

ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
«ВЛАДИКАВКАЗСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ОТИЕВ МИХАИЛ АРАМОВИЧ

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ АФОБАЗОЛА И ЕГО КОМБИНАЦИИ С L-
АРГИНИНОМ НА СОСТОЯНИЕ ОБЩЕГО ПАТОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОЦЕССА - ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ДЕФИЦИТА
ОКСИДА АЗОТА ПРИ КОБАЛЬТОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Дзугкоев Сергей Гаврилович

Владикавказ – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. Обзор литературы.....	13
1.1. Механизмы токсического влияния хлорида кобальта на живые системы и пути его поступления.....	13
1.2. Повреждающее действие ПОЛ.....	14
1.3. Токсические влияния представителя тяжелых металлов на состояние мембранных и специфических ферментов, включая экскреторный фермент – щелочную фосфатазу.	16
1.4. Антиокислительная система клеток (АОС).....	18
1.5. Метаболизм окиси азота при экзогенной нагрузке хлоридом кобальта.....	19
1.6. Корректирующее действие фабомотизола (афобазола) в организме.....	27
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	39
2.1. Дизайн исследования: характеристика по группам подопытных крыс.....	39
2.1.1. Интенсивность общего патологического процесса по данным содержания МДА в эритроцитах.....	41
2.1.2. Определение вторичного продукта ПОЛ – МДА	41
2.2. Определение защитных механизмов от СРО.....	41
2.2.1. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) ...	41
2.2.2. Исследование активности каталазы.....	42
2.2.3.Метод Равина - определение концентрации церулоплазмينا в сыворотке крови	43
2.3. Определение функционального состояния клеточных мембран по данным активности Na^+, K^+ -АТФ-азы в гомогенатах внутренних органов.....	43

2.4.	Определение маркера дисфункции эндотелия сосудов - оксида азота (суммарных метаболитов) в сыворотке крови	43
2.5.	Определение активности ферментов: АсАТ, АлАТ, ГТТП и щелочной фосфатазы	44
2.6.	Определение содержания общего холестерина..	45
2.7.	Методика определения ХС ЛВП и ЛНП	45
2.8.	Исследование концентрации триацилглицеридов.....	46
Глава 3. Собственные данные. Окислительный стресс и NO-продуцирующая функция эндотелия у крыс на фоне интоксикации хлоридом кобальта.....		
3.1.	Изменения состояния общего патологического процесса ПОЛ и содержания NO на фоне кобальтовой интоксикации и регуляторов экспрессии eNOS.....	47
3.2.	Изменение интенсивности общего патологического процесса ПОЛ – как патогенетического звена повреждения клеточных мембран внутренних органов.....	57
Глава 4. Механизмы влияния афобазола у крыс с кобальтовой интоксикацией.....		
4.1.	Влияние афобазола на патогенетические звенья нарушений в обмене веществ.....	66
Глава 5. Механизмы влияния афобазола и регуляторов экспрессии eNOS у крыс с кобальтовой интоксикацией.....		
5.1.	Влияние комплекса - афобазол и регуляторы экспрессии eNOS на патогенетические звенья нарушений в системе ПОЛ – АОС и обмена NO	78
5.2.	Влияние комплекса афобазол + L-аргинин на функциональные показатели внутренних органов у крыс при токсическом состоянии, вызванном солью кобальта.....	85
Заключение.....		90

Выводы.....	99
Практические рекомендации.....	100
Список сокращений.....	101
Список литературы.....	102
Приложения.....	125

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Современная медико-биологическая наука считает актуальным изучение особенностей влияния солей тяжелых металлов, в частности кобальта, на человека, принимая во внимание наличие экопатогенных факторов в окружающей среде и накопление их в организме в больших количествах. В биологических средах кобальт, как ион с переменной валентностью, индуцирует генерацию АФК, которые инициируют нарушение окислительно-восстановительных процессов. Метаболизм оксида азота (NO) при пероксидации изменяется. Известно, что к АМК вместе с факторами, которые регулируют воспроизведение нитрооксидсинтазы, относится и модифицированный L-аргинин – АДМА и нехватка S-L-аргинина (Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., 1991). Причиной дефицита L-аргинина может быть негативное влияние АФК на у-транспортер и торможение окисленными ЛНП его переноса в гладкомышечную клетку сосудистой стенки. Эти биохимические изменения приводят к снижению уровня активности и экспрессии NOS-3, что сопровождается снижением содержания NOx, уровня его биодоступности - фактора риска развития эндотелиальной дисфункции. В противоположность этому введение L-аргинина в условиях окислительного стресса способствует повышению содержания NOx, стимулируя уровень экспрессии и активность eNOS (Корокин М.В., Покровский М.В., Новиков О.О. и др., 2011; Дзугкоев С.Г., Можеева И.В., Отиев М.А. и др., 2015). Тем не менее, живые системы приспосабливаются к АМК защитными механизмами – АОС, нарушение которой имеет место при интоксикации тяжелыми металлами, с частности кобальтом.

Вышеизложенное определяет необходимость разработки способа патогенетической коррекции нарушений окислительно-восстановительных процессов. Препаратами выбора могут оказаться вещества, нивелирующие активные радикалы и способные восстанавливать метаболизм NO. Одним из таких фармацевтических веществ является фабоматизол, синтезированный в

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенин., 2009). Существует мнение, что препарат угнетает NOS-2, активирует эндотелиальную NOS3 и поэтому может позитивно модулировать продукцию NO (Ng F., Berk M., Dean O., Bush A.I., 2008; Halliwell B., 2006; Novatta I., Juhila J., Donner J., 2010). Местом приложения действия афобазола являются σ_1 -рецепторы, которые локализованы преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме и способны мигрировать в цитоплазматическую мембрану клетки в составе липидных микродоменов (Свищенко Е.П., Гулкевич О.В., 2014). Т.о., препарат, активируя σ_1 -рецепторы, практически может приводить к восстановлению конформации белков мембраны и оказывать протекторное действие, восстанавливая структуру клеточной мембраны (Ряскина Е.В., Воронин М.В., Серединин С.Б., 2012). Стимулирующую роль для эндотелиальной NO-синтазы может играть L-аргинин, а также его комплекс с афобазолом.

Степень разработанности темы. Существующие в литературе представления о токсичности тяжелых металлов являются неисчерпывающими. Уделяется недостаточное внимание причинам нарушения NO-продуцирующей функции эндотелия - как фактора риска повреждения внутренних органов в условиях окислительного стресса. Существующие методы коррекции дисфункции эндотелия и патологии внутренних органов не достаточно эффективны. Как правило, авторами используются давно известные фармацевтические препараты и не уделяется внимание влиянию эндогенных антиоксидантов и современных препаратов ранее неиспользуемых. Поэтому необходим поиск более значимых и эффективных антиоксидантов, способных не только ингибировать процесс ПОЛ, но и вмешивающихся в процесс продукции оксида азота - как основного вазодилатирующего фактора. Особый интерес представляют фармацевтические агенты, влияющие на взаимодействие между эндотелиальной и индуцибельной NOS. В этом плане представляет особый интерес препарат афобазол, синтезированный в НИИ фармакологии им.

В.В. Закусова РАМН, и ранее неиспользуемый в исследованиях на фоне тяжелых металлов. В основном в литературе представлены данные об использовании препарата при стрессовых, тревожных состояниях. Показано в единичных исследованиях у лиц с тревожными состояниями активация ПОЛ. Это послужило основанием для проведения данного диссертационного исследования. Выявлено в исследованиях ученых, что селективный анксиолитик афобазол обладает антиоксидантными свойствами. В основном исследования проведены на моделях ишемии мозга, и корригирующая роль препарата установлена методами конфокальной микроскопии. Однако, в последние годы уделено больше внимание исследованию механизма влияния афобазола в экспериментальных исследованиях на различных экспериментальных моделях (Галаева И.П., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., 2005; Антипова Т.А., Сапожникова Д.С., Бахтина Л.Ю., 2009; Cuevas J., Behensky A., Deng W., 2011). Установлена нейропротекторная активность афобазола. установлено, что через сигма-1 воспринимающий аппарат оказывает восстановительное действие на зону гипоксического повреждения (Ajmo S.T. Jr., Vernon D.O., Collierb L. et al., 2006). Вместе с тем в литературе не представлены данные о комплексном подходе к действию афобазола, который включает исследование состояния сопряженной системы ПОЛ – АОС, их взаимодействие с оксидом азота – как основного вазодилататора, обменом холестерина и его липопротеиновыми фракциями, а также оценку состояния внутренних органов по данным активности ферментов при токсическом воздействии хлоридом кобальта. Более того не представлены данные о влиянии афобазола на состояние эндотелиальной NOS, используя активатор этого фермента L-аргинин и ингибитор – модифицированной аргинин (L-NAME). Из вышеизложенного следует, что довольно интересный пласт научных исследований остается без внимания. Поэтому автор в своих исследованиях провел фундаментальные исследования, посвященные изучению механизмов токсичности хлорида кобальта и разработке методологии исследований

метаболических и функциональных нарушений, используя влияние афобазола, L-аргинина, модифицированного L-аргинина (L-NAME) и их комбинации.

Цель исследования: изучение влияния афобазола, L-аргинина и их комбинации на состояние окислительно-восстановительных процессов, метаболизм NO, нарушение функции эндотелия и патологию висцеральных органов при систематической интоксикации кобальтом и L-NAME в эксперименте.

Задачи исследования:

1. исследовать влияние афобазола на состояние системы ПОЛ-АОС и обмен NO в условиях кобальтовой интоксикации и на фоне метилированного производного - L-аргинина в эксперименте; показать участие регуляторов экспрессии eNOS на NO-продуцирующую функцию эндотелия при систематической интоксикации хлоридом кобальта;

2. оценить влияние афобазола на липопероксидацию и характер изменений во внутренних органах. Маркерами могут быть мембранные, тканевые и сывороточные ферменты в токсических условиях, вызванных экзогенной нагрузкой кобальта;

3. оценить эффективность влияния афобазола и его комбинации с L-аргинином на содержание холестерина в сыворотке крови – фактора риска развития изменений, предшествующих атерогенезу, и определить их роль в снижении биодоступности NO;

4. Разработать концепцию о механизме влияния афобазола на функцию эндотелия сосудов и состояние внутренних органов при кобальтовой интоксикации и представить ее в виде патогенетической схемы.

