефлюоресціююча форма КПГ) після застосування блокатора рецептора ангіотензину II кандесартану [71].

Відновлювальна дозозалежна дія доксицикліну підтверджена за результатами дослідження рівня ОМБ та ТБКАП у субклітинних фракціях серцевого м'яза. За дією малих доз цього препарату визначалось зменшення продуктів окисної модифікації та кінцевих продуктів глікації, 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 аміногуанідину. Зміни ТБКАП у всіх субклітинних фракціях серця під дією високих доз цього антибіотика співпали зі змінами, що спостерігались за дії корвітину (розділ 3.2.4). Слід відзначити, що доксициклін має багатозаміщене фенольне кільце з багатьма гідроксильними групами, тобто за будовою він частково схожій з антиоксидантом кверцетином, що є діючою речовиною корвітину. Така структура може обумовлювати здатність цього препарату нейтралізувати вільні радикали. Було показано, що реакція фенольного кільця з вільним радикалом породжує фенільний радикал, який стає відносно стабільним і неактивним [88]. Саме цим пояснюється знайдене нами повернення до нормальних значень рівня ТБКАП у цитозольній фракції під дією високих доз доксицикліну.

Досліджувані в роботі антиоксиданти та кардіопротекторні препарати впливали не тільки на рівень ОМБ та КПГ, але й проявляли регулювальний вплив щодо активності антиоксидантних ферментів. Під дією корвітину активність практично всіх досліджуваних ферментів АОС збільшувалась, за винятком СОД, рівень якої знижувався до значень, значно нижчих за контроль. Такі результати пояснюється особливостями дії біофлавоноїду кверцетину, що є активною речовиною корвітину. У деяких дослідженнях звертають увагу на те, що ефект кверцетину залежить від дози, тривалості використання, типу та ступеня ушкодження клітин. У дозах від 10 до 100 ммоль/л цей флавоноїд діє як скавенджер АФК, але сам кверцетин при цьому окиснюється, тому його дія згодом зменшується [132, 149]. Під час наших досліджень у першій день застосовували дозу 81,6 ммоль, потім по 54,4 ммоль протягом наступних двох днів і 27,2 ммоль впродовж останніх двох днів. В цілому тварини отримували

велику дозу корвітину, тому, незважаючи на поступове зменшення кількості ін'єкцій, концентрація цього флавоноїду зберігалась досить високою, що забезпечувало його антиоксидантний ефект.

Вплив аміногуанідину та 2-ОГ на активність досліджуваних ферментів був подібним до дії корвітину. Слід зазначити лише різницю в активності глутатіонзалежних ферментів: корвітин сильніше вплинув на активність глутатіонпероксидази, а 2-ОГ – на активність глутатіонредуктази. Отже, співвідношення ГП/ГР під впливом корвітину було в 2 рази вищим за норму, тоді як під дією 2-ОГ цей показник зменшувався до майже нормальних значень. За даними літератури, збільшення рівня глутатіонпероксидази під впливом кверцетину в різних патологічних умовах, пов'язаних з розвитком окисного стресу, може бути результатом індукції цього ферменту [48]. Механізми дії 2-ОГ у тканинах обговорюються в межах збільшення продукування NO, АТФ та ЦТК-метаболітів і функціонування глутамат-глютамінового циклу під впливом цього препарату. Нещодавні дослідження показали, що 2-ОГ модулює активність антиоксидантних ферментів і стабілізує окисно-відновлювальний гомеостаз [55, 133, 225, 234]. Niemiec et al. представили дані, що демонструють позитивний ефект лікування Ca^{2+}-2-ОГ на еластичність судин у мишей з ознаками атеросклерозу [156]. У наших дослідженнях активність ГП і ГР визначалась в еритроцитах, метаболізм яких обмежений внаслідок відсутності клітинних органел, насамперед мітохондрій та ядер. ТСА-реакції та глутамат-глютаміновий цикл не проходять в цих клітинах, а отже, зміни активності антиоксидантних ферментів під дією екзогенного 2-ОГ, швидше за все, обумовлені його здатністю знижувати утворення АФК та окисну модифікацію протеїнів.

Дослідження впливу еплеренону на активність ензимів АОС показало, що його ефекти схожі з такими корвітину. Результати дослідження свідчать, що введення еплеренону впродовж 6 днів після ішемічного епізоду у експериментальних щурів не впливає на активність ГП, рівень цього ензиму

залишається помірно високим відносно контролю, в той час як рівень СОД, навпаки, знизився у порівнянні з контрольною групою. Цей факт можна пояснити тим, що еплеренон, як і корвітин, може бути скавенджером АФК, у тому числі, й супероксидного аніону. В літературі ми не зустріли даних стосовно такого механізму дії еплеренону. Цей результат узгоджується з гіпотезою про те, що еплеренон покращує серцеву функцію через його антиоксидантний ефект, знешкоджуючи карбонільні похідні білків, а також здатний, певною мірою, інгібувати утворення супероксиду та гідроксильних радикалів, що може пояснювати окремі механізми його кардіотерапевтичної дії [74].

Застосування доксицикліну також призводило до змін активності ферментів АОС. На відміну від корвітину та еплеренону, цей антибіотик нормалізував активність СОД та ГР, але вірогідно підвищував активність ГП, активність якої збільшувалась в 1,7-1,8 раза відносно норми, та в 1,1-1,2 раза перевищувала значення у щурів з пітуїтрин-ізадриновою ішемією міокарда. Антиоксидантні властивості застосованих в роботі препаратів підтверджені розрахунками індексу окисного стресу (рис. 3.15), згідно яким ІОС в групі тварин з ПІУМ у 2 рази перевищувало норму, а при застосуванні антиоксидантів, еплеренону та доксицикліну поверталось до нормальних значень. Вагоме зниження ІОС спостерігалось на тлі застосування аміногуанідину, що пояснюється його впливом не тільки на окисні, але й на карбонільні радикали.

Підсумовуючи результати проведеного дослідження, можна зробити наступний висновок. Досліджувані в роботі препарати запобігають розвитку карбонільно-окисного стресу та посттрансляційній неензиматичній модифікації білків шляхом зниження АФК та КПГ, регуляції протеазно-антипротеазного балансу та активності ферментів АОС.

4.4. Олігомеризація AGE-R3 у щурів з експериментальною ішемією міокарда

Окисна модифікація та глікація протеїнів призводять не тільки до змін їхніх структурно-функціональних властивостей, але й зумовлює взаємодію з рецепторами, наслідком чого може бути активація або інгібування окремих сигнальних механізмів, процесів деградації та елімінації білків. Відомо, що КПГ-модифіковані протеїни є лігандами для цілої низки рецепторів, серед яких найбільш вивченими є RAGE (receptor for advanced glycation end products).

Ці рецептори присутні на поверхні клітин практично всіх тканин: вони знайдені в клітинах м’язів, серця, печінки, мозку, легень, нирок, тимуса і панкреатичної залози. Мембранні форми RAGE виявлені на плазматичних мембранах моноцитів, макрофагів, проксимальних трубчастих клітинах, подоцитах і мезангіальних клітинах. Розчинні RAGE є основними ОМБ-зв'язуючими молекулами, які сприяють виведенню продуктів ОМБ і запобігають таким чином їх накопиченню. Крім цього, значну роль у поглинанні та деградації ОМБ відіграють олігосахарилтрансферази сімейства AGE-R [152, 160, 195].

Серед рецепторів КПГ та ОМБ особливої уваги заслуговує галектин-3, або AGE-R3. Цей галактозо-специфічний лектин має широкий спектр біологічних функцій, які по-різному проявляються в залежності від тканинної та внутрішньоклітинної локалізації. Внутрішньоклітинний AGE-R3 знаходиться, головним чином, в цитоплазмі та ядрі і здатний, крім зв’язування КПГ, регулювати клітинний цикл, реплікацію та апоптоз [111, 117, 203, 233]. Позаклітинний AGE-R3 за походженням є внутрішньоклітинним, але, взаємодіючі з різними компонентами екстрацелюлярного матриксу, набуває нових функцій. Він модулює процеси, що пов’язані із функціонуванням серцево-судинної системи: ремоделювання серцевого м’яза та формування глікокаліксу судин [163, 185, 198, 235], тромбоутворення [164, 183], агрегацію

моноцитів та інших клітин [147]. В нормі вміст AGE-R3 у серцевому м’язі дуже низький, але за патологічних станів його рівень збільшується, тому цей показник широко використовується в кардіології як маркер хронічної серцевої недостатності, фіброзу міокарда і прогнозу несприятливого перебігу ІМ з високим ризиком кардіоваскулярних подій та смерті. Однак відомостей стосовно взаємозв’язку AGE-R3 з рівнем КПГ за серцево-судинної патології не знайдено, хоча такі дані можуть мати велике значення в діагностиці і моніторингу ефективності терапевтичних заходів у хворих після гострого ІМ.

Дослідження вмісту AGE-R3 за допомогою імуноблотингу показали, що в плазмі крові циркулюють декілька форм цього лектину з молекулярними масами 32-33 кДа, 66-70 кДа, 95-98 кДа и 120-125 кДа відповідно (див. рис. 3.17, розділ 3). Літературні джерела вказують на те, що молекулярна маса AGE-R3 становить від 29 до 35 кДа в залежності від походження та виду тварин: відповідно даним з сайту UniProtKB – P08699 (LEG3_RAT) у щурів його молекулярна маса становить 35 кДа [237]. Отже, наведені вище молекулярні маси відповідають моно-, ди-, три- та тетрамерним формам AGE-R3. Отримані результати узгоджуються з запропонованими в літературі даними, згідно з якими мономерний AGE-R3 підлягає фізико-хімічним модифікаціям, що збільшують діапазон його біологічної функціональності, особливо позаклітинної. Найважливішим механізмом, що веде до активації AGE-R3, є самооб'єднання (мультимеризація) та утворення решіток з цього галектину [192].