Научная новизна. Впервые:

1. при кобальтовой интоксикации установлено влияние афобазола на NO-продуцирующую функцию эндотелия при изменении окислительно-восстановительных процессов и нарушении обмена оксида азота;
2. разработан и использован способ патогенетической коррекции дисфункции эндотелия и патологии внутренних органов с использованием афобазола и его комбинации с L-аргинином;
3. при интоксикации хлоридом кобальта установлена патогенетическая роль нарушений метаболизма NO в условиях окислительного стресса, показана корригирующая роль афобазола и его комплекса с L-аргинином, исследованы возможные связи данных (системные, межсистемные) при интоксикации хлоридом кобальта;
4. на основании сравнительного внутрисистемного и межсистемного анализа данных, сформулирована концепция о механизмах влияния афобазола на развитие эндотелиальной дисфункции и патологию внутренних органов, вызванных хлоридом кобальта.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Автором данного исследования установлено научно-практическое значение при кобальтовой интоксикации роли афобазола в механизмах нарушения функции эндотелия и установлены биохимические маркеры для более раннего выявления последствий в сосудистой системе и во внутренних органах у лиц, подвергающихся хроническому воздействию экопатогенных факторов. Работа имеет медико-экономическое значение, так как разработанный способ коррекции селективным анксиолитиком афобазолом и его комбинации с L-аргинином возможно использовать для профилактики стресс-реакций у людей, работающих во вредных цехах металлургических заводов.

Методология и методы исследования. Сбор данных и обработка полученных результатов проводились в соответствии с разработанным

диссертантом дизайном исследования, в котором четко сформулированы задачи, определены современные методы исследования токсичности хлорида кобальта, определены факторы, вызывающие дисфункцию эндотелия и повреждение внутренних органов. Разработан методологический подход для коррекции выявленных нарушений, включающий эндогенные факторы и современный фармацевтический препарат, ранее не применяемый в такого плана исследованиях. Используются статистические методы обработки данных, включая корреляционный анализ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. При экзогенной нагрузке хлоридом кобальта происходит нарушение окислительно-восстановительных процессов и обмена оксида азота, приводящее к недостатку NO – основного вазодилатирующего фактора, а также повышению холестерина - фактора риска атерогенеза. Нарушается функция эндотелия, патогенетическую роль, в развитии которой играет уровень концентрации суммарных метаболитов NO, а также изменения доступности L-аргинина для энзима, активности и экспрессии eNOS.

2. Афобазол регулирует систему ПОЛ - АОС, снижает содержание МДА и повышает адаптационные механизмы организма, в частности активность СОД. Вмешиваясь через сигма-1 рецепторы в структуру цитоплазматических мембран, увеличивается транспорт L-аргинина к eNOS, что является конкурентом для ингибитора нитрооксидситазы модифицированного L-аргинина. Следствием этих влияний препарата является увеличение концентрации NOx.

3. В другом варианте сравнительный анализ монотерапии афобазолом и его комплекса с L-аргином показывает более эффективное угнетение образования вторичного продукта ПОЛ в тканях органов вследствие активации АОЗ клеток; при этом возрастает активность мембранного фермента - Na,K-АТФ-азы, а специфичных для органов энзимов в сыворотке крови снижается.

Степень достоверности и апробации работы. Статистическая значимость полученных данных подтверждена методами вариационной статистики. Статистическую достоверность различий проверяли t-критерием Стьюдента.

Материалы диссертации доложены на конференции на X международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в современном мире» (Санкт-Петербург, 2015); XX международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования: проблемы и результаты» (Новосибирск, 2015); 10 международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук и возможности трансляционной медицины в решении актуальных проблем практического здравоохранения» (Астрахань, 2015); XVI международном конгрессе "Здоровье и образование в XXI веке" РУДН (Москва, 2015); V Региональной междисциплинарной конференции молодых ученых "Наука-Обществу" (Владикавказ, 2015); V съезде биохимиков России (Дагомыс, 2016).

Внедрение результатов исследования. Материалы научной работы внедрены на кафедрах нормальной и патологической физиологии, кафедре внутренних болезней с профпатологией ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России, а также в НИР Института биомедицинских исследований Владикавказского научного центра Российской академии наук.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания приравненные к ним.

Личный вклад автора в исследование. Диссертант создавал модели токсического влияния и дисфункции эндотелия, применяя хлорид кобальта и его комплекс с модифицированным L-аргинином (L-NAME). Изучал причинно-следственные связи позитивного влияния афобазола в этих модельных экспериментах, используя традиционные биохимические методы. Установлена регуляторная роль афобазола и эффекторов экспрессии eNOS при системном нарушении окислительно-восстановительных процессов, а также в изменении обмена NO при этом, в основе которых лежит нарушение функции эндотелия.

Автор работы лично выполнил все методы исследования, принимал участие в обработке экспериментальных данных статистическими методами. На основании анализа и систематизации выявлены механизмы токсичности хлорида кобальта и применил новый способ их коррекции.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 144 страницах компьютерного текста. Диссертация включает введение, обзор литературы, материал и методы исследования, собственные данные (3 главы), заключение, общие выводы, список литературы и приложение. Библиографический список включает 236 источника литературы, из которых 139 отечественных и 97 иностранных авторов. Диссертация содержит 29 рисунков.

Глава 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Механизмы токсического влияния хлорида кобальта на живые системы и пути его поступления

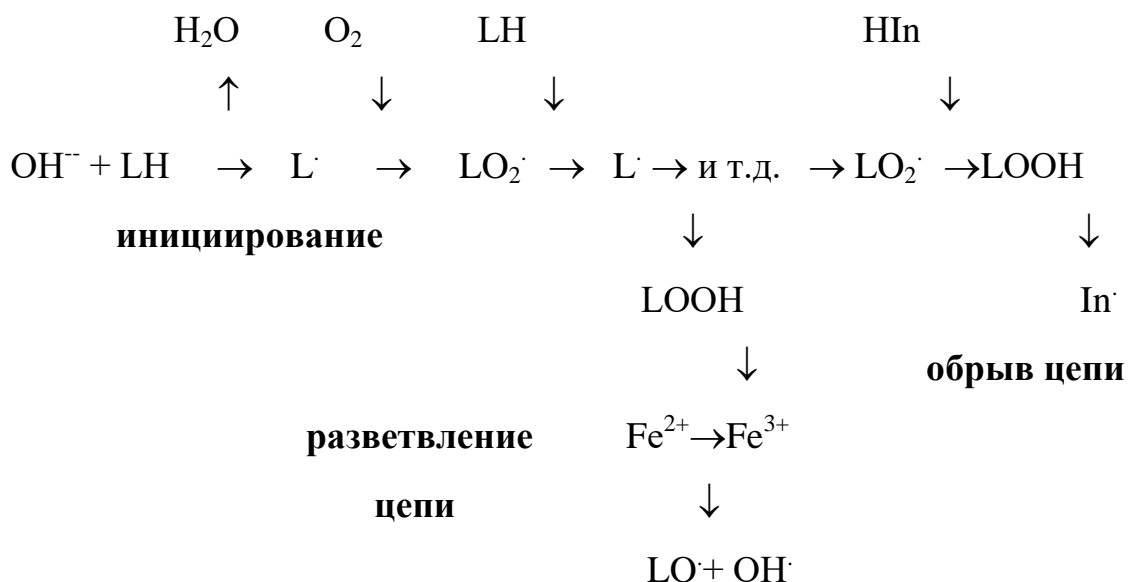
Республика Северная Осетия-Алания характеризуется высоким содержанием в экосистеме тяжелых металлов: свинца, кобальта, молибдена, вследствие того, что в регионе функционирует свинцово-цинковое производство. Тяжелые металлы занимают особое место среди ксенобиотиков, так как их окислы и соли внедряются в организм высших животных и человека через дыхательную систему, кожные и слизистые покровы, а также перорально. Следует отметить способность солей тяжелых металлов кумулировать в тканях (допустимая концентрация содержание кобальта в крови колеблется от 4 до 10 мкг%) и при этом оказывать свое негативное действие на здоровье человека, включая иммунологическую реактивность (Вишневецкий В.Ю., Ледяева В.С., 2013). Одним из представителей тяжелых металлов является кобальт, который имеет важное биологическое значение для человека, т.к. он входит в состав водорастворимого витамина В₁₂ (цианкобаламин), влияет на процессы кроветворения, на углеводный и липидный обмены, является кофактором ряда ферментов, переносится с белковыми фракциями, и фиксируется в клетках органов (Ершов Ю.А., Плетенева Т.В., 1989; Ланкин В.З., Тихазе А.К., Осис Ю.Г., 2002; Левина Э.Н., 1972; Рудакова Р.И., Бусыгина И.И., 1970). Подавляющее количество (95%) парентерально введенного кобальта метаболизирует за несколько минут (Коломийцева М.Г., Габович Р.Д., 1970). Наиболее высоким содержанием кобальта характеризуются ткани печени, почек и сердце, избыток его экскретируется с мочой (Коломийцева М.Г., Габович Р.Д., 1970; Орджоникидзе Э.К. и соавт., 1991; Brune D. et al., 1980; Суворов И.М. и соавт., 1982; Edel J. et al., 1994; Ayala-Fierro F. et al., 1999; Jorhem L. et al., 1989; Merritt K. et al, 1989; Southern L.L., Baker D.H., 1982).

Парентерально введенный кобальт (Суворов И.М. и соавт., 1982; Ершов Ю.А., Плетенева Т.В., 1989) после введения в крови обнаруживается через 2 часа и не зависит от используемой дозы в максимальной концентрации (Szakmary E. et al., 2001).

1.2. Повреждающее действие ПОЛ

Токсичность тяжелых металлов, в том числе и кобальта, определяется прежде всего наличием на внешней орбитали атома неспаренного электрона, что позволяет реагировать с высокой скоростью, в частности с O_2 , а также с ПНЖК. Образующиеся при этом продукты реакции – это супероксиданион радикал и др. Взаимодействие с ПНЖК дает перекиси липидов и изменения в структуре клеточной мембраны (Башилов А.В., Русланов А.Д., 2009).

Окислительный процесс жирных кислот характеризуется инициированием, разветвлением и обрывом цепи и является основным источником липоперекисей в клетке:



В этих реакциях образуются первичные и вторичные конечные продукты, в частности, малоновый диальдегид (Конторщикова К.Н., 2000; Меншикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А., 2006).

ПОЛ – процесс, в нормальных физиологических условиях характерен для клеток организма. Повреждение биомембран под влиянием ПОЛ приводит к нарушению метаболических и функциональных процессов. В липидной фазе расположены различные ферменты, которые катализируют химические реакции и оказывают влияние на белковые структуры, в частности, рецепторы (Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.В., 2001). Определенная роль в нарушении клеточного механизма играет в первую очередь Na,K-АТФ-аза, в активный центр которой входят тиоловые группы. Повышение проницаемости для ионов кальция и ионов водорода является результатом действия продуктов ПОЛ на липидную фазу мембран. Это может приводить в митохондриях к разобщению ЦПЭ и фосфорилирования, а, следовательно, к энергетическому голоду (Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.В., 2001). Одновременно в цитоплазму из саркоплазматического ретикулама транспортируется кальций, нарушающий структуру клетки. Страдает устойчивость фосфолипидного бислоя, создаются условия для электронного пробоя мембраны и повреждения клеточных структур (Казимирко В.К., Мальцев В.И., 2004).

Активные метаболиты кислорода (АМК) образуются в ЦПЭ, на уровне QH₂-цитохром-с-редуктазного комплекса, а также в белых кровяных клетках, некоторые из которых выполняют фагоцитарную функцию для гибели различных белков и микробов (Титов В.Н., 2005; Ames V.N. et al., 1993).

Распад пуриновых нуклеотидов, сопровождающийся образованием ксантина, гипоксантина, а также L- и D-аминокислот, завершается переносом атомов водорода с ФМН и ФАД-зависимых ферментов прямо на молекулярный кислород, обходя дыхательную цепь. При таком непосредственном окислении образуется не вода, а перекись водорода, т.е. АФК, что является нормальным физиологическим явлением, а порой и патологическим. Следовательно, эти данные литературы свидетельствуют о различных путях окисления и образовании АФК (O₂⁻, H₂O₂ и др.) при неполном восстановлении O₂ до молекул H₂O (Gutteridge J.M., Halliwell B., 2000).

Попадание хлорида кобальта через дыхательную систему сопровождается повышением в крови ЛНП и снижением взаимоотношений между ЛНП и ЛВП (Суворов И.М. и соавт., 1982; Валиев В.С. и др., 1996). Помимо этого происходит синтез белков мышечной ткани, увеличивается усвоение азота и стимулируется обмен энергии (основной обмен) (Коломийцева М.Г., Габович Р.Д., 1970; Георгиади Г.А., 2007). Кобальт повышает активность экскреторного фермента – щелочной фосфатазы в костной ткани, кишечнике, а также ферментов цикла синтеза мочевины (Суворов И.М. и соавт., 1982; Калиман П.А., Беловецкая И.В., 1986). Оказывает влияние на обмен гемсодержащих микросомальных белков, включая цитохром P₄₅₀. Тормозит активность ряда энзимов окислительно-восстановительных процессов, в том числе ЦЛК и микросомальных окислительных процессов (Коломийцева М.Г., Габович Р.Д., 1970; Фролова А.Д., Чекунова М.П., 1974; Исидорова В.А., 2001; Буланкина Н.И. и др., 2004). Присутствие тяжелых металлов вносит свое участие в процесс абсорбции ионов Ca²⁺, Fe через ион-селективные каналы. Происходит выключение из реакций SH-групп белков, что приводит к угнетению окислительных процессов в основном, аэробных. Несомненно, угнетающе влияет на мембранные ферменты: Na,K-зависимую АТФ-азу и специфичные для тканей энзимы (Суворов И.М. и соавт., 1982; Аксёнова М.Е., 2000). Ионы кобальта могут ингибировать α-кетоглутаратдегидрогенозу и ферменты окислительного декарбоксилирования ПВК. Этот процесс ингибирования ферментов аэробного окисления сопровождается снижением потребления кислорода энергетическими клетками и энергообразованием (Ершов Ю.А., Плетенева Т.В., 1989; Игнатова М.С. и др., 2004).

1.3. Токсические влияния представителя тяжелых металлов на состояние мембранных и специфических ферментов, включая экскреторный энзим – щелочную фосфатазу

Сама физиологическая и анатомическая структура в организме установлена так, что особым свойством извлекать тяжелые металлы из крови

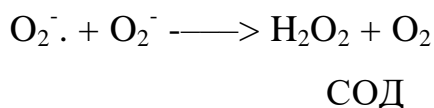
обладают почки. Об этом информируют многочисленные данные литературы (Коломийцева М.Г., Габович Р.Д., 1970; Ноздрюхина Л.Р., 1977; Суворов И.М. и соавт., 1982; Орджоникидзе Э.К. и соавт., 1991; Албегова Н.Р. и соавтор., 2002; Roschin A.V. et al., 1989; Brune D. et al., 1980; Nation J.R. et al., 1983; Edel J. et al., 1994; Ayala-Fierro F., et al., 1999). Преимущественная кумуляция кобальта происходит в органах выведения – почках, экскретирующих все ксенобиотики, благодаря анатомо-физиологической структуре (Албегова Н.Р., 2004; Брин В.Б. и соавт., 2006; Czock D., Hausler U., Aumanns C. et al., 2005; Джигоев И.Г., 2008; Дзугкоева Ф.С. и соавт., 2009;).

Цитотоксичность кобальта определяется следующими механизмами: активацией липопероксидации, угнетением АОС в клетках и влиянием на метаболизм NO и нарушением функции эндотелия сосудов. Знание патогенетических механизмов цитотоксического действия кобальта может позволить обосновать использование в профилактике и терапии вызванных нарушений антиоксидантов, мембраностабилизаторов и современных препаратов, улучшающих взаимодействие между eNOS и iNOS. Воздействие окислителей на клетки эндотелия сосудов и внутренних органов сопровождается нарушением функционирования ЦПЭ, окислительного фосфорилирования и снижением содержания энергетической валюты – АТФ (Буланкина Н.И. и соавт., 2004). Мишенью токсического влияния тяжелых металлов являются митохондрии, о чем свидетельствует нарушение их структурной организации в клетках почек и печени у экспериментальных животных при влиянии хлорида кобальта (Куценко С.А., 2002). Эти изменения в энергообразующих структурах - митохондриях при кобальтовой интоксикации приводят к уменьшению образования энергии, снижению соотношения АТФ/АДФ (Рослая Н.А., 2004), угнетению Na^+ - K^+ -зависимых АТФ-аз (Суворов И.М. и соавт., 1982). В структурах нефрона – в толстом восходящем колене петли Генле работает биомеханизм, транспортирующий Na, K, т.е. Na-K-обмен, который также изменяется при кобальтовой интоксикации. При системной интоксикации хлоридом кобальта повышение активности СРО

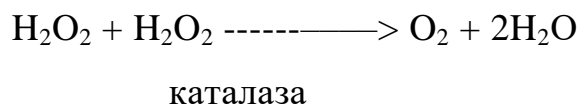
и развитие окислительного стресса сопровождается нарушением антиокислительной системы - СОД, каталазы и др. Липопероксидация также влияет на химический состав фосфолипидов цитоплазматических мембран в нефроне, т.е. клубочково-канальцевого аппарата. Таким образом, биомеханизм Na,K-зависимой АТФ-азы, несомненно, страдает и вторично изменяются транспортные механизмы ионов в нефроне (Дзугкоева Ф.С. и соавт., 2009).

1.4. Антиокислительная система клеток (АОС)

Эта система имеет несколько уровней защиты: СОД, каталаза, пероксидаза. СОД (металлоферменты):



Эти средства адаптации, характерные для всех клеток, потребляют кислород, при этом скорость химической реакции высокая и ограничивается скоростью диффузии $\text{O}_2^{\cdot -}$. Химизм этих каталитических реакций заключается в восстановлении и окислении ионов металла, происходящий в активном центре энзима. Существует три изоформы СОД. Одна из них содержит кофактор в виде ионов меди, другая - цинка, а также магний и локализуются внутриклеточно. Существует и экстрацеллюлярная (Gutteridge J.M., Halliwell V., 2000). СОД инактивирует радикалы кислорода, возникающие в ходе биохимических реакций транспорта электронов при токсическом воздействии ионов тяжелых металлов, излучений и различных заболеваниях (Крукиер И.И., 2003). Энзим каталаза функционирует во всех клетках организма и превращает пероксид в молекулы воды и кислорода, обладает высокой активностью и большой частотой оборотов, поэтому в единицу времени может обеспечить разложение большого количества пероксида, потребляя незначительное число молекул энзима.



На скорость протекания каталитической реакции влияет скорость диффузии самого кислорода (Gutteridge J.M., Halliwell B., 2000).

Переносчиком ионов меди и внеклеточным гасителем свободных радикалов является α -глобулин – церулоплазмин, обладающий дисмутазной активностью, в реакции образуется кислород и вода. Белок ЦП, обладающий феррооксидазной активностью, в основном подавляет свободные радикалы, образующиеся в клетках крови, фагоцитах - макрофагах и нейтрофилах. Помимо этой функции ЦП транспортирует ионы меди из печени к клеткам органов (Ланкин В.З. и соавт., 2004). Этот фермент является чистильщиком активных радикалов в циркулирующей системе.

1.5. Метаболизм окиси азота при экзогенной нагрузке хлоридом кобальта

Оксид азота выполняет роль внутриклеточного мессенджера и участвует в реализации ответных реакций со стороны клеток органов и тканей (Айламазян Э.К. и др., 2010). Спектр биорегуляторных реакций разнообразен и очень важен при жизнедеятельности организма. Оксид азота образуется при ферментативном окислении L-аргинина NO-синтазой (NOS); источником атома азота является азотсодержащая группа R-цепи.

L-аргинин как представитель полунезаменимых аминокислот, был впервые выявлен в 1886 году (Малышев И.Ю., Манухина Е.Б., 1998), его окончательная структура утверждена в 1910 году (Акмаев И.Г., Гриневич В.В., 2003). В последующие годы детально изучали метаболизм L-аргинина, его роль в гомеостазе и балансе азота. Значимость L-аргинина возросла в связи с тем, что он является предшественником оксида азота (Акопов С.Э., Канканян А.П., 1996), играющего роль мессенджера в различных биорегуляторных механизмах (Албертс А., Брей Д., Льюис Р. и др., 1994; Insull W., Black D., Dujovne C., 1994; Rector T.S., Vane A.J., Mullen K.A. et al., 1996). Рекомендуемая суточная норма L-аргинина для взрослого человека составляет 5,4 г (Банин В.В., Алимов Г.А., 1992) и только 50% извне с пищей аминокислота попадает в систему кровообращения. В физиологических

условиях L-аргинина в плазме крови человека и животных содержится от 95 до 250 мкмоль/л. В изменении его содержания играют роль возрастные и диабетические особенности, а также структурные изменения в сосудистом эндотелии и состояние системы его переноса. Помимо экзогенного поступления необходимость в L-аргinine может восполняться при распаде белковых молекул, а также при ингибировании аргиназы цикла синтеза мочевины. (Банин В.В., Алимов Г.А., 1992; Волошин П.В., Воробьева Т.М., Гейко В.В., 2006).