Денситометричний аналіз блотограм показав, що за ПІУМ змінюється співвідношення цих форм: кількість мономерних форм зменшується, а тетрамерних, навпаки, збільшується (рис.3.18 та 3.19, розділ 3). Оскільки олігомеризація AGE-R3 відбувається за умов збільшення їхнього вмісту та активується після його взаємодії з лігандами [86], є всі підстави припустити, що збільшення концентрації КПГ за експериментальної ішемії міокарда

призводить до збільшення експресії [43, 44], олігомеризації, надходження до кровотоку рецепторів типу AGE-R3 та активації процесів елімінації КПГ.

Таке припущення узгоджується з результатами наших досліджень щодо впливу різних кардіопротекторних препаратів на розподіл моно- та олігомерних форм AGE-R3. Як було показано в розділі 3.2, під дією корвітину достовірно збільшується кількість тетрамерних форм, в той час як під дією еплеренону різко збільшується вміст мономерів AGE-R3. Очевидно, корвітин, відомий як потужний антиоксидант, не тільки нейтралізує активні форми кисню, а й сприяє елімінації КПГ після їх взаємодії з рецепторами, в той час як еплеренон не викликає олігомеризації AGE-R3, а, скоріше, підсилює їхню експресію. Така гіпотеза вимагає подальшого підтвердження, однак наведені в роботі результати досліджень дозволяють по-новому розглядати роль AGE-R3 у патогенезі серцево-судинних захворювань і оцінювати рівень цього лектиноподібного рецептора при серцево-судинних захворюваннях. Слід зауважити, що подібні дослідження проведені вперше, в літературі немає свідоцтв відносно впливу фармакологічних препаратів на процеси олігомеризації AGE-R3.

Особливості активації галектину-3 та його олігомеризації, ймовірно, слід враховувати при дослідженні вмісту цього лектину. Найчастіше визначення концентрації AGE-R3 здійснюють за методом ELISA на мікропланшетах за допомогою мікропланшетів з використанням специфічних антитіл, при цьому не враховується ступінь його олігомеризації, а, відповідно, й активації. Як випливає з результатів наших досліджень, це може вносити похибку в інтерпретацію отриманих даних. Особливої уваги потребує обрання методу визначення AGE-R3 при оцінюванні процесів фіброзування тканин, в тому числі й процеси постінфарктного ремоделювання серцевого м’язу [185].

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

протеазно-інгібіторний баланс у крові та серці. В 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 КПГ і перерозподіл моно- та олігомерних форм AGE-R3 під впливом різних за механізмом дії кардіопротекторних препаратів свідчить, що їхня терапевтична дія значною мірою обумовлена гальмуванням карбонільно-окисного стресу та прискоренням видалення продуктів неферментативної модифікації протеїнів. Узагальнююча схема отриманих в роботі результатів представлена на рис. 4.4.

Згідно отриманих результатів використання адреналіну, пітуїтрину, ізадрину призводило до стану експериментальних тварин, подібного до ішемії/реперфузії у людини. За цих умов відбувається гіперпродукція активних форм кисню, підвищується швидкість вільнорадикального окиснення ліпідів клітинних мембран та генерація активних карбонільних сполук, тобто розвивається карбонільно-окисний стрес, внаслідок чого відбувається утворення окисно модифікованих білків - альдегід- та кетонфенілгідразонів, кінцевих продуктів глікації. Накопичення ОМБ може не тільки змінювати властивості протеїнів, а й запускати окремі механізми сигналінгу через взаємодію з рецепторами RAGE та AGE-R3, які призводять до зміни у транскрипції генів та процесів деградації у клітині.

Позаклітинне накопичення ОМБ продуктів може зазнавати дії ензимів протеазно-інгібіторної ланки, що забезпечують деградацію модифікованих білків позаклітинного матриксу.

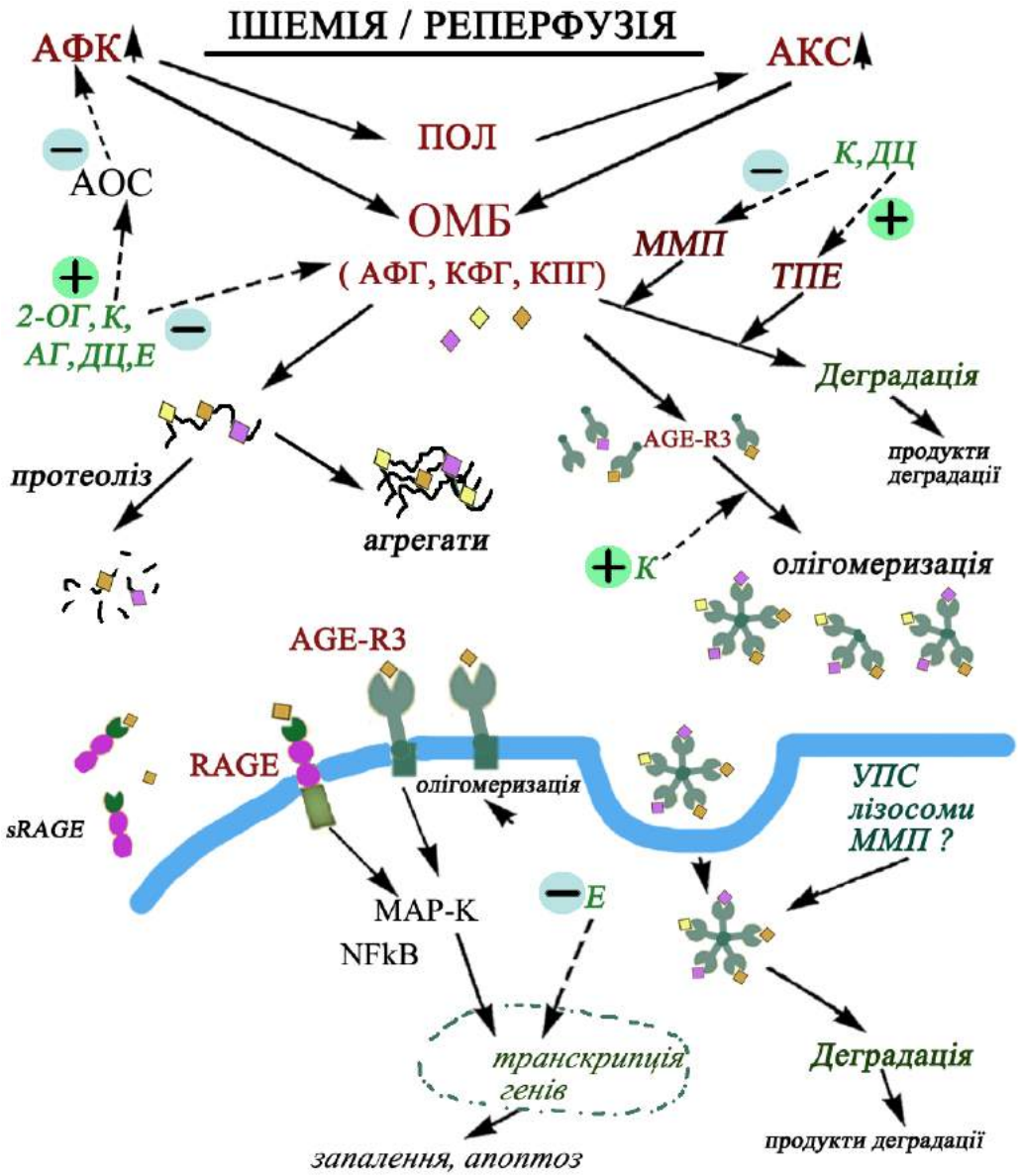

Рис. 4.4 **Узагальнююча схема утворення продуктів ОМБ та шляхів запобігання їх негативним наслідкам**.

Стрілки – метаболічні шляхи; стрілки пунктиром – шляхи запобігання. Плюс – активація, мінус – репресія. АОС – антиоксидантна система, АГ – аміногуанідин, К – корвітин, 2-ОГ – 2-оксоглутатат, Д – доксициклін, Е – еплеренон.

Карбонілювання білків є незворотньою модифікацією, а утворені продукти ОМБ підлягають протеолітичної деградації та видаленню утворених фрагментів. Накопичення модифікованих білків призводить до їх само-

асоціації з утворенням великих агрегатів, які не піддаються дії ензимів протеолітичної ланки, така реакція призводить до порушення структури та функцій білків, тканин та ЕПР.

Взаємодія циркулюючих рецепторів з ОМБ-лігандами призводить до олігомеризації AGE-R3 з утворенням ди-, три-, тетра-, пентаметрів. Новоутворені комплекси можуть поглинатись клітинами шляхом ендоцитозу, після чого відбувається їх деградація під дією внутрішньоклітинних протеаз і виведення залишків. Оскільки AGE-R3 можуть також знаходитись на мембрані клітин, зв'язування з лігандами може запускати каскад внутрішньоклітинного сигналінгу, а одже активацію запалення та індукцію апоптозу.

Використані в роботі різні лікарські засоби проявляють свої кардіопротекторні властивості на різних етапах метаболічних шляхів ОМБ-продуктів. Антиоксиданти (2-ОГ, АГ, К), антибіотик Д та антагоніст альдостерону Е, здатні пригнічувати утворення і токсичний вплив ОМБ-продуктів, активувати ензими антиоксидантної системи, та трипсиноподібні ензими, сприяють олігомеризації AGE-R3, що призводить до активації процесів елімінації ОМБ-продуктів.