Регулирующее влияние на содержание АК оказывают цитокины, в частности, интерферон- γ (ИФ- γ) и интерлейкин- 1β (ИЛ- 1β). Эти цитокины увеличивают транспорт АК в клетку и влияют на процесс образования L-аргинина из промежуточного продукта реакции - L-цитруллин. Влияние цитокинов неоднозначно. Так цитокины (ИЛ-4 и ИЛ-10) способствуют уменьшению содержания L-аргинина, стимулируя активность ферментов орнитинового цикла уменьшая содержание АК.

Образование оксида азота тормозится производными L-аргинина, являющиеся по принципу конкуренции ингибиторами уровня экспрессии eNOS. При этом следует отметить, одни из них действуют избирательно, а другие по общему механизму. К регуляторам, работающим по общему механизму, т.е. неизбирательно относится N-нитро-L-аргининметилловый эфир (L-NAME). Существуют индуцибельная (iNOS, NOS-2) и эндотелиальная (eNOS, NOS-3), которые состоят из мономеров одинаковой химической структуры, имеют молекулярную массу 130 кДа для iNOS и eNOS, 160 кДа – для nNOS. Структурные единицы включают ряд доменов. На N-конце полипептидной цепи содержится оксигеназный домен – гемсвязывающий. Это структурная особенность характерна для каждой изоформы NOS. В другой части цепи после оксигеназного домена находится кальмодулин-связывающий. На C-конце цепи располагается домен редуктазный, способный связывать кофакторы: никотинамиддинуклеотидфосфат (НАДФН), ВН4, флавиномоно- и динуклеотиды (ФМН, ФАД) и протопорфирин IX (Акмаев И.Г., 1998; Roger R.H., Bode-Boger S.M., Thiele W. et al., 1997; Pitt B., Pepine C., o'Neill B., Haber

Н., Pressler M., Mancini G.B.J., 1997). Постоянно присутствующий базальный уровень NO образуется порциально с участием ферментов, действующих либо через рецепторный аппарат или без их участия. В регуляции тонуса сердечно-сосудистой системы особо важную роль играет эндотелиальная NOS (NOS-3) (Courville K.A., Lavie C.J., Milani R.V., 2005; Eaton P., Jones M.E, Mc Gregor M. et al., 2003; Sutherland M.K., Somerville M.J., Yoong L.K., et al., 1992). Нейрональная NO-синтаза ответственна за регуляцию процесса пролиферации и созревания нейронов ЦНС, а также за процесс регенерации после повреждений мозга в результате ишемии (Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.В., 2002).

Активность NOS-1 и NOS-3 регулируется аллостерически, изменением структуры молекул энзима, что отличает их от индуцибельной NOS. Для повышения активности индуцибельной NOS требуется более длительное время, затрачиваемое на генную экспрессию. При патологиях: диабете, инфаркте миокарда, цереброваскулярных нарушениях и других состояниях с пониженным содержанием кислорода стимулируется образование оксида азота в разных тканях (Jay M.T., Chirio S., Siow R.C. et al., 1997; Takizawa T., Tada T., Kitazawa K. et al., 2001).

Базисный уровень содержания оксида азота обеспечивается eNOS, что играет важную роль в поддержании сосудистого гомеостаза (Gerhard M., Walsh W., Tawakol A. et al., 1998; Little W.C., Constantinescu M., Applegate R.G. et al., 1988). В патогенезе сосудистых осложнений миокарда (ИБС) ключевую роль играет дефицит NO и снижение активности eNOS. Локализация eNOS может быть как в растворимой, так и в мембраносвязанной форме эндотелиоцитов, при взаимосвязи энзима с кавеолином, значительно тормозится активность. Эндогенные факторы через рецепторы и возрастания концентрации кальция в клетке, освобождают eNOS из комплекса с кавеолином и повышают ее активность (Lerman A., Burnett J.C., Higano S.T. et al., 1998; Oemar B.S., Tschudi M.R., Godoy N. et al., 1998).

Мембраносвязанная форма фермента принимает участие в подаче сигнала в случае механических воздействий, например увеличение напряжения

сдвига (shearstress). Такими факторами могут оказаться увеличение скорости кровотока и пониженное содержание кислорода в крови (Ванин А.Ф., 2000; Раевский К.С., 1997).

Фермент активируется при повышении содержания внутриклеточного кальция и усиливается его проникновение в клетку при повышении напряжения и индукции калиевого тока, стимулируется эндотелиальная NOS в условиях сужения сосудов, а также через активацию тромбоцитов (ФАТ) и их рецепторов, локализованные во внутреннем слое сосудов. Образовавшийся оксид азота легко проникает к гладкомышечной клетке, является мессенджером, индуцирует образование цГМФ. Запускается последовательная цепь химических реакций, в результате которых происходит дефосфорилирование белков K^+ Ca-каналов и усиливается калиевая проводимость через мембрану клеток. Развивается гиперполяризация цитоплазматической мембраны, угнетается транспорт Ca^{2+} через ион-селективные каналы, содержание клеточного кальция снижается и происходит дилатация мышечных волокон.

eNOS содержится в эндотелиоцитах и кровяных пластинках. На реализацию ее функции влияет Ca^{2+} (Горрен А.К.Ф., Майер Б., 1998; Голиков П.П. и др., 2000).

Энзим может также активироваться при участии АМР-зависимой протеинкиназы А, а также сердечного шокового протеина-90. В этом процессе участвуют ряд интерлейкинов.

Гены, ответственные за процесс воспроизведения различных представителей NOS, находятся не в одинаковых хромосомах. Эндотелиальная и нейрональная NOS являются конститутивными и триггером для них является Ca^{2+} кальмодулин. В отличие от nNOS и iNOS, которые локализуются в цитоплазме, eNOS связана со структурами клеточных мембран и реагирует на сигналы, поступающие из внутренней среды (Гусев Е.И., Скворцова В.И., Коваленко А.В., Соколов М.А., 1999).

При различных патологических процессах с целью подавления макрофагов индуцибельная изоформа генерирует NO в микромолярных

соотношениях, что может приводить к его гиперпродукции (Frohlich E.D., 1989).

В составе NOS имеются 2 домена, каждый из которых содержит редуктазный С-конец и оксигеназный N-конец, гемсодержащий. Коферментами являются флавиновые и никотинамидные нуклеотиды, а также ТГБП (BH₄) и кальмодулин. Реакция образования оксида азота начинается с оксидазного участка, а затем электроны по редокс системе транспортируются и образуется промежуточное соединение гемового железа с кислородом (Fe³⁺-O-O⁻). Окисление L-аргинина сопровождается превращением в NO. Для структурной организации NOS характерна двумерная организация, взаимодействие субъединиц происходит на N-конце (Васильева Е.М., Баканов М.И., Марков Х.М., 1999; Villar N.R., 1995).

Дефицит многих факторов, в частности, недостаток В₄, L-аргинина препятствует образованию оксида азота eNOS и способствуют образованию АМК. В этих условиях выявляется НАДФН-оксидазная активность (Малахов В.О., 2004). Эти сведения литературы свидетельствуют о способности NOS образовывать АМК. Эндотелиальная NO-синтаза представляет собой сложноорганизованную энзимную систему, которая способна образовывать активные радикалы при условиях изменения метаболизма в клетках. При сниженном кислородном обеспечении в реакциях восстановления также образуется оксид азота (Глинка Н.Л., 1960). Активные формы жирных кислот (ацилы) могут приводить к слиянию эндотелиальной NOS с плазмалеммой. При этом стимулируется ее активность. В противоположность этому присоединение остатков фосфорной кислоты (фосфорилирование) по аминокислоте серин вызывает распад на субъединицы (Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р., 2005; Ванин А.Ф., 2000). Установлено исследованиями (Варич В.Я., Ванин А.Ф., 1987; Boh M., Opolski G., Poredos P. Et al., 2005), что триггером в образовании АМК является Ca²⁺, в условиях *in vivo* происходит связывание лиганда с рецептором и трансдукция сигнала.

Выход Ca^{2+} из СПР и его поступление из внутренней среды в клетку запускает активную фосфолипазу A_2 , образование арахидоновой кислоты, метаболизм которой вносит ряд изменений: фосфолипиды мембраны клеток превращаются в лизофосфолипиды, повышается проницаемость клеточной мембраны, что вносит существенный вклад в нарушение клеточного метаболизма. (Варич В.Я., Ванин А.Ф., 1987; Веденский А.Н., 1988; Виленский Б.С., 1999). С другой стороны эта арахидоновая кислота способствует образованию АМК и замыканию порочного круга - усиливается окисление липоксигеназному пути (O'Banion M.K., Miller J.C., Chang J.W., et. al, 1996).

В работающей клетке фосфатидилинозитол-3-фосфат играет роль мессенджера, работает цепочка фосфолипаза С – ДАГ - арахидоновая кислота - субстрат для липоперекисей (Верещагин Е.И., Тарасов Р.С., Астраков С.В., Волков С.Г., 2004; Ochoa J.V., Udekwu A.O., Billiar T.R. et al., 1991).

АМК могут образовываться в химических реакциях окисления с участием ксантинооксидазы, которая начинает активно работать при кислородном голодании (гипоксии), локализация их образования характерна для энергообразующих структур - митохондрий (Волин М.С., Дэвидсон К.А., Камински П.М. и др., 1998). Известно, что H_2O_2 может также образовываться в митохондриях (Ohkawa H, Ohishi N, Yagi Kunio, 1979). В организме человека и животных при окислительных реакциях образуется не только молекула воды, но и перекиси водорода. Это особенно характерно при нарушенных процессах восстановления кислорода в результате поражения эукариотической клетки.

Следует выделить 5 факторов основных, влияющих на процесс экспрессии eNOS и образование NO:

- 1) генная регуляция ДНК-зависимого синтеза РНК (м-РНК);
- 2) формирование функции мРНК в соответствующих субклеточных органеллах;
- 3) наличие коферментов NO-синтаз;
- 4) экспрессия NOS и активность энзима;
- 5) наличие субстрата - L-аргинина для образования NO.

Период полураспада NOS короткий (15-20 часов). Инактивация энзима происходит в реакциях фосфорилирования по остаткам аминокислот: тирозин, серин и треонин (Faist E., 2000).

В сутки у здорового человека в норме в среднем образуется 1 ммоль NO. Существует понятие общее содержание NO в организме, а также локальное в органах. Учитывая небольшой интервал распространения NO (не более 0,5 мм) важно, где NO образуется и как переносится с белками крови (Акмаев И.Г., Гриневич В.В., 2003; Банин В.В., Алимов Г.А., 1992; Марков Х.М., 2005).

Наследственно детерминированный недостаток eNOS имеет место при артериальной гипертонии, а также при наследственно обусловленных пороках сердца в детском возрасте. Следует особо отметить, в этих условиях имеет место понижение синтеза NO в миокарде.

Что касается nNOS, то она участвует в регуляции уровня кровяного, артериального давления (Sapirstein A., Bonventre J.V., 2000). Делят NOS-зависимый синтез NO на физиологический и повышенный.

На основании цитирования авторов, играют роль различные факторы внутренней среды, включая влияние провоспалительных цитокинов и многих других. Повреждения на фоне повышения NO могут быть локализованные в определенном органе, например гепатоцитах (Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А., 1998; Маленюк Е.Б., Аймашева Н.П., Манухина Е.Б. и др., 1998).

Выполнив свои физиологические функции, оксид азота инактивируется несколькими путями. Период распада оксида азота составляет несколько секунд (Гоженко А.И., Насибуллин Б.А., Кохно Ю.С., 2000).

Важным путем обмена NO является реакция с белками, содержащими гем, при этом происходят различные воздействия оксида азота (расслабление гладких мышечных клеток). Окись азота реагирует с рецептором цГМФ и образуется при этом циклический ГМФ – клеточный мессенджер, который уменьшает содержание кальция в клетке и происходит вазодилатация (Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М., 2000).

Будучи важным вазодилататором оксид азота может в определенных ситуациях рассматриваться как АФК, обладая цитотоксичностью. Это может быть обусловлено взаимодействием NO с супероксид-анионом (O_2^-) и образованием пероксинитрита ($ONOO^-$) (Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М., 2000; Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. и др., 2000).

Возможно в процессе обмена оксида азота образование нитрозотиолов в быстрой обратимой реакции (Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. и др., 2000).

Оксид азота как внутриклеточный мессенджер NO принимает участие в регуляции процессов обмена веществ. В то же время при определенных состояниях оксид азота индуцирует развитие патологических процессов. Из этого вытекает, что NO оказывает «двуликое» действие: метаболическое и участвует в патологических процессах как активный радикал, имеющий неспаренный электрон. Обладает высокой способностью проникать в смежные клетки из мест своего образования (цитир. по Абрамову В.В, 1991).

Влияние NO условно разделяют на прямое и непрямое. Оксид азота обладает способностью непосредственно взаимодействовать с гемсодержащими белками: гемоглобин, миоглобин, цитохром P-450, гуанилатциклаза. Однако, оксид азота может вступать в реакции с Fe^{2+} в составе Fe-S белков, ДНК, РНК и свободным Fe. Обладает антиоксидантным свойством и тормозит окислительные процессы, запускаяющие Fe^{3+} . Точками приложения непосредственного влияния NO являются ионы Cu и Zn в составе ферментов и свободные радикалы (радикалы с углеродным центром, липидные и диоксид азота). Прямые реакции наиболее характерны для физиологических условий. Базальный синтез характеризуется малыми количествами NO (около 0,1-1 мкмоль). Следовательно, NO выполняет регуляторные и сигнальные функции (Yusuf S., Collins R., Mac Mahon S., Peto R., 1988).

Косвенные эффекты негативного влияния оксида азота есть результат его реактивной формы (RNOS). В образовании реактивных форм могут принимать

участие и металлы с переходной валентностью, и оно бывает связано с активностью iNOS.

Показано, что между эндотелиальной NOS и индуцибельной существуют контрвзаимодействия и это регулируется реактивными формами кислорода (Тенина О.А., Рейхерт Л.И., Быченко С.М. и др., 2005; Рейхерт Л.И., Быченко С.М., Кичерова О.А. и др., 2006; Bonner G., Preis S., Schunck U. et al., 1990; Kagiya S., Tsuchihashi T., Abe I., Fujishima M., 1997; Shapira Y.J., 1992).

Благодаря этому супероксид-анион через NO снижает вазодилатирующее действие эндотелийзависимых вазодилататоров, наряду с непосредственным сосудосужающим эффектом (Смердова Л.Н, Шандренко С.Г., Дмитренко М.П., 2002). В другом варианте расширению сосудов препятствует синтез цитокина – эндотелина (Гиляревский С.Р., 2006), он в высокой степени повышает тонус артерий, что приводит к артериальной гипертензии (Салей А.П., Рецкий М.И., 2003) и другим сосудистым заболеваниям (Тиганова А.С., 1999; Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю. и др. 2000).

Надо полагать, что NO реагирует с супероксид-анион радикалом (O_2^-) в 3 раза быстрее скорости реакции дисмутации. Также взаимодействие ограничивается АОС (Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А., 1998). В противном случае происходит образование пероксинитрита ($ONOO^-$) (Рудакова А.В., 2004; Тиганова А.С., 1999; Сосунов А.А., 2000).

1.6. Корректирующее действие фабомотизола (афобазола) в организме

Создан принципиально "новый" транквилизатор афобазол, разработанный в НИИ фармакологии РАМН, который открывает новые перспективы в лечении больных (Серединин С.Б., 2009; Чумаков Д.В., 2004; Незнамов Г.Г. и соавт., 2001). «По химической структуре афобазол относится к производным 2-меркаптобензимидазола и не является агонистом бензодиазепиновых рецепторов» (Медведев В.Э., Добровольский А.В., Троснова А.П., 2006). Этот препарат внедрен в клиническую практику в

качестве анксиолитика в 2005 г. (Незнамов, С.А. Сюняков, Д.В.Чумаков, 2006). У пациентов с генерализованным тревожным расстройством (ГТР) показана высокая эффективность и безопасность препарата в лечении данной категории больных. Возможный позитивный ответ включает снижение когнитивного, соматизированного и поведенческого уровней тревоги (Бабюк И.А., Шульц О.Е., 2008). Клинический анализ динамики генерализованного тревожного расстройства на протяжении курса лечения позволил уточнить спектр терапевтической активности афобазола, которая реализуется в течение первых 3–10 дней терапии (Реутова М.А., Сюняков С.А., Сюняков Т.С., Незнамов Г.Г., 2010). Установлено, что афобазол предотвращает развитие тревожности при ишемии мозга. При хроническом введении афобазола на фоне локального ишемического поражения мозга толерантность к анксиолитическому действию препарата не развивается (Серединин С.Б., Воронин М.В., 2009).

Тревожные расстройства чрезвычайно распространены в общей медицинской практике, частота которых достигает 15% (Stocchi F., Nordera G., Jokinen R., 2003.) Клинически они проявляются психическими и соматическими (вегетативными) симптомами, такими как беспокойство, чувство тревоги и страха, чувство внутреннего напряжения, повышенная раздражительность, бессонница (Немченко О.И., 2007).

Следует отметить, что состояния тревожности развиваются в женском организме в 2 раза чаще, чем у мужчин. (Zinbarg R.G., Barlow D.N., Leibovitz M., 1994). Состояние тревожности у женщин чаще всего встречаются в предменструальный период, при климактерическом синдроме, а также раннем истощении яичников (Немченко О.И., 2007).

Тревожные расстройства наблюдаются у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Ингибирование у больных симптомов тревоги позволяет улучшить не только социальную адаптацию пациентов, но и снизить риск прогрессирования (Медведев В.Э., 2007; Серединин С.Б., Воронин М.В., 2009; Смулевич А.Б., Сыркин А.Л., Дробижев М.Ю., 2005). Для купирования актуальных тревожных расстройств у больных с ССЗ наиболее часто

назначаются анксиолитики. Афобазол является антитревожным препаратом (Медведев В.Э., Добровольский А.В., Троснова А.П., 2006). В связи с этим актуальным является внедрение в клиническую практику нового отечественного анксиолитика афобазола, открывшего новые перспективы в лечении данной категории больных (Михайлова Н.М., Сиряченко Т.М., 2006; Татарский Б.А., Бисерова И.Н., 2007; Цорин И.Б., Палка И.П., Чичканова Г.Г., 2009; Медведев В.Э., 2013).

При токсических воздействиях, как правило, реагируют микросомы клеток и их составляющий цитохрома Р-450, участвующий в обезвреживании этих начал. Аналогично этому данный гемсодержащий белок реагирует и на лекарственные вещества, выступая либо в роли ингибитора или индуктора. Эти влияния необходимо учитывать при использовании не одного, а ряда препаратов (Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В., 2008; KoJ. W., Sukova N., Thacker D., 1997; Testa V., Kramer S.D., 2008). Индуцирующий или ингибирующий эффект афобазола оценили по абсолютным величинам метаболических отношений препарата-маркера - лозартана. При многократном увеличении эффективной дозы (в 5-25 раз) установлен умеренный индуцирующий эффект афобазола на CYP2C9 (Грибакина О.Г., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и др., 2013).

Для афобазола характерна селективность влияния, что способствует устранению бензодиазепиновых побочных эффектов. Показано, что фабомотизол обладает мягким активирующим действием, улучшает психофизиологические показатели: кратковременную зрительную память концентрацию внимания и реализацию функции (Колуцкая Е.В., 2013).

В многочисленных исследованиях, проведенных на базе 5 ведущих НИИ Российской Федерации, был доказан высокий эффект анксиолитика-афобазол, не уступающего препарату диазепаму, при расстройствах адаптации, протекающих с симптомами тревоги (Колуцкая Е.В., 2013).

Особенностью препарата по данным литературы является его стабилизирующее действие на центральную нервную систему (Коллюцкая Е.В., 2013).

После парентерального введения афобазол метаболизируется и появляются в крови его метаболиты 6,7 и 11 (М-6, М-7 и М-11), которые определяются длительностью до трех часов. Для афобазола характерна средняя степень проникновения в мозг и высокая абсолютная биодоступность (Серединин С.Б., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б. и др., 2007).

«Выявление антимуtagenных свойств афобазола в совокупности с известными сведениями о генотоксических и прооксидантных механизмах тератогенеза определило целесообразность исследования влияния анксиолитика на тератогенные эффекты циклофосфана» (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Серединин С.Б., 2009).

Учеными проведены исследования влияния афобазола на состояние мозга при дефиците кислорода в тканях при экспериментальном некрозе миокарда и сочетаниях повреждений кровообращения в сердечной мышце и ЦНС по сравнению с контрольными и псевдооперированными животными. Установлено исследованиями, что дозировка 5 мг/кг препарата увеличивает скорость кровотока к коре больших полушарий (в теменной области) на фоне общей и недолговременной ишемии мозга или при некрозе миокарда в эксперименте. Анализ этих данных был проведен по сравнению с контрольными и псевдооперированными животными. Одновременное наличие сосудистой патологии мозга и сердца афобазол корректирует, при этом значительно увеличивается реакция сосудов мозга на фоне дефицита кислорода или некроза миокарда (Мирзоян Р.С., Хайлов Н.А., Ганьшин Т.С., 2010).