ВИСНОВКИ

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

1. Відтворення адреналінової та пітуїтрин-ізадринової 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 раза), альдегід- та кетонфенілгідразонів (у 1,5 та 1,2 раза, відповідно), кінцевих продуктів глікації (у 2 рази), причому, ці зміни мають місце за відсутності гіперглікемії. Наявність кореляції між ТБКАР та КПГ (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 знайдені для ферментів, що знешкоджують пероксид водню. Активність каталази знижувалась у 2-3 рази, в той час як активність глутатіонпероксидази підвищувалась у 1,5 раза, а індекс окисного стресу підвищувався у 1,9 раза.
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 разів та зменшується рівень α2-макроглобуліну, тоді як у серцевому м'язі, навпаки, збільшується активність проММП2 у 1,6 раза та рівень α1-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 галектину-3:

зменшується кількість мономерних форм на тлі вірогідного підвищення ди- та тетрамерних (P<0,01), що свідчить про активацію взаємодії цього скавенджер-рецептора з КПГ 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 відновлююча 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 активуючі 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 олігомерізації рецепторів до кінцевих продуктів глікації типу AGE-R3.
8. Уперше показано, що під дією антиоксидантів та доксицикліну знижується кількість всіх форм AGER-3, за виключенням тетрамерної, кількість якої вірогідно підвищується, навіть у порівнянні з ішемізованими тваринами. На основі отриманих даних запропонована узагальнююча схема утворення окисномодифікованих білків за ішемії міокарда та шляхів запобігання їхньому негативному впливу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Беленичев И. Ф. Роль окислительной модификации белков в когнитивно-мнестических нарушениях у крыс, подвергшихся острому иммобилизационному стрессу / И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // Запорожский медицинский журнал. – 2005. – №3 (30). – С.125.
2. Беленичев И. Фармакологическая коррекция нарушений в сопряженных системах NO-свободные тиолы при экпериментальном инфаркте миокарда с помощью метаболитотропного кардиопротектора “лизиний” / И.Ф. Беленичев, Л.И. Кучеренко, и др. // Экспериментальная и клиническая физиология и биохимия. – 2012. – №2. – С. 7-11.
3. Бєленічев І.Ф. Антиоксидантна система захисту організму / І.Ф. Бєленічев, Е.Л. Левицький, Ю.І. Губський, С.І.Коваленко, О.М. Марченко // Сучасні проблеми токсикології. – 2002. – №2. – С. 1-10.
4. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон – М.: Высшая школа – 1991. – 352с.
5. Бурлака А.П. Вплив комплексу попередників і модулятора біосинтезу убіхінона на систему церулоплазмін – трансферин, вільно радикальне окислення ліпідів і білків та активність матриксних металопротеїназ у крові тварин за введенням доксирубіцину / А.П. Бурлака, О.Б. Кучменко, Д.М. Петухов, І.І. Ганусевич, і др. // Медична хімія. – 2012. – Т. 14, № 3. – С.11-15.
6. Васенина Е.Е. Окислительный стресс в патогенезе нейродегенеративных заболеваний: возможности терапии / Е.Е. Васенина, О.С. Левин // Современная терапия в психиатрии и неврологи. – 2013. – №3-4. – С. 39-46.
7. Васильев В.С. Способ определения каталазы в плазме крови / В.С.Васильев, Г.К. Новицкий [и др.] // Патент № 1622821, Институт

биохимии АН БССР и Гродненский государственный медицинский институт. Лабораторное дело. – 1988, – №1. – С.16-19.

8. Веремеенко К. М. Протеолиз в норме и при патологи / К. М. Веремеенко, О. П. Голобородько, А. И. Кизим. – Киев: Здоров'я. – 1988. – 200 с.
9. Гандзюк В. А. Динаміка захворюваності та поширеності хвороб системи кровообігу серед населення України на сучасному етапі: національний та регіональний аспекти / В. А. Гандзюк //Вісник соц. гігієни та організації охорони здоров'я України. – 2014. – № 2 (60). – С. 74-78.
10. Грабовецкая Е. Активностьэнзимов утилизации альдегидов в сердце крыс разного возраста при иммобилизационном стрессе / Е.Р. Грабовецкая, В.В. Давыдов //Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, №1.– С. 99-104.
11. Гордієнко Ю. А. Зміни фізіологічних біохімічних показників ферментів у щурів з доксорубіцин-індукованою кардіопатією на тлі застосування препаратів з антиоксидантною дією / Ю. А. Гордієнко, Я. В. Бакланова, М.В. Коваленко, Л. М. Степченко, А.І. Шевцова, Г.О. Ушакова // Біологія тварин. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 74-79.
12. Губский Ю. И. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский [и др.] // Совр. пробл. токсикологии. – 2005. – Т. 8, №3. – С. 20–27.
13. Давыдов В.В. Карбонильный стресс как неспецифический фактор патогенеза / В.В. Давыдов, А.И. Божков // Журнал НАМН України. – 2014. – Т. 20, № 1. – С. 25-34.
14. Долженко В. Н. Сравнительная характеристика профилактики сердечнососудистых заболеваний в Украине и Европе по данным Euroaspire IV6госпитальная линия [Текст] / В. Н. Долженко, М. Н. Коваленко, Е. Г. Несукай, Я. С. Дьяченко // Артериальная гипертензия . – 2016. – № 1. – С.29-34.

15. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О.Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.]. // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, №1. – С. 24-26.
16. Дубинина Е. Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, №6. – С.5-18.
17. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина.- СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006. - 400 с.
18. Дяченко Ю. Синдром no-reflow як наслідок пізньої госпіталізації для проведення перкутанної реперфузії міокарда / Ю. Дяченко, Д. І. Онофрейчук, М.Ю. Соколов // Український кардіологічний журнал. – 2016. – №5. – С.55-63.
19. Егорова М. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические примеры / М. В. Егорова, С. А. Афанасъев // Сибирский мед журнал. – 2011. – Т.26(1), № 1. – С. 22-28.
20. Занозина О. В. Возможности коррекции окислительного стресса у больных сахарным диабетом с помощью дибикора / О.В. Занозина // Фарматека. – 2010. – №16. – С. 51-54.
21. Каркищенко Н. Н., Грачев С. В. Руководство для лабораторных животных и альтернативные модели в биомедицинских технологіях. М.: Профиль, 2010. – 358 с.
22. Кисельов С. М. Вплив діуретиків з антіальдостероновою дією на стан міжклітинного матриксу та раннє постінфарктнеремоделювання лівого шлуночка хворих на Q-інфаркт міокарда/ С. М. Кисельов // Запорізький мед. журнал. – 2015. – №4 (91). – С. 26–30.
23. Кожухов С. Н. Научные доказательства эффективности эплеренона у больных с дисфункцией левого желудочка: от инфаркта миокарда к

сердечной недостаточности / С.Н. Кожухов, А.Н. Пархоменко // Український кардіологічний журнал. – 2015 – №1. – С.105-111.

24. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. Дело. –1988. –№1. – С.16-19.
25. Костюк В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А. И. Потапович, И.Б. Афанасьев // Вопросы медицинской химии. –1990. – Том.36, №2. – С. 88-91.
26. Лапшина Л. А. Оксидативный стресс при острой сердечной недостаточности и роль антиоксиданта кверцетина в его коррекции / Л.А.Лапшина, В.И. Золотайкина // Международный Медицинский журнал. –2009. – Т.15, № 3. – С. 45-51.
27. Лозінська Л. М. Біологічні аспекти неензиматичного глікозилювання / Л. М. Лозінська, Г. М. Семчишин. // Укр. біохім. журн. – 2012. – Vol.84, № 5.– P.16-37.
28. Лущак В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма / В.И. Лущак // Биохимия.- 2007. – Т. 72, Вып. 8. – С. 995-1017.
29. Муравлева Л. Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л. Е. Муравлева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2010. – №1. – С.74-78.
30. Овсяннікова Л. М. Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гемостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС / Л.М. Овсяннікова, С. М. Альохіна, О. В. Дробінська [та ін.] // Методичні рекомендації. К.: Вид. «Чорнобильінтерінформ», 1999. – 18с.
31. Пархоменко А. Н. Жизнеспособный миокард и кардиоцитопротекция: возможности метаболической терапии при острой и хронической формах

ишемической болезни сердца // Укр. мед. часопис. – 2001. – №3 (23). – С. 5–11.

32. Потяженко М. М. Ефективність антагоністів альдостерону у хворих на інфаркт міокарда, ускладнений гострою лівошлуночковою недостатністю, та збереженою систолічною функцією лівого шлуночка / М. М. Потяженко, І. Н. Скрипник, К. Е. Вакуленко, [та ін.] // Артериальная гипертензия. – 2018. – № 2 (58). – С. 52–57.
33. Пупышев А. Б. Пермеабилизация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор / А. Б. Пупышев // Цитология. – 2011. – Т. 53, №4. – С. 313-324.
34. Разыграев А. В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) / А. В. Разыграев // Клинико-лабораторный консилиум. – 2004. – №. 44. – С.19-22.
35. Слесарчук В. Нейропротекторные свойства препаратов кверцетина / В. Слесарчук // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014.– №6(41). – С. 11-18.
36. Тарасова К. В. Хроноінотропні реакції ізольованого папілярного м’яза лівого шлуночка серця старих щурів в умовах ішемії міокарду та при дії нових активаторів К АТФ каналів – фторвмісних аналогів діазоксиду / К. В. Тарасова, Т. С. Лагодич, І. М. Карвацький // Медична наука України. – 2015. − Т. 11, № 1-2, − С.5-12.
37. Турпаев К. Т. Сигнальная система Keap1-Nrf2. Механизм регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений / К. Т. Турпаев // Биохимия.– 2013.– Т.78, Вып.2. – С. 147-166.
38. Федоров С. В. Корекція ендогенної інтоксикації при серцевій недостатності / С. В. Федоров // Світ медицини та біології. – 2014. – №4(47).- С. 66-68.