Все действия, направленные на уменьшение тревоги, одновременно повышают стрессоустойчивость через реализацию противотревожных механизмов (Полковникова Ю.А., Степанова Э.Ф., Куль И.Я., 2010). Н.В. Каверина, Е.П. Попова, М.А. Яркова, С.Б. Серединин, 2009 изучали "изменение вариабельности сердечного ритма при формировании эмоционально-

стрессового ответа и на фоне анксиолитка афобазола у крыс с различным типом поведения в тесте «открытое поле». Подопытные животные были разделены на стресс-устойчивых крыс и стресс-неустойчивых. Если характеризовать стресс-неустойчивых, то следует отметить преобладание у них симпатической нервной системы и снижение частоты variability сердечного ритма. В противоположность этому у стресс-устойчивых активируется парасимпатическая нервная система и имеет место увеличение низких частот сердечного ритма (Broadhurst P.L., 1975; Fuller J.L. and Thompson W.R., 1960; Hall C.S., 1951; Каверина Н.В., Попова Е.П., Яркова М.А., Серединин С.Б., 2009).

Таким образом, проведенный сопоставительный анализ результатов действия афобазола и анксиолитика диазепама, показал выраженную анксиолитическую активность исследуемого препарата в отношении генерализованной тревоги. Отличительными особенностями по сравнению с диазепановыми действия афобазола являются динамика анксиолитического эффекта преимущественного "влияния на когнитивную составляющую, хорошая переносимость, отсутствие синдрома отмены" (Аведисова А.С., Чахава В.О., Лесс Ю.Э., Малыгин Я.В., 2006).

Доклинические испытания фабомотизола установили, что оказывая анксиолитическое действие, препарат не имел седативного эффекта у крыс, устойчивых к стрессу. Эффективность препарата как избирательного анксиолитика отличается высоким уровнем (Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., 2001; Yarkova M.A., 2005). Показано наличие активирующего компонента в действии фабомотизола (Чумаков Д.В., 2004). Обладает мягким активизирующим действием, не имеет седативных побочных влияний, характеризуется быстрым началом действия (Kolotilinskaya N.V., Badyshov V.A., Makhnycheva A.L., 2005; Syunyakov S.A., Chumakov D.V., Mametova L.E., 2005). Исследованиями авторов (Смулевич А.Б., Андрющенко А.В., Романов Д.В., Сиранчиева О.А., 2006; Воронина Т.А., Серединин С.Б. и др., 2002; Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Серединин С.Б., 2001; Серединин

С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г. и др., 1998; Баласанян М.Г., 2003; Баласанян М.Г., 2003) установлена оптимальная терапевтическая доза афобазола с 1-го дня лечения.

Показано также, что афобазол значительно повышает выживаемость крыс при экспериментальной ишемии мозга, что связано со значительным улучшением кровоснабжения, играет существенную роль в реализации его нейропротекторного эффекта. Показано, что афобазол в опытах *in vitro* инактивирует свободные радикалы. В опытах *ex vivo* у животных с выраженной реакцией страхов препарат предотвращает снижение ГАМК-бензодиазепиновой рецепции в нейрональных мембранах и восстанавливает чувствительность мембран к ГАМК и ионам Cl^- , что способствует усилению ГАМК-трансмиссии (Воронина Т.А., Серединин С.Б. и др., 2002; Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Серединин С.Б., 2001; Серединин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г. и др., 1998). На экспериментальной модели ишемического поражения, выявлено нейропротекторное действие афобазола, проявляющееся в способности препарата препятствовать развитию патоморфологических изменений ткани мозга, как при предварительном, так и при лечебном применении препарата (Баласанян М.Г., 2003; Баласанян М.Г., 2003; Силкина И.В., Александрин В.В., Ганьшина Т.С., Серединин С. Б., Мирзоян Р.С., 2004).

Оценивая механизм действия афобазола следует отметить, что у 66 пациентов с тревожными расстройствами при группе контроля 33 здоровых добровольцев, выявлено достоверное ($p < 0,05$) более чем двукратное увеличение уровня конечного продукта ПОЛ в плазме крови сравнительно со здоровыми лицами при отсутствии различий между разными группами лечения. Выявлено исследованиями ученых, что селективный анксиолитик афобазол наряду с феназепамом оказывает антиоксидантное действие по данным уменьшения вторичного продукта ПОЛ - МДА. Существуют индивидуальные различия содержания МДА в крови больных с тревожным состоянием как на фоне феназепама, так и афобазола. Следует отметить, что между показателями психопатологий и интенсивностью процесса ПОЛ существует корреляционная

связь. Статистически доказано, что лечение афобазолом характеризуется значимыми показателями корреляции между клиническим состоянием больного и содержанием МДА. В исследованиях ряда авторов существующие отличия действия афобазола и феназепам на интенсивность ПОЛ и клинико-биохимические показатели выявляют особенности характера влияния этих препаратов.

Александровский Ю.А., Поюровский М.В. и Незнамов Г.Г. (1991) придают процессам липопероксидации важную роль в развитии эмоционального стресса, психических расстройств и другой патологии ЦНС (Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., 1991). Высокая степень потребления кислорода при недостаточной активности АОС является уязвимым для мозга и стимулирует чувствительность к окислительному стрессу (Ng F., Berk M., Dean O., Bush A.I., 2008; Halliwell B., 2006; Novatta I., Juhila J., Donner J., 2010). В нервной системе в связи с особенностями обмена наиболее ярко выявляется двойственная роль, постоянно генерируемых в клетке активных метаболитов кислорода – таких как супероксидный радикал и пероксид водорода. Реактивные формы кислорода принимают участие в поддержании гомеостаза, реализуют значимые функции клеточных сигналов, иммунобиологических ответов и процесса апоптоза. Все эти формы участия могут повреждать макромолекулы, что в то же время приводит к развитию разных нарушений в живых системах (Delattre J., Beaudoux J-L., Bonnefont-Rousselot D., 2007; Valko M., Leibfritz D., Moncol J., 2007; Aitken R.J., Roman S.D., 2008).

Активация липопероксидации характерна при разной психической патологии: при неврозах (Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., Середенин С.Б., 1988; Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., 1991), депрессивных состояниях (Bilici M., Efe H., Köroğlu M.A., 2001; Yager S., Forlenza M.J., Miller G.E., 2010; Leonard B., Maes M., 2012), эндогенных заболеваниях (Кротенко Н.М., Смирнова Л.П., Логинов В.Н., 2010; Bitanahirwe ВКУ, Woo TUW., 2011; Прилипко Л.Л., Ерин А.Н., Беляев Б.С.,

1987; Озорнина Н.В., Озорнин А.С., Говорин Н.В. Терешков П.П., 2011; Boskovic M., Vovk T., Kores Plesnicar B., Grabnar I., 2011). В последние годы в исследованиях ученых появляется все больше данных, которые способны подтвердить взаимосвязь между активностью ПОЛ, содержанием МДА и выраженностью клинического состояния у здоровых и у людей с невротами (Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., 1991; Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., Середенин С.Б., 1988). Повышение уровня пероксидации обнаружено в плазме крови больных при системном тревожном расстройстве (Bulut M., Selek S., Bez Y., 2013; Kaya M.C., Bez Y., Karababa I.F., 2013), социальной фобии (Atmaca M, Tezcan E., Kuloglu M., 2004; Atmaca M., Kuloglu M., Tezcan E., Ustundag B., 2008), обсессивно-компульсивном (Chakraborty S., Singh O.P., Dasgupta A., 2009; Behl A., Swami G., Sircar S.S., 2010), паническом (Kuloglu M., Atmaca M., Tezcan E., 2002; Gull G., Karlidag R., Cumurcu B.E., 2013) и других тревожных состояниях (Ng F., Berk M., Dean O., Bush A.I., 2008; Novatta I., Juhila J., Donner J., 2010; Gingrich J.A., 2005; Bouayed J., Rammal H., Soulimani R., 2009).

В этиологии и патогенезе психофизиологических состояний играет роль повышение активности СРО и дисбаланс в окислительно-восстановительных реакциях у больных, леченных бензодиазепинами (Феназепамом и уксепамом) (Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., 1991). Происходит снижение уровня МДА в крови больных и повышение уровня основного компонента АОЗ – а-токоферола (витамина Е) (Бурлакова В.Б., 1982). Снижение повышенного уровня МДА в сыворотке крови больных с генерализованным тревожным расстройством и повышение активности ферментов АОС происходит в результате терапевтического применения антидепрессантов (Khanna R.S., Negi R., Pande D., 2012). Выявлены значимые данные для суждения о взаимосвязях процессов ПОЛ с действием анксиолитиков и эффективностью феназепама на фоне стрессовых состояний у больных. Происходит корреляция концентрации МДА в плазме крови и показателями стресс-синдрома на фоне терапии (Александровский Ю.А.,

Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., 1991). Вышеуказанное послужило основанием для проведения сопоставительного исследования влияния афобазола и других психотропных веществ на терапевтическое действие и ингибирование перекисидации липидов при стрессовых ситуациях (Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С., Золотов Н.Н., Колясникова К.Н., Метлина М.В., 2014).

Следует отметить антитератогенное действие афобазола, поскольку он ингибирует активные радикалы кислорода, обладая антимутиационным действием (Зенина Т.А., Гавриш И.В., Мелкумян Д.С., Серединина Т.С., Серединин С.Б., 2005; Зенина Т.А., Силкина И.В., Серединин С.Б., Мирзоян Р.С., 2006; Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Серединин С.Б., 2000). Т.о., афобазол обладает весьма уникальными и защитными свойствами: цитопротекторной, антиоксидантной, антимутагенной, антитератогенной и, возможно, антиканцерогенной активностью. Это открывает очевидные перспективы дальнейших экспериментальных и клинических исследований афобазола в качестве профилактического средства (Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Серединин С.Б., 2009).

Показано, что после введения афобазола в условиях ишемии в коре наблюдается тенденция к снижению концентрации продуктов индуцированного окисления. В стриатуме у крыс, перенесших ишемию, снижается интенсивность свободно-радикального окисления по сравнению с контролем. Афобазол вызывает частичное восстановление этого показателя. В коре в условиях ишемии афобазол увеличивает активность каталазы.

Таким образом, афобазол способствует повышению устойчивости мембранных структур коры и стриатума к свободнорадикальным процессам. На фоне введения препарата наблюдается увеличение активности каталазы в коре головного мозга в условиях глобальной переходящей ишемии. Ранее было обнаружена способность производных 2-меркаптобензимидазола, в частности, нового селективного анксиолитика афобазола снижать мутагенные эффекты химических прооксидантов за счет нормализации процессов свободнорадикального окисления и связанного с ним возникновения

эндогенных мутагенов (Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Кулакова А.В., 2001; Серединин С.Б., Дурнев А.Д., 1992). Установлено, что афобазол обладает выраженной нейропротекторной активностью, о чем свидетельствуют опыты с использованием моделей локальной и глобальной ишемии мозга (Баласанян М.Г., 2003; Силкина И.В., Александрин В.В., Ганьшина Т.С., 2004).