39. Хидирова Л. Д. Изменение баланса между активностью перекисного окисления липидов, антиоксидантной защитой и содержанием железа у крыс при экспериментальном инфаркте миокарда / Л. Д. Хидирова // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. –2010. – № 6(2). – С. 216-219.
40. Хушматов Ш. С. Сравнительное изучение инотропной и антиаритмической активности флавоноидов — кверценина, рутина и (+) -катехина / Ш. С. Хушматов, Р. Р. Махмудов, С. М. Мавлянов // Российский кардиологический журнал. – 2015.– Vol. (11). – P. 35-41.
41. Цвях О. О. Оксидативний стрес у тканинах шлунка щурів при моделюванні гастропатій на тлі нестачі та надлишку мелатоніну / О. О. Цвях, Л. Д. Чеботар // Буковинський медичний вісник. – 2016. – Том 20, № 3(79). – С. 190-196.
42. Шебеко С. К. Експериментальне дослідження впливу препарату «Диклокор» на показники функціонального стану міокарда щурів за умов фуразолідон – ізадринового ураження / С. К. Шебеко, О. С. Рускін // Клінічна фармація. - 2016. - З 1. - С. 49-53.
43. Шевцова А. І. Неферментативна модифікація білків та рівень галекину-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.
44. Шевцова А. І. Роль інгібіторів циклооксигеназ та антиоксидантів у збереженні гомеостазу екстраклітинного матриксу серця / А. І. Шевцова, Ю. А. Гордієнко // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Вип. 73. – С. 240-244.
45. Шевцова А.І. Пат. 116929 UA, МПК G 01 N 1/00, 21/39, 21/64, 33/49 Спосіб визначення флуоресціюючих 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.: іл.

46. Шевцова А. І. Пат. 83196 UA, МПК G 01 N33/49 Спосіб визначення желатиназ у плазмі крові / А. І. Шевцова, Ю.А. Гордієнко, О. Е. Шаульська, А. С. Скоромна; заявник та патентовласник ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ Україні» – заявл. 26.03.13; опубл. 27.08.13, Бюл. № 16. – 4 с.: іл.
47. Abraham P. Aminoguanidine, a selective nitric oxide synthase inhibitor, attenuates cyclophosphamide-induced renal damage by inhibiting protein nitration and poly (ADP-Ribose) polymerase activation / P. Abraham, S. Rabi // Chemotherapy. – 2011. – Vol.57(4). – P. 327-234.
48. Almaghrabi O. A. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney / O. A. Almaghrabi //Saudi J Biol Sci. – 2015. – Vol.22(2). – P. 227-31.
49. Anthonymuthu S.T. Therapies Targeting Lipid Peroxidation in Traumatic Brain / Anthonymuthu S. T., E. M. Kenny, H. Bayır // Injury Brain Res. – 2016. – Vol.1640(Pt A). – P. 57-76.
50. Aronson D.Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes / D. Aronson // J Hypertens. – 2003. –Vol. 21(1). – P. 3-12.
51. Banfi C. Oxidized proteins in plasma of patients with heart failure: role in endothelial damage / C. Banfi, M. Brioschi, S. Barcella, F. Veglia // Eur J Heart Fail. – 2008. – Vol.10(3). – P.244-51.
52. Bancroft J., Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques, 2nd Ed, NY: Churchill-Livingstone. –1998.– P.187-188.
53. Bakala H, Hamelin M, Mary J, Borot-Laloi C, Friuet B. Catalase, atarget of glycation damage in rat liver mitochondria with aging. Biochim Biophys Acta. – 2012 .– Vol. 1822(10). – P. 1527-34.

54. Bayeva M. Mitochondrial dysfunction and oxidative damage to sarcomeric proteins / M. Bayeva, H. Ardehali // Curr. Hypertens. Rep. – 2010. – Vol.12. – P.426–432.
55. Bayliak M. M. Alpha-ketoglutarate enhances freeze-thaw tolerance and prevents carbohydrate-induced cell death of the yeast Saccharomyces cerevisiae / M. M. Bayliak, O. V. Hrynkiv, R. V. Knyhynytska, V. I. Lushchak // Archives of Microbiology. – 2018. – Vol. 200 (1). – P. 33-46.
56. Baraibar M. A. Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging / M.A. Baraibar, R. Ladouce, B. Friguet // Journal of Proteomics. – 2013. – Vol.92. – P. 67-70.
57. Bahorun T. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease / T. Bahorun, M.A. Soobrattee, V. Luximon-Ramma, O.I. Aruoma // InternetJ Med. Update. – 2006.– Vol.1.–P. 1-17.
58. Boguszewska-Mańkowska D. Protein Oxidation and Redox Regulation of Proteolysis / D. Boguszewska-Mańkowska, M.Nykiel, B. Zagdańska // Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. – 2015. www.intechopen.com/books/basic-principles-and-clinical-significance-of-oxidative-stress.
59. BoltonW. K. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy / W. K. Bolton, D. C. Cattran, M.E. Williams, S. G. Adler, G. B. Appel, K.Cartwright, [et al.] // AmJNephrol. – 2004. – Vol.24(1). – P. 32-40.
60. Bradford M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
61. Brady S. Cardiac Troponin I in Isoproterenol-Induced Cardiac Injury in the Hanover Wistar rat: studies on low dose levels and routes of administration / S. Brady, M. York, C. Scudamore, T. Williams, W. Griffiths, J. Turton // Toxicol Pathol. – 2010. – Vol.38(2). –P. 287-91.

62. Bryan J. How spironolactone became the next best thing for severe heart failure / J. Bryan // The Pharmaceutical Journal. – 2012. – Vol. 288. –P. 88-93.
63. Cai Z. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health / Z. Cai, L.J. Yan // Journal of Biochemical and Pharmacological Research. – 2013. – Vol.1,№1. – P. 15-26.
64. Catalgol B. Turnover of oxidatively modified proteins: the usage of in vitro and metabolic labeling / B. Catalgol, T. Grune // Free Radic Biol Med. – 2009. – Vol.46(1). – P. 8-13.
65. Cerisano G. Early short-term doxycycline therapy in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction to prevent the ominous progression to adverse remodelling: the TIPTOP trial / G Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti, R. Sciagrà, et al. // Eur Heart J. – 2014. – Vol.35(3). – P. 184-91.
66. Cerisano G. Effects of a timely therapy with doxycycline on the left ventricular remodeling according to the pre-procedural TIMI flowgrade in patients with ST-elevation acute myocardial infarction / G. Cerisano, P. Buonamici, R. Valenti, Moschi G., E. Taddeucci , L. Giurlani [et al.] // Basic. Res. Cardiol. – 2014.– Vol.109(4).– P. 412.
67. Čolak E. New markers of oxidative damage to macromolecules / E. Čolak // JMB. – 2008. – Vol.27. – P. 1-16.
68. Cozza G. Glutathione peroxidase 4-catalyzed reduction of lipid hydroperoxides in membranes: The polar head of membrane phospholipids binds the enzyme and addresses the fatty acid hydroperoxide group toward the redox center / G. Cozza, M Rossetto, V. Bosello-Travain, M Maiorino, A. Roveri, S. Toppo, M. Zaccarin , L. Zennaro, F. Ursini // free Radic Biol Med. – 2017.– Vol.112.– P. 1-11.
69. Cortes A. Protective outcomes of low-dose doxycycline on renal function of Wistar rats subjected to acute ischemia/reperfusion injury / A. Cortes, Gonsalez

S, L. Rioja, S. Oliveira, et al.// Biochim Biophys Acta. – 2018.– Vol. 1864(1) – P.102-114.

70. Chan W. H. Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2 / W. H. Chan, H. J. Wu, N. H. Shiao // J. Cell. Biochem. – 2007. – Vol. 100. – P. 1056-1069.
71. Chen X. Carbonyl stress induces hypertension and cardio–renal vascular injury in Dahl salt-sensitive rats / X. Chen, T. Mori, Q. Guo, et al. // Hypertension Research. – 2013. – Vol. 36. – P. 361-367.
72. Chen X. Ischemic-reperfusion injury increases matrix metalloproteinases and tissue metalloproteinase inhibitors in fetal sheep brain / X. Chen, A. Patra, G. B. Sadowska, B.S. Stonestreet // Dev Neurosci. – 2018. – Vol.40(3). – P. 234-245.
73. Chen J. Advanced glycation endproducts induce apoptosis of endothelial progenitor cells by activating receptor RAGE and NADPH oxidase/JNK signaling axis / J. Chen, J. Jing, Sh.Yu, M. Song, H. Tan, B. Cui, L. Huang //Am J Transl Res. – 2016. – Vol.8(5). – P. 2169–2178.
74. Chen H. Eplerenone-Mediated Aldosterone Blockade Prevents Renal Fibrosis by Reducing Renal Inflammation, Interstitial Cell Proliferation and Oxidative Stress / H. Chen, F. Sun, X. Zhong, Y. Shao, A. Yoshimura, Y Liu // Kidney Blood Press Res. – 2013. – Vol.37. – P. 557-566.
75. Chen C.H. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart / C.-H. Chen, G.R. Budas, E.N. Churchill, M.-H. Disatnik, T.D. Hurley, D. Mochly Rosen, // Science. – 2008.– Vol. 321. – P. 1493–1495.
76. Cheng L.J. Effects off luvastatin on characteristics of stellateganglionneuronsin a rabbit model of myocardial ischemia / L.J. Cheng, G.P. Li, J. Li, Y. Chen, X.H. Wang // ChinMed J. – 2016.– Vol.129(5). –P. 549–56.

77. Cheng M. α-ketoglutarate attenuates ischemia-reperfusion injury of liver graft in rats / M. Cheng, D. Cao, Y. Chen, J. Li, B. Tu, J. Gong // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2019. – Vol.111. –P. 1141-1146.
78. Chouchani E.T. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS / E.T. Chouchani, V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević // Nature. – 2014. – Vol.515. – P.431-435.
79. Ching-Lian Chen. Functions of VPA1418 and VPA0305 Catalase Genes in Growth of Vibrio parahaemolyticus under Oxidative Stress / Ching-Lian Chen, Shin-yuan Fen, Chun-Hui Chung, Shu-Chuan Yu, Cheng-Lun Chien, Hin-chung Wong // Applied and Environmental Microbiology. 2016. – Vol. 82, №6. – P. 1859-1867.
80. Chuang C. Y. Oxidation and modifi cation of extracellular matrix and its role in disease / C. Y. Chuang, G. Degendorfer, M. J. Davies // Free Radical Research. − 2014. − Vol.48(9). − P.970-989.
81. Cohen-Or I. Metabolism of AGEs – bacterial AGEs are degraded by metallo-proteases / I. Cohen-Or,C. Katz,E. Z. Ron // PLo SOne. – 2013. – Vol. 8(10). – P. e74970.
82. DeLeon-Pennell K. Y. Matrix Metalloproteinases in Myocardial Infarction and Heart Failure / K. Y. DeLeon-Pennell, C. A. Meschiari, M. Jung, M. L. Lindsey // Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. − 2017.− Vol.147. – P. 75-100.
83. Deluyker D. Advanced glycation end products (AGEs) and cardiovascular dysfunction: focus on high molecular weight AGEs / D. Deluyker, L. Evens, V. Bito // Amino Acids. – 2017. – Vol.49(9). – P. 1535-1541.
84. Deluyker D. Pyridoxamine improves survival and limits cardiac dysfunction after MI / D. Deluyker, V.Ferferieva, R.B. Driesen, M.Verboven, I. Lambrichts, V. Bito // Sci Rep. –2017– Vol.7. – P.16010.
85. Deten A. Norepinephrine-induced acute heart failure in transgenic mice over expressing erythropoietin / A. Deten, J. Shibata, D. Scholz, W. Briest, K.F Wagner, R. H. Wenger, H-G Zimmer // Cardiovascular Research. – 2004. – Vol.61(1). –P. 105-114.

86. Dings R.P.M. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention / R.P.M. Dings, M.C. Miller, R.J. Griffin, K.H. Mayo // Int J Mol Sci. – 2018. – Vol.19, №3. – P. pii: E905.
87. Drechsler C. Galectin-3, Renal Function, and Clinical Outcomes:Results from the LURIC and 4D Studies / C. Drechsler, G. Delgado, C.Wanner, K. Blouin, S. Pilz, A. Tomaschitz, M.E. Kleber, A. Dressel, C. Willmes [et al.] // J Am Soc Nephrol. – 2015. – Vol.26(9). – P. 2213-2221.
88. Elewa M. Hepatoprotective and anti-tumor effects of targeting MMP-9 in hepatocellular carcinoma and its relation to vascular invasion markers / M. Elewa, M. Al-Gayyar, M. Schaalan, K. Abd El Galil [et al.] // Clin Exp Metastasis. – 2015. – Vol. 32(5). – P. 479–93.
89. Espinosa-Diez C. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress / C. Espinosa-Diez, V. Miguel, D. Mennerich, T. Kietzmann, P. Sánchez-Pérez, S. Cadenas, S. Lamas // Redox Biology. – 2015. – Vol. 6. – P. 183-197.
90. Feeney M.B. Tyrosine modifications in aging / M.B. Feeney, C. Schwneich // Antioxid Redox Signal. – 2012. –Vol. 17, № 1. – P. 1571-1579.
91. Frohnert B.I. Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance / B.I. Frohnert, D.A. Bernlohr // Advances in Nutrition. – 2013. – Vol.4, Issue 2. – P. 157-163.
92. Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of anupdated model. J AmCollCardiol. – 2009. – Vol.54. – P. 375-385.
93. Fernandes R. Human salivary α-amylase (EC.3.2.1.1) activity and periodic acid and schiff reactive (PAS) staining: A useful tool to study polysaccharides at an undergraduate level / R. Fernandes, R. Correia, R. Fonte // Biochemistry and Molecular Biology Education. – 2006. – Vol.34, № 4.– P. 294–299.
94. Gao P. Galectin-3: its role in asthma and potential as an anti-inflammatory target / P. Gao, J. L. Simpson, J.Zhang, P.G. Gibson // Respir Res. − 2013−Vol. 14(1) – P.136.

95. Godfrey L. Arginine-directed glycation and decreased HDL plasma concentration and functionality / L. Godfrey, N. Yamada-Fowler, J. Smith, P.J. Thornalley, N. Rabbani // Nutr Diabetes. – 2014. – Vol. 4. – P. e134.
96. Goth L. A. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range / L. A. Goth // Clinica Chimica Acta. – 1991. – Vol.196, № 2-3. – P. 143-151.
97. Gordiienko Iu.A. Activity of trypsin-like enzymes and gelatinases in rats with doxorubicin cardiomyopathy / Iu.A. Gordiienko, Ya.V. Babets, A.O. Kulinich, A.I. Shevtsova, G.O. Ushakova // Ukr Biochem J. – 2014. – Vol.86(6). – P. 139-46.
98. Gkogkolou P. Advanced glycation end products / P. Gkogkolou, M. Böhm // Dermatoendocrinol. – 2012. – Vol. 1, № 4(3). – C. – 259-270.
99. Gugliucci A. Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases / A. Gugliucci // Adv Nutr. – 2017. – Vol.8(1) – P. 54-62.
100. Hassan Q. Edaravone, apotent free radical scavenger and a calcium channel blocker attenuate isoproterenol induced myocardial infarction by suppressing oxidative stress, apoptotic signaling and ultra structural damage / Q. Hassan, S. Akhtar [et al.] // Ther Adv Cardiovasc Dis. – 2016. – Vol.10(4). –P. 214-223.
101. Hanssen N.M. Higherlevels of advanced glycation end products in human carotid atherosclerotic plaques are associated with a rupture-prone phenotype. / N.M. Hanssen, K. Wouters, S.M. Huijberts, M.J. Gijbels, [et al.] // EurHeartJ. – 2014. – Vol. 35(17). – P. 1137-46.
102. Halade G.V. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: A proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation / G.V. Halade, J. Yu-Fang, M. L. Lindsey // Pharmacology & Therapeutics. – 2013. – Vol.139, Issue 1. – P. 32-40.
103. Halliwell B. Free radical in Biology and Medicine / B. Halliwell, M.C. Yutteridge. – Oxford: Clarendon Press. – 1999. – 320 p.

104. Hauck A.K. Oxidative stress and lipotoxicity / A.K. Hauck, D.A. Bernlohr // J Lipid Res. –2016. – Vol.57, №11. – P. 1976-1986.
105. Hartog J.W. Effects of alagebrium, an advanced glycation endproduct breaker, on exercise tolerance and cardiac function in patients with chronic heart failure / J.W. Hartog, S. Willemsen, D.J. van Veldhuisen, J.L. Posma, L.M. van Wijk [et al.] BENEFICIAL investigators // Eur J Heart Fail. – 2011. – Vol.13(8). – P. 899-908.
106. He L. Prevention of Oxidative Stress by α-Ketoglutarate via activation of CAR signaling and modulation of the expression of key antioxidant-associated eargets in Vivo and in Vitro / L. He, J. Wu, W. Tang, X. Zhou, Q. Lin, F. Luo, Y. Yin, T. Li // J. Agric. Food Chem. – 2018.– Vol. 66(43). – P. 11273-11283.
107. Hwa-Young K. Methionine sulfoxide reductases: selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals / K. Hwa-Young, V.N. Gladyshev // Biochemical Journal. – 2007. – Vol.407(3). – P. 321-329.
108. Hwang S.H. Anti-glycation, carbonyl trappingand anti-inflammatory activities of chrysin derivatives / S.H. Hwang, H.Y. Kim, G. Zuo, Z. Wang, J.Y. Lee, S.S. Lim // Molecules. – 2018. – Vol. 23(7). – P. E1752.
109. Höhn A. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. / A. Höhn, T. Jung , T. Grune // Free RadicBiol Med. – 2014. – Vol. 71. – P. 70-89.
110. Hughes B.G. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury / B.G. Hughes, R. Schulz // Basic Res Cardiol. – 2014. – Vol.109(4). – P. 424.
111. Iacobini C. L. Role of galectin-3 in diabetic nephropathy / C.L/ Iacobini, Amadio, G. Oddi [et al.] // Journal of the American Society of Nephrology. – 2003. – V.14(3).– P. 264–270.
112. Jaiswal S. Curcumin Mediated Attenuation of Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Brain / S. Jaiswal, A. Sharma, K. Vivek, [et al.] // Biochemistry Research International. – 2016. – Vol. 2016, № 7637931. – 7 p.
113. Kay P. Modification of peptide and protein cysteine thiol groups by conjugation with a degradation product of ascorbate / P. Kay, J.R. Wagner, H Gagnon, R.

Day, K. Klarskov // Chemical Research in Toxicology. – 2013. – Vol.26(9). – P. 1333-1339.