В механизме действия афобазола участвует определенная последовательность реакций, которая участвует в реконструкции «белков мембраны и ГАМК-БД-рецепторов, их чувствительности к собственному медиатору торможения – ГАМК. В сравнительных исследованиях было показано, что эффективность афобазола не уступает БД в регулировании соматических проявлений тревожных расстройств. У пациентов с сопутствующими соматическими заболеваниями афобазол оказался эффективным в сочетании с традиционным лечением» (Свищенко Е.П., Гулкевич О.В., 2014).

Афобазол, как производное меркаптобензимидазола, тормозит формирование изменений в мембранах клеток, особенно в рецепторном комплексе ГАМК-бензодиазепиновом. При эмоционально-стрессовых реакциях афобазол - "короткоживущее" лекарственное средство оказывается более эффективным, нежели бензодиазепины. Афобазол имеет следующие характеристики: период полувыведения $0,82 \pm 0,54$ ч, высокий клиренс, большая скорость поступления препарата из крови в ткани и органы (Немченко О.И., 2007). Установлено сродство к σ^1 рецепторам $IC_{50} > 10^{-4}$ М). Методом радиолигандного анализа у беспородных мышей CD-1 на модели клеточной линии Т-лимфоцитов человека сделано заключение, что метаболит афобазола М-11 не реагирует с сигма-1 чувствительными нервными окончаниями (Ряскина Е.В., Воронин М.В., Серединин С.Б., 2012).

На различных экспериментальных моделях установлена нейропротекторная активность афобазола (Галаева И.П., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., 2005; Антипова Т.А., Сапожникова Д.С., Бахтина Л.Ю., 2009; Cuevas J., Behensky A., Deng W., 2011). В фармакокинетических экспериментах

выделен основной метаболит афобазола – соединение М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)этилтио]-5-этоксibenзимидазол гидрохлорид) (Виглинская А.О., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., 2007), изучение фармакологического действия которого представляет интерес. Принимая во внимание значимость σ^1 рецепторов в механизмах обеспечения активного функционального состояния клеточной мембраны и белковых комплексов, в поддержании энергетического и ионного баланса нейрона (Hayashi T. and Su T., 2005; Tsai S.Y., Hayashi T., Mori T., 2009; Banister S.D. and Kassiou M., 2012), установленный характер взаимодействия изученных соединений с σ^1 рецепторами позволяет заключить, что имеют место различия в фармакологических эффектах афобазола и М-11. Они могут быть обусловлены недостаточной аффинностью М-11 к σ^1 рецепторам (Ряскина Е.В., Воронин М.В., Серединин С.Б., 2012), тогда как у афобазола высокое сродство к G-рецепторам (Медведев В.Э., Добровольский А.В., Троснова А.П., 2006).

Данными Ajmo C.T.Jr., Vernon D.O., Collierb L. et al., 2006 установлено, что, те соединения, которые реализуют свое действие через σ_1 -рецепторы способны влиять на патологическую зону. Этот эффект агонистов σ_1 -рецепторов, по-видимому, комплексный и в его основе лежит защита ишемически поврежденных клеток от перегрузки ионами Ca^{2+} , уменьшение тонуса симпатической нервной системы - защита клетки миокарда от свободнорадикальной агрессии (Hanner M., Moebius F.F., Flandorfer A., et al., 1996; Tchedre K.T., Huang R.Q., Diba sA. et al., 2008; Власов А.П., Григорьева Т.И., Лещанкина Н.Ю. и соавт., 2009; Zhang H., Cuevas J., 2002; Tchedre K.T., Yorio T, 2008; Halliwell B., 2006).

Характеризуя σ_1 -рецептор, следует отметить его локализацию преимущественно на микросомах (Morin-Surun M.P., 1999; Aydar E., 2002). Поскольку одним важным механизмом действия афобазола является включение σ_1 -рецептора в плазматическую мембрану клетки в составе липидных микросоставляющих, следует заметить, что как все рецепторы σ_1 воспринимающий аппарат находится в липидной фазе мембраны и окружен

сфинголипидами и холестерином. Эти структуры образуют рецепторный аппарат, каналы для транспорта ионов и ферментов (Серединин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г. и др., 1998; Серединин С.Б., Воронин М.В., 2009; Hayashi T. and Su T.P., 2005).

Следует отметить логическую связь между переносом σ_1 -рецептора в область цитоплазматической мембраны, что препятствует нарушению фосфолипидного состава клеточных мембран вследствие усиления перекисных реакций (Halliwell B., 2006). Такой эффект афобазола установлен Середининым С.Б., Ворониным М.В., 2009 методом конфокальной микроскопии в модельных экспериментах повреждения гиппокампа НТ-12 после 30 и 60 – мин. инкубации с веществом в концентрации 10^{-8} М. Влияние липопероксидации на конформацию важных белков и в частности, для ГАМК_A-рецепторов в эксперименте с афобазолом было показано *ex vivo* (Серединин С.Б., Воронин М.В. 2009). Адаптационные свойства афобазола были показаны на моделях оксидативного стресса и глутаматной токсичности. Установлена его способность обратимо ингибировать МАО (Зенина Т.А., Гавриш И.В., Мелкумян Д.С. и др., 2005; Зенина Т.А., Силкина И.В., Серединин С.Б. и др., 2006). Т.о., афобазолу присущи нейропротекторные свойства.

Авторы допускают, что подавление свободно-радикальной агрессии афобазола обусловлено способностью агонистов σ_1 -рецепторов уменьшать активность индуцибельной нитрооксидсинтазы – iNOS (Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R., 2006). В литературе последнее время уделяется особое внимание исследователями на участие iNOS в развитии ишемии миокарда (Somers J.R., Beck P.L., Lees-Miller J.P. et al., 2008). Возможно, подавление лигандами σ_1 -рецепторов активности iNOS способствует увеличению синтеза ишемизированным миокардом конститутивной нитрооксидсинтазы – eNOS (NOS-3), которая способствует защите кардиомиоцитов от свободнорадикального повреждения (Calvert J.W., Lefter D.J., 2009).

Глава 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования: характеристика по группам подопытных крыс

Для реализации поставленной цели моделировали дефицит оксида азота введением хлорида кобальта и N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) Sigma-неселективный блокатор NO-синтазы и их комбинацией на крысах линии Wistar. Было использовано 190 голов крыс-самцов одного возраста (10-14 мес.), массой 175 - 220 г., для которых условия содержания в виварии и ход экспериментов отвечали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» МЗ СССР (1977 г.) и соответствовали принципам, изложенным в Хельсинской декларации (2000 г.). В течение эксперимента крысы содержались на водно-пищевом режиме без присутствия нитратов. Интактные животные входили в контрольную группу (n=30). Моделировали токсические условия и дефицит NO введением соли кобальта (2 мг/кг массы животного) и L-NAME, а также их комплексом. Эксперимент заканчивался через 30 дней.

Распределение экспериментальных животных - крыс:

1. контрольная группа – 30 голов;
2. подопытные крысы с экспозицией хлоридом кобальта без лечения – 20 голов;
3. интактные крысы + L-аргинин в дозе 10 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
4. интактные крысы + модифицированный L-аргинин (L-NAME) в дозе 25 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
5. крысы с Co + модифицированный L-аргинин (L-NAME) в дозе 25 мг/кг (30 дней) – 20 голов;
6. крысы с Co + L-аргинин в дозе 10 мг/кг (30 дней) – 20 голов;
7. крысы с Co + афобазол в дозе 10 мг/кг веса животного в течение 30 дней – 20 голов;

8. крысы с Со + афобазол в дозе 10 мг/кг веса животного + L-аргинин 10 мг/кг (30 дней) – 20 голов;

9. крысы с Со + афобазол (10 мг/кг веса подопытного животного) + модифицированный L-аргинин (L-NAME) (25 мг/кг), длительность экспозиции - 30 дней – 20 голов;

У подопытных крыс в гемолизате красных кровяных клеток, гомогенатах гепатоцитов, сердечной и почечной тканях определяли концентрацию вторичного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (Asakawa T., Matsushita S., 1980), активность ферментов каталазы (Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., 1988), супероксиддисмутазы (Макаревич О.П., Голиков П.П., 1983) и концентрацию церулоплазмина (Камышников В.С., 2003). По модифицированной методике Метельской В.А., 2005 исследовали содержание в плазме крови стабильных суммарных конечных метаболитов оксида азота (NO_2^- и NO_3^- , или NO_x). В эксперименте с введением субстрата L-аргинин и аналога эндогенного ингибитора АДМА - L-NAME определяли влияние этих регуляторов на процесс пероксидации липидов, содержание NO_x , обмен ХС. Данные метаболизма ХС использовали для оценки роли ХС ЛНП в нарушении биодоступности NO. О функциональном состоянии внутренних органов судили по Na-транспортирующему энзиму в гомогенатах внутренних органов и содержанию органоспецифических ферментов в сыворотке крови: АсАТ, АлАТ, ГГТП и экскреторного фермента – щелочной фосфатазы (ЩФ). Для получения необходимых показателей использовали традиционные биохимические методы. Достоверность наблюдавшихся изменений параметров определяли методом вариационной статистики, средние значения (M), среднюю ошибку средней арифметической ($\pm m$). Вероятность возможной ошибки (p) рассчитывали с использованием T-test для групп с различной дисперсией. Различия оценивали как достоверные при $p < 0,05$. Статистические расчеты проводили по программе статанализа «Statistika 6.0 for Windows» фирмы «Stat Soft, Juc» и «Microsoft Office Excel 2003», оценивали корреляционные связи.

2.1.1. Интенсивность общего патологического процесса по данным содержания МДА в эритроцитах

Степень пероксидации в почечной, сердечной и печеночной тканях изучали по изменению концентрации вторичного продукта ПОЛ – МДА методом Asacawa T., 1980. При взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), соблюдая условие – высокую температуру, образуется цветной комплекс с максимумом оптической плотности при длине волны 532 нм. Запускали процесс перекисного окисления Fe^{2+} . Из промежуточных продуктов образуется свободный радикал, превращающийся в МДА.