114. Kazimirko V.K. Maltsev VI. Antioxidant system and its functioning in the human body. HealthyUkraine. – 2006.– Vol.98– P. 21-24.
115. Katare R. Benfotiamine improves functional recovery of the infarcted heart via activation of pro-survival G6PD/Akt signaling pathway and modulation of neurohormonal response / R. Katare, A. Caporali, C. Emanueli, P. Madeddu //J Mol Cell Cardiol. – 2010. – Vol.49(4) .–P. 625-38
116. Karthikeyan K. Grape seed proanthocyanidins a meliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes: An in vivo study / K. Karthikeyan, B.R. Sarala Bai, S. Niranjali Devaraj // LifeSci. – 2007.– Vol.81.–P. 1615-21.
117. Koch A, Poirier F, Jacob R, Delacour D. Galectin-3, a novel centrosome-associated protein, required for epithelial morphogenesis / A Koch, F Poirier, R. Jacob, D. Delacour // Mol Biol Cell.– 2010. –Vol. 21.– P. 219-31.
118. Kurian G.A. The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited / G.A. Kurian, R. Rajagopal, S. Vedantham, M. Rajesh // Oxid Med Cell Longev. – 2016. – Vol.2016. – P. 1656450.
119. Kaur B.T. Implication of oxidative stress in progression of diabetic retinopathy / B.T. Kaur, I.A. Kotwani // Survey of Ophthalmology. – 2016. – Vol. 61(2). – P. 187-96.
120. Khan M.S. Oxidative Stress Mediated Cytotoxicity of Glycated Albumin: Comparative Analysis of Glycation by Glucose Metabolites. / M.S. Khan, S. Tabrez, N. Rabbani, A. Shah // JFluoresc. – 2015. – Vol. 25(6). – P. 1721-6.
121. Krofič Žel M. Plasma and Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity, Serum Selenium Concentration, and Plasma Total Antioxidant Capacity in Cats with IRISStages I–IV Chronic Kidney Disease /M. Krofič Žel, N. Tozon, A. Nemec Svete // J Vet Intern Med. – 2014. – Vol.28(1). – P. 130-136.

122. Kiyuna L.A. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities/ L.A. Kiyuna, L. A. Kiyunaa, R. P. Albuquerquea, Che-Hong Chenb, D.Mochly-Rosenb, J. C. B. Ferreira // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – Vol.129. – P. 155–168.
123. Kryl'skii E. D. Activity of glutathione antioxidant system and NADPH generating enzymes in rats with experimental rheumatoid arthritis / E.D. Kryl'skii, T.N. Popova, E.M. Kirilova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 160, Issue 1. – P. 30-33.
124. Laimoud M. Intravascular evaluation of coronary atherosclerotic lesions among Egyptian diabetic patients with acute coronary syndromes / M. Laimoud, F. Faris, H. Elghawaby // Egypt Heart J. – 2018. – Vol. 70(4). – P. 237-241.
125. Lazo M. Soluble receptor for advanced glycation end products and the risk for incident heart failure: The Atherosclerosis Risk in Communities Study / M. Lazo, M.K. Halushka, L. Shen, N. Maruthur, C.M. Rebholz, A.M. Rawlings [et al.] // Am. Heart J. – 2015. – Vol. 170(5). – P. 961-7.
126. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient / M. Lorenzi // Exp Diabetes Res. – 2007. – Vol. 2007. – P. 61038.
127. Le Winter M.M. Abundance, localization, and functional correlates of the advanced glycation end product carboxymethyl lysine in human myocardium / M.M. Winter, D. Taatjes, T. Ashikaga // Physiol Rep. – 2017. –Vol.5(20). – P. e13462.
128. Li J. Advanced glycation end-products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective / J. Li, D. Liu, L. Sun, Y. Lu, Z. Zhang // J. Neurol. Sci. – 2012. – Vol. 317(1-2). – P. 1-5.
129. Litwinoff E. Emerging Targets for Therapeutic Development in Diabetes and Its Complications: The RAGE Signaling Pathway / E. Litwinoff, C.H. Del Pozo, R. Ramasamy, A.M. Schmidt // ClinPharmacolTher. – 2015. – Vol.98(2). – P. 135-44.

130. Lim J.M. Myristoylated methionine sulfoxide reductase A is a late endosomal protein / J.M. Lim, J.C. Lim, G. Kim, R.L. Levine // JBC.–2018. – Vol.4. – P. 1-33.
131. Li X. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal / X. Li, T. Zheng, S. Sang, L. Lv // J.Agric.Food Chem. – 2014. – Vol. 62(50). – P. 12152-8.
132. Liu H. Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isopronerenol-treated rats / H. Liu, L. Zhang, S. Lu // Molecules. – 2012.– Vol. 17. – P. 4281-91.
133. Liu S. The antioxidative function of alpha-ketoglutarate and its application / S. Liu, L. He, K. Yao // Bio.Med. Research International. – 2018.– Vol. 2018, №3408467. – P. 1-6.
134. Liu G. Influence of Quercetin and Its Methylglyoxal Adducts on the Formation of α-Dicarbonyl Compounds in a Lysine/Glucose Model System / G. Liu, Q. Xia, Y. Lu, T. Zheng, S. Sang, L. Lv// J. Agric. Food Chem. – 2017. – Vol. 65(10). – P. 2233-2239.
135. Ledesma-Osuna A.I. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose / A.I. Ledesma-Osuna, G. Ramos-Clamont, L. Vázquez-Moreno // Acta bp. – 2008. –Vol. 55, № 3. – P. 491-497.
136. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4/ U.K. Laemmli / Nature. –1970. – Vol.227, №5259. – P. 680-685.
137. LoboFilho N.G. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats / N.G. Lobo Filho, N.L. Ferreira, R. Bezerra de Sousa, C. E. Rebouçasde // RevBrasCirCardiovasc. – 2011.– Vol.26(3). –P. 469-76.
138. Madian A.G. Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites / A.G. Madian, F.E. Regnier // J Proteome Res. – 2010. – Vol.9. – P. 3766-80.

139. Marin-Garcia J. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics / J. Marin-Garcia, A. Akhmedov, G.Moe// Heart Fail Rev. – 2013– Vol.18(4). – P. 439-56.
140. Marchitti S.A. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily, Expert Opin. / S.A. Marchitti, C. Brocker, D. Stagos, V. Vasiliou // Drug Metab. Toxicol. – 2008. – Vol.4.– P. 697-720.
141. Maneesai P. Hesperidin Prevents Nitric Oxide Deficiency-Induced Cardiovascular Remodeling in Rats via Suppressing TGF-β1 and MMPs Protein Expression / P. Maneesai, S. Bunbupha, P. Potue, T. Berkban, U. Kukongviriyapan, V. Kukongviriyapan, P. Prachaney, P. Pakdeechote // Nutrients. – 2018. –Vol. 10(10). – P. – 1549-1564.
142. Monnier V. M. Cross-linking of the extracellular matrix by the maillard reaction in aging and diabetes: An update on "a puzzle nearing resolution" / V. M. Monnier, G.T. Mustata, K. L. Biemel, O. Reihl [et al.] // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – Vol.1043. – P. 533-544.
143. Moriya S. Two soluble isoforms of receptors for advanced glycation end products (RAGE) in carotid atherosclerosis: the difference of soluble and endogenous secretory RAGE / S. Moriya, M. Yamazaki, H. Murakami, K. Maruyama, S. Uchiyama // J Stroke Cerebrovasc Dis. – 2014. – Vol. 23(10). – P. 2540-2546.
144. Morcos M. Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespanin Caenorhabditis elegans / M. Morcos, X. Du, F. Pfisterer, H. Hutter, A.A.R. Sayed, [et al.] // Aging Cell. – 2008. – Vol.7. – P. 260e269.
145. Menini S. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis / S. Menini, C. Iacobini, C. Ricci, C. Blasetti Fantauzzi, L. Salvi [et al.] // Cardiovasc.Res. – 2013. – Vol.100. – P. 472-480.
146. Meijer A. An enzyme histochemical study of isoproterenol-induced myocardial necroses in rats / A. Meijer, F. Hettwer, A.G. Giplea // Histochemical Journal. 1988. – Vol. 20. – P. 69-707.

147. Mina-Osorio P. A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes / P. Mina-Osorio, I. Soto-Cruz, E. Ortega // Biochem Biophys Res Commun. – 2007. – Vol.353. – P. 605–10.
148. Münch G. Determination of advanced glycation end-products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA / G. Münch, R. Keis, A. Wessels [et al.] // Eur J Clin Chem Clin Biochem. – 1997. – Vol. 35(9). – P. 669-677.
149. Nadia S.A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties / S.A. Nadia, A. Azman // Pharm Tech Res. – 2014. – Vol. 6(3). – P. 933–32.
150. Nass N. Advanced glycation end products (AGEs) in diabetes/ N. Nass, A. Simm //AHMN Endokrinologie IV_Druck.indd. – 2010. – P.63-75.
151. Nan Wu, Mingyao Yang, Uma Gaur, Huailiang Xu, Yongfang Yao, and Diyan Li. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications. Biomol. Ther. (Seoul). – 2016. – Vol. 24(1). – P. 1-8.
152. Neviere R. Implication of advanced glycation end products (Ages) and their receptor (Rage) on myocardial contractile and mitochondrial functions / R. Neviere, Y. Yu, L. Wang, F. Tessier, E. Boulanger // Glycoconj J. – 2016. – Vol. 33(4). – P.607-17.
153. Nowotny K. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus / K. Nowotny, T. Jung, A. Höhn, D. Weber, T. Grune // Biomolecules. – 2015. – Vol. 5(1) – P. 194-222.
154. NystromT. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / NystromT // EMBO J. – 2005. – Vol.24(7) – P. 1311-1317.
155. Nimse S.B. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms / S.B. Nimse, D.Pal // RSC Adv. – 2015. – Vol.5. – P. 27986-28006.
156. Niemiec T. Alpha-ketoglutarate stabilizes redox homeostasis and improves arterial elasticity in aged mice / T. Niemiec, J. Sikorska, Harrison A, et al. // J Physiol Pharmacol. – 2011.– Vol.62– P 37-43.