2.1.2. Определение вторичного продукта ПОЛ – МДА

Эритроциты крови, взятой с трилоном, отмывали в 0,9% растворе хлорида натрия 10 минут и троекратно центрифугировали при 1500 об/мин. Убирали надосадочную жидкость, выделяли эритроцитарную массу, гомогенизировали разведенные в 10 раз эритроциты замораживанием. К гомогенату добавляли 20% раствор ТХУК и после центрифугирования и инкубации в кипящей водяной бане определяли оптическую плотность при λ 532 нм. Белок определяли методом Lowry O.H., et al., 1951.

2.2. Определение защитных механизмов от СРО

2.2.1. Определение активности супероксиддисмутазы (СОД)

В гомогенате эритроцитов активность СОД определяли методом аутоокисления адреналина (Макаревич О.П., Голиков П.П., 1983). Он основан на способности супероксиддисмутазы тормозить реакцию аутоокисления адреналина до адренохрома при $pH=10,2$.

На спектрофотометре накопление адренохрома (R), сопровождающееся увеличением оптической плотности, регистрируется при длине волны 480 нм. По формуле рассчитывали активность СОД, выражали в усл. единицах оптической плотности:

$$T\% = \frac{E_{\text{контр}} - E_{\text{оп}}}{E_{\text{контр}}} \times 100 (\text{торможение реакции}) \quad A = \frac{T\%}{100\% - T\%} \times 2$$

где А – активность СОД в 1 мл пробы в кювете в условных единицах;

2 – в пробу взято 0,5 мл сыворотки;

T% - процент торможения реакции.

2.2.2. Определение активности каталазы

О состоянии АОС мы судили по активности каталазы в сыворотке крови, которую определяли спектрофотометрически методом Королюка М.А. (1988).

Каталаза предотвращает накопление перекиси водорода, которая образуется при дисмутации супероксидного аниона под действием фермента СОД



Перекись водорода образует с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. Эта способность и лежит в основе метода определения. К 2 мл 0,03 раствора перекиси водорода добавляется 0,1 мл сыворотки крови и запускается реакция. В контрольную пробу вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Через 10 минут добавляли 1 мл 4% молибдата аммония и останавливали реакцию. Интенсивность окрашивания измеряли на спектрофотометре (410 нм) относительно контроля. Активность каталазы сыворотки рассчитывали по формуле: $E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) V t K$; где E – активность каталазы (в мкат/л); $A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}$ – экстинкция холостой и опытной проб; V – объем вносимой пробы – 0,1 мл; t – время инкубации 600с; K – коэффициент миллимолярной экстинкции перекиси водорода, равный $2,22 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Таким образом, активность каталазы выражали в мкат/л.

2.2.3. Метод Равина - определение уровня церулоплазмина в сыворотке крови

Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии ЦП. Добавлением NaF останавливали ферментативную реакцию. Об уровне ЦП (мг/л) судили по оптической плотности продуктов реакции. В 2 пробирки – опытную и контрольную брали по 0,05 мл сыворотки, добавляли NaF 1,0 мл в контрольную пробирку. В обе пробирки затем приливали буфер CH_3COONa 4,0 мл, субстрат (фенилендиамин) 0,5 мл., встряхивали и на 1 час ставили в термостат при $t = 37^\circ\text{C}$. После чего в опытную пробирку добавляли 1,0 мл. NaF. После перемешивания поместили пробирки на лед при $t + 4^\circ\text{C}$ на 30'. Фотометрировали при длине волны 530 нм. $\text{Конц.} = E \times 875 = \text{мг/л}$.

2.3. Определение функционального состояния клеточных мембран по данным активности Na^+, K^+ -АТФ-азы в гомогенатах внутренних органов (Наточин Ю.В., Леонтьев В.Г., Маслова М.Н., 1975)

Подготовка гомогената: извлекали почки, печень и сердце. Выделяли корковое и мозговое вещество почек, печени и сердца на льду. Замороженные ткани растирали в растворе сахарозы в соотношении: 1 объем ткани / 9 объемов сахарозы. Полученный гомогенат ткани центрифугировали при 1000 – 2000 об/мин. После центрифугирования в надосадочной жидкости по методу Скоу определяли активность Na^+, K^+ -АТФ-азы (Болдырев А.А., 1992; Scou J.C., 1957), т.е. по увеличению в среде Рн, добавляя АТФ и выдерживая на водяной бане. Расчетным путем определяли удельную активность энзима.

2.4. Определение маркера дисфункции эндотелия сосудов - оксида азота (суммарных метаболитов) в сыворотке крови (Метельская В.А., Гуманова Н.Г., 2005)

«Способ косвенной оценки NO-продуцирующей функции эндотелия сосудов заключается в количественном определении маркера функциональной активности эндотелия – оксида азота (NO) по уровню его конечных стабильных

метаболитов (суммарных нитратов и нитритов, NO_2+NO_3 , или NO_x) в минимальном (100мкл) объеме сыворотки крови или другой биологической жидкости путем одновременного восстановления нитратов в нитриты в присутствии хлорида ванадия (VCl_3) и образовании окрашенного соединения в ходе реакции диазотирования (реакция Грисса); интенсивность окраски зависит от концентрации нитритов и определяется спектрофотометрически при 540 нм.

Описание медицинской технологии: Метод определения уровня стабильных конечных метаболитов NO , а именно NO_2^- и NO_3^- (NO_x) в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча), как показателя функциональной активности эндотелия сосудов.

Принцип метода заключается в том, что из сыворотки крови с помощью этилового спирта удаляются белки (депротеинизация), затем проводится одноэтапное количественное определение суммарных нитратов и нитритов, одновременно восстанавливаются нитраты в нитриты в присутствии хлористого ванадия (VCl_3), происходит реакция диазотирования образовавшимся нитритом сульфаниламида. В результате этой реакции развивается розовая окраска, интенсивность которой, соответствует концентрации нитритов и определяется спектрофотометрически» (Метельская В.А., Гуманова Н.Г., 2005).

2.5. Определение активности ферментов: АсАТ, АлАТ, ГГТП и щелочной фосфатазы

Активность АсАТ и АлАТ определяли унифицированным методом Райтмана-Френкеля, используя наборы реагентов фирмы «Витал Диагностика Спб».

Определение активности ГГТП

Наборами этой же фирмы определяли активность γ -глутамилтрансферазы в сыворотке крови. Применили метод, основанный на образовании п-нитроанилина, оптическую плотность определяли на спектрофотометре (405 нм).

Определение активности щелочной фосфатазы

Активность ЩФ определяли в сыворотке крови. Метод основан на образовании п-нитрофенола из п-нитрофенилфосфата и воды. Количество п-нитрофенола (СФ, 405 нм) было пропорционально активности фермента.

2.6. Определение содержания общего холестерина

Концентрация общего холестерина (ОХС) определяли энзиматическим колориметрическим методом. Свободный холестерин способен окисляется O_2 воздуха с участием холестеролоксидазы. Образовавшаяся перекись водорода действует на хромогенные субстраты, окисляя их. Образуется цветной продукт реакции, оптическая плотность которого соответствует концентрации ХС.

2.7. Методика определения ХС ЛВП и ЛНП

Концентрацию ХС ЛВП определяли наборами фирмы «Витал Диагностикс», которые относятся к серии «Европа» и соответствуют международным стандартам. Основной принцип метода: хиломикроны, ЛПОНП (VLDL) и ЛПНП (LDL) осаждаются при добавлении фосфорновольфрамовой кислоты и Mg^{2+} в сыворотку крови. В супернатанте после центрифугирования остаются только ЛПВП (HDL), концентрация которых определяется аналогично определению концентрации ОХС энзиматическим методом.

Для определения используется осаждающий реагент №1 – фосфорновольфрамовая кислота, хлорид магния и калибратор с содержанием холестерина 1,29 ммоль/л (50мг/100мл). В сыворотку крови (0,15мл) добавляют осаждающий реагент (0,3мл), в контрольную (холостую) пробу - такой же объем воды; калибратора набирают в пробирку тоже 0,15 мл. После тщательного перемешивания пробы оставляют при комнатной температуре 10 минут. Через 10 мин опытные образцы центрифугируют в течение 10 минут. В супернатанте определяют ХС ЛВП, аналогично определению общего холестерина. Рассчитывают концентрацию (с) ХС ЛВП по формуле

$c = E_{оп} / E_{кал} \times 1,29$ (ммоль/л) или $c = E_{оп} / E_{кал} \times 50$ (мг/100мл).

Концентрацию ХС ЛНП рассчитывают по формуле Фридвальда

$C = [\text{общий ХС}] - [\text{ХС ЛВП}] - [\text{триглицериды}/2,2]$ ммоль/л

2.8. Определение концентрации триацилглицеридов

Содержание в сыворотке крови ТАГ изучали ферментативным методом, (наборами реагентов фирмы «Витал»), основанным на способности триацилглицеридов расщепляться липазой на глицерин и жирные кислоты. В соответствии с этим происходит отщепление от ТАГ жирных кислот, глицеринов в реакции, катализируемой липазой. В последующей реакции идет фосфорилирование по 3-му углероду, и остаток фосфорной кислоты отщепляется от аденозинтрифосфата. Ход этой реакции катализируется фосфаткиназой глицерина. Окисление глицерол-3-фосфата происходит под влиянием кислорода. Реакция катализируется оксидазой, а продуктом реакции является фосфодиоксиацетон и 2 пероксида. Пероксид реагирует с 4-аминоантипирином, обязательно присутствие 4-хлорфенола и энзима пероксидазы. Конечным продуктом цепи реакции является хинонеимин, концентрация которого определяется по изменению цветовой гаммы на спектрофотометре и это прямо пропорционально содержанию ТАГ.

Глава 3
СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ.
ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И NO-ПРОДУЦИРУЮЩАЯ ФУНКЦИЯ
ЭНДОТЕЛИЯ У КРЫС НА ФОНЕ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ
КОБАЛЬТА

3.1. Изменения состояния общего патологического процесса ПОЛ и
содержания NO на фоне кобальтовой интоксикации и регуляторов
экспрессии eNOS

Сосудистые осложнения, лежащие в основе патологии внутренних органов, являются неотъемлемой частью токсического воздействия солей тяжелых металлов. Будучи гидрофобными, тяжелые металлы легко всасываются в кровь и, циркулируя в ней, оказывают влияние на эндотелий сосудов. Интенсификация окислительных процессов нарушает функцию эндотелия, и продукцию оксида азота. Поскольку основным производителем оксида азота является эндотелиальная NO-синтаза (eNOS), то можно предполагать его участие в развитии дисфункции эндотелия. С другой стороны, это может быть связано с понижением содержания оксида азота, вследствие его реакции с супероксид анион радикалом, скорость, которой в 3 раза опережает скорость реакции, катализируемой СОД. Конечный продукт – пероксинитрит может оказывать повреждающее действие на сосудистую систему и внутренние