157. Nishizawa Y. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products and cardiovascular disease in end-stage renal disease / Y. Nishizawa, H. Koyama // J Ren Nutr. – 2008. – Vol.18(1). – P.76-82.
158. Nobecourt E. The impact of glycation on apolipoprotein AI structure and its ability to activate lecithin: cholesterol acyltransferase / E. Nobecourt, M. Davies, B.E Brown [et al.] // Diabetologia. – 2007. – Vol. 50(3). –P. 643-53.
159. Ogura Y. Therapeutic potential of matrix metalloproteinases in Duchenne muscular dystrophy / Y. Ogura, M. M. Tajrishi, S. Sato, S. M. Hindi, A. Kumar // Front Cell Dev Biol. − 2014. − Vol.2 – P. 1-11.
160. Ott C. Role of advanced glycation end-products in cellular signaling / C. Ott, K. Jacobs, E. Haucke, N.A. Santos, T. Grune, A. Simm // Redox Biol. – 2014.– Vol. 9(2). – P. 411-29.
161. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // Analytical Biochemistry. – 1997. – Vol.95, № 2. – P. 351–358.
162. Ozcinar E. Improvement of functional recovery of donor heart following cold static storage with doxycycline cardioplegia / E. Ozcinar, E.N. Okatan, E. Tuncay, S. Eryilmaz, B. Turan // Cardiovasc.Toxicol. – 2014. –14(1). – P. 64-73.
163. Ortega N. Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation / N. Ortega, D.J. Behonick, C. Colnot, D.N.W. Cooper, Z. Werb // Mol Biol Cell. – 2005.–Vol. 16.– P. 3028–39.
164. O’Sullivan JM, Jenkins PV, Rawley O, Gegenbauer K, Chion A, Lavin M, et al. Galectin-1 and Galectin-3 Constitute Novel-Binding Partners for Factor VIII / J.M. O’Sullivan, P.V. Jenkins, O. Rawley, K. Gegenbauer, A. Chion, M. Lavin [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2016. – Vol. 36. – P. 855–63.

165. Onyeagucha BC, Mercado-Pimentel ME, Hutchison J, Flemington EK, Nelson MA. S100P/RAGE signaling regulates microRNA-155 expression via AP-1 activation in colon cancer. Exp Cell Res. – 2013. – Vol.319(13). – P. 2081-90.
166. Pei Z. Inhibition of advanced glycation endproduct (AGE) rescues against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: Role of autophagy and ER stress / Pei Z, Deng Q, Babcock SA, He EY, Ren J, Zhang Y // Toxicol Lett. – 2018. – Vol.284 – P. 10-20.
167. Petrica L. Glycated peptides are associated with proximal tubule dysfunction in type 2 diabetes mellitus / L. Petrica, A. Vlad, G. Gluhovschi, A. Zamfir, C. Popescu [et al.] // Int J ClinExp Med. – 2015.– Vol.8(2). – P. 2516-2525.
168. Phaniendra A. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases /A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy // Indian J Clin Biochem. – 2015. – Vol.30 (1). – P. 11-26.
169. Phatharajaree W. Matrix metalloproteinases and myocardial infarction / W. Phatharajaree, A. Phrommintikul, N. Chattipakorn // Can. J. Cardiol. − 2007 − Vol.23(9). – P. 727-733.
170. Prisacaru A.E. Effect of antioxidants on polyunsaturated fatty acids / A.E. Prisacaru // Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria. – 2016.– Vol. 15(2). – P. 121-129.
171. Pricci F. Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end-products / F. Pricci, G. Leto, L. Amadio, C. Iacobini, G. Romeo, S. Cordone, R. Gradini, P. Barsotti, F.T. Liu, U. Di Mario, G. Pugliese // KidneyInt.Suppl. – 2000.– Vol.77.– P. 31-39.
172. Prasad K. Do statins have a role in reduction/prevention of post-PCI restenosis? // K. Prasad //CardiovascTher. – 2013.– Vol.31(1) .– P. 12-26.
173. Prasad J. Quercetin reverses hypobaric hypoxia-induced hippocampal neurodegeneration and improves memory function in the rat / J. Prasad, I Baitharu, A.K. Sharma, R. Dutta, D. Prasad, S.B. Singh // High Alt Med Biol. – 2013.– Vol.14(4) – P. 383-94.

174. Plowman J.E. Protein oxidation: Identification and utilisation of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways / J.E. Plowman [et al.] // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2013. – Vol.12,№11. – P. 1960-1967.
175. Ponikowski P. Heart failure: preventing disease and death worldwide / P. Ponikowski, S.D. Anker, K.F. AlHabib, M.R. Cowie [et al.] // ESC Hear. Fail. – 2014. – Vol.1. – P.14-25.
176. Pomatto L.C.D. The age- and sex-specific decline of the 20s proteasome and the Nrf2/CncC signal transduction pathway in adaption and resistance to oxidative stress in Drosophila melanogaster /L.C.D. Pomatto, S. Wong, C. Carney, B. Shen, J. Tower, K.J.A. Davies // Aging (Albany NY). – 2017. – Vol.9(4) – P.1153-1185.
177. Rabbani N.· Glycation of LDL by Methylglyoxal Increases Arterial Atherogenicity / N. Rabbani, L. Godfrey, M.Xue, F.Shaheen, M.Geoffrion, R.Milne, P.J. Thornalley // Diabetes. – 2011. – Vol. 60(7). – P. 1973–1980.
178. Rabbani N. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics / N. Rabbani, X. Mingzhan, P. J. Thornalley // Glycoconj J. – 2016. – Vol. 33. – P. 513–525.
179. Ramasamy R. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go / R. Ramasamy, S.F. Yan, A.M. Schmidt // AminoAcids. – 2012. – Vol. 42(4) – P. 1151–1161.
180. Rock K.L. The inflammatory response to cell death / K.L. Rock, H. Kono // Annual Review of Pathology. 2008. – Vol.3. –P. 99–126.
181. Rubenstein D.A. Glycated albumin modulates endothelial cell thrombogenic and inflammatory responses / D.A. Rubenstein, Z. Maria, W. J Yin // Diabetes Sci Technol. – 2011. – Vol. 5(3). – P. 703-13.
182. Rubenstein D.A. Combined incubation of plateletsand endothelial cells with glycated albumin: Altered thrombogenic and inflammatory responses / D.A.

Rubenstein, Z. Maria, W. Yin // DiabVasc Dis Res. – 2014. – Vol. 11(4). – P. 235-242.

183. Saint-Lu N. Identification of galectin-1 and galectin-3 as novel partners for von Willebrand factor / N. Saint-Lu, B.D. Oortwijn, J.N. Pegon, S. Odouard, O.D. Christophe, P.G. de Groot [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. –2012.– Vol. 32.– P. 894–901.
184. Sadowska-Bartosz I. Prevention of Protein Glycation by Natural Compounds / I. Sadowska-Bartosz, G. Bartosz // Molecules. – 2015. – Vol.20. – P.3309-3334.
185. Sanchez-Mas J. Galectin-3 expression in cardiac remodeling after myocardial infarction / J. Sanchez-Mas, A. Lax, M.C. Asensio-Lopez, M.J. Fernandez-Del Palacio, L. Caballero, I.P. Garrido, F. Pastor, J.L. Januzzi, D.A. Pascual-Figal // cardiology. – 2014 –Vol.172, № 1. – P.e98–e101.
186. Sawyer D. Mitochondrial oxidative stress in heart failure: "oxygen wastage" revisited / D. Sawyer, W. Colucci //Circ Res. – 2000. – Vol.86(2)– P. 119-20.
187. Seddon M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure / M. Seddon, Y.H. Looi, A.M. Shah // Heart. – 2007. – Vol.93. – P.903–907.
188. Semchyshyn H.M. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects / H.M. Semchyshyn // The Scientific World Journal. – 2014. – Vol. 417842. – P. 1-10.
189. Semchyshyn H.M. Interplay between oxidative and carbonyl stresses: molecular mechanisms, biological effects and therapeutic strategies of protection, in book: Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects / H.M. Semchyshyn, V.I. Lushchak // InTech. – 2012. – P. 15-46.
190. Shekhtman A, Ramasamy R, Schmidt AM Glycation & the RAGE axis: targeting signal transduction through DIAPH1 / Shekhtman A, Ramasamy R, Schmidt AM // Expert Rev Proteomics. – 2017. – Vol. 14(2). – P. 147-156.
191. Shimizu F. Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by

stimulating the release of TGF-β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes / F. Shimizu, Y. Sano, H. Haruki, T. Kanda // Diabetologia. – 2011. – Vol. 54(6). – P. 1517-26.

192. Suthahar N. Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. / N. Suthahar, W. C. Meijers, H. H.W. Silljé, JE Ho, Liu FT, de Boer RA. // Theranostics. – 2018. – Vol. 8(3). –P. 593-609.
193. Singh R. Advancedglycationend-products: areview / R Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin // Diabetologia. –2001. – Vol. 44(2). – P. 129-46.
194. Soufer R, Jain H, Yoon AJ. Heart-brain interactions in mental stress-induced myocardial ischemia. CurrCardiolRep. – 2009. – Vol.11(2). –P. 133-40.
195. Sorci G. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration / G. Sorci, F.Riuzzi, I. Giambanco,R. Donato // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2013. – Vol.1833, Issue 1. – P.101-109.
196. Song Y. H. Icariin attenuates cardiac remodelling through down-regulating myocardial apoptosis and matrix metalloproteinase activity in rats with congestive heart failure / Y. H. Song, H. Cai, N. Gu, C. F. Qian, S.P. Cao, Z. M. Zhao // J Pharm Pharmacol. − 2011. − Vol.63(4). – P. 541-9.
197. Smuder A.J. Crosstalk between autophagy and oxidative stress regulates proteolysis in the diaphragm during mechanical ventilation / K.J.Sollanek, W.B. Nelson, K. Min, E.E.Talbert [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – Vol.115. – P.179-190
198. Suarez G. Heart failure and galectin 3 / G. Suarez, G. Meyerrose // Ann Transl Med. –2014. – Vol. 2, №9. – P. 86-92.
199. Tam X.H.L. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes / X.H.L. Tam, S.W.M. Shiu, L. Leng, R. Bucala, D.J. Betteridge, K.C.B. Tan // Clin Sci (Lond). – 2011. – Vol. 120(2) – P. 81-89.

200. Tanaka S. Serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances are associated with risk of coronary heart diseses / S. Tanaka, T. Miki, S. Sha, K. Hirata, Y. Ishikawa, M. Yokoyama // J Atheroscler Thromb. – 2011.– Vol.18(7). –P. 584-91.
201. Taverne Y. J.H.J. Reactive oxygen species and the cardiovascular system / Y. J.H.J. Taverne, A.J.J.C. Bogers, D.J. Duncker, D.Merkus // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2013. – Vol. 2013. – №862423. – P. 1-15.
202. Teodorowicz M. Immunomodulation by Processed Animal Feed: The Role of Maillard Reaction Products and Advanced Glycation End-Products (AGEs) / M. Teodorowicz, W. H. Hendriks, H. J. Wichers, H. F. J. Savelkoul // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9(2088). – P. 1-15.
203. Testa M. The Predictive Value of Plasma Brain Natriuretic Peptide and Galectin-3 in Elderly Patients / M. Testa, G.L. Rosso, C. Ferreri, M. Feola // Heart Failure Diseases. – 2018.– Vol.6, №4. – P. pii: E88.
204. Toldo S. Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-1 and protects from acute myocardial ischemia-reperfusion injury / S. Toldo, I. M. Seropian, E. Mezzaroma, B. W. Van Tassell, [et al.] // J Mol Cell Cardiol. – 2011.– Vol.51(2). – P. 244-51.
205. Toldo S. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 is a therapeutic target in acute myocardialInfarction / S. Toldo, D. Austin, A.G. Mauro, E. Mezzaroma, [et al.] // JACC Basic Transl Sci. – 2017. – Vol.2(5). – P. 561-574.
206. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc Natl Acad Sci U S A. –1979. – Vol.76, №9.– P. 4350-4.
207. Thornalley P.J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems – role in ageing and disease / P.J. Thornalley // Drug Metabol Drug Interact. – 2008 – Vol.23(1-2). – P. 125-50.

208. Thomas F. Thioredoxins in cardiovascular disease / F. Thomas, Jr. Whayne, N. Parinandi, N. Maulik // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2015. – Vol.93(11). – P. 903-911.
209. Thomas N. Ëm Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence / N. Thomas // EMBO Journal. – 2005.– Vol.24(7). – P1311-1319.
210. Tikellis C. Dicarbonyl stress in the absence of hyperglycemia increases endothelial inflammation and atherogenesis similar to that observed in diabetes / C. Tikellis, R.J. Pickering, D. Tsorotes, O. Huet, M.E. Cooper, K. Jandeleit-Dahm, Thomas MC // Diabetes. – 2014. – Vol. 63(11). – P. 3915-25.
211. Uchiki T. Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in non diabetics) / T. Uchiki, K.A. Weikel, W. Jiao, F. Shang, A. Caceres [et al.] // Aging Cell. – 2012. – Vol.11(1). – P. 1–13.
212. Uchida Y. Cellular carbonyl stress enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in rat white adipocytes via reactive oxygen species-dependent pathway / Y. Uchida, K.Ohba, T. Yoshioka, K. Irie, T. Muraki, Y. Maru // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol.6. –P. 1-26.
213. Vasil'ev Y.V. Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: Adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification / Y.V. Vasil'ev [et al.] // Mass Spectrometry Reviews. – 2013. – Vol. 33,№ 3. – P.157-182.
214. Vasylkovska R. A. Fructose-Induced Carbonyl/Oxidative Stress in S. cerevisiae: Involvement of TOR /Vasylkovska R. A, L. M. Lozinska, H. M. Semchyshyn // Biochem Res Int. – 2016. – Vol.2016. – P. 8917270.
215. Vistoli G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation / G. Vistoli, D.D. Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini, G. Aldini // Free Radic Res. 2013. – Vol.47(1).– P. 3-27.

216. Vijayababu M. R. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3) / M.R. Vijayababu, A. Arunkumar, P. Kanagaraj, P. Venkataraman, G. Krishnamoorthy and J. Arunakaran // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2006–Vol. 287. – P. – 109–116.
217. Vlassara H. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex / H. Vlassara, Y.M. Li, F. Imani, D. Wojciechowicz, Z. Yang, F.T. Liu, A. Cerami // Mol. Med. (Cambridge, MA). – 1995. – Vol.1. – P. 634–646.
218. Wang B. RAGE deficiency alleviates aortic valve calcification in ApoE$^{-/-}$mice via the inhibition of endoplasmic reticulum stress / B. Wang , Z. Cai , B. Liu, Z. Liu, X. Zhou, N. Dong, F Li // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. – 2017 – Vol.1863(3) – P. 781-792.
219. Wang X. The proteasome-interacting Ecm29 protein disassembles the 26S proteasome in response to oxidative stress / X. Wang, I. E. Chemmama, C.Yu, A. Huszagh, Y. Xu, R. Viner, S. A. Block // J. Biol. Chem. – 2017. – Vol. 292(39). –P. 16310-16320.
220. Wang Y. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling / Y. Wang, R. Branicky, A. Noë, S. Hekimi // Journal of Cell Biology. – 2018. Vol.1.−P. 1-14.
221. Walter M. F. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: a longitudinal analysis of the PREVENT study / M. F. Walter, R. F. Jacob, B. Jeffers, Ghadanfar MM, [et al.] // RPJ Am CollCardiol. – 2004. – Vol. 44(10). – P. 1996-2002.
222. Wang Q. Flavonoid Extract from Propolis Inhibits Cardiac Fibrosis Triggered by Myocardial Infarction through Upregulation of SIRT1 /Q. Wang, X. Sui, D. Sui, P. Yang // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2018. − Vol. 2018, ID 4957573. – P. 1-15.

223. Willemsen S. Advanced glycation end-products, a pathophysiological pathway in the cardiorenal syndrome / S. Willemsen J. W. L. Hartog, M. R. Heiner-Fokkema, D. J. van Veldhuisen, A. A. Voors // Heart Fail Rev. 2012. – 17(2). – P. 221-228.
224. Wong C.M. Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling / C.M. Wong, G Bansal, L. Marcocci, Y.J. Suzuki // Redox Rep. – 2012.– Vol.17, №2. – P. 90-4.
225. Wu N. Alpha-Ketoglutarate: physiological functions and applications / N. Wu, M. Yang, U. Gaur, H.g Xu, Y. Yao, D. Li // Biomol Ther (Seoul). – 2016.– Vol.24(1). –P. 1-8.
226. Xi-zhen Fana. Effects of Doxycycline on Cx43 Distribution and Cardiac Arrhythmi Susceptibility of Rats after Myocardial Infarction / Xi-zhen Fana, Hong-jun Zhu, Xu Wu, Ji Yan [et al.] // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. – 2014. – Vol.13(2). –P. 613-621.
227. Xiao D.L. Inhibition of DNA methylation reverses norepinephrine-induced cardiachypertrophy in rats / D. L. Xiao, C. Dasgupta, M. Chen, K. Zhang, J. Buchholz, Z. Xu, L. Zhang // Cardiovascular Research. – 2014.– Vol.101. – P. 373-382.
228. Zaragoza C. Animal Models of Cardiovascular Diseases / C. Zaragoza, C. Gomez-Guerrero, J. L. Martin-Ventura, L. Blanco-Colio, B. Lavin [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2011. – Vol.2011, 497841. – P. 13.
229. Zdzisińska B. Alpha-ketoglutarate as a molecule with pleiotropic activity: well-known and novel possibilities of therapeutic use / B. Zdzisińska, A. Żurek, M. Kandefer- Szerszeń // Arch Immunol Ther Exp. –2017. – Vol.65. – P. 21–36.
230. Zannad F. Effect of MR blockade on collagen formation and cardiovascular disease with a specific emphasis on heart failure / F. Zannad, A. Radauceanu // Heart Fail Rev. - 2005. – Vol.10, Issue 1. – P. 71-78.

231. Zhang S. Advanced glycation end products influence mitochondrial fusion-fission dynamics through RAGE in human aortic endothelial cells / S. Zhang, Y.Gao, J. Wang // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2017. – Vol. 10(7). – P. 8010-8022.
232. Zhu Y. Complexity of Advanced Glycation End Products in Foods: Where Are We Now? / Y. Zhu, H. Snooks, S. Sang // J. Agric. Food Chem. – 2018– 66(6), – P. 1325-1329.
233. Yang H. Expression of galectin-3 in mouse endometrium and its effect during embryo implantation / H. Yang, C. Lei, W. Zhang // Reprod Biomed Online. – 2012.–Vol. 24. – P. 116-22.
234. Yao K. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells / K. Yao, Y. Yin, X. Li, P. Xi, J. Wang, J. Lei, Y. Hou, G. Wu // Amino Acids. –2012 – Vol. 42(6). – P. 2491-500.
235. Yu L. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis / L. Yu, W.P. Ruifrok, M. Meissner, E.M. Bos, H. van Goor // Circ Heart Fail. – 2013.– Vol.6(1) – P. 107-17.
236. Yugar-Toledo J.K. Managing resistant hypertension: focus on mineralocorticoid-receptor antagonists / J.K. Yugar-Toledo, A.P. Faria, R. Modolo, H.Moreno //Vascular Health and Risk Management. – 2017. – Vol.13. – P. 403-41.
237. UniProt KB - P08699 (LEG3_RAT) https://www.uniprot.org/uniprot/P08699.
238. www.uniprot.org/uniprot/P08699, www.abcam.com/galectin-3-antibody-a3a12-ab2785.html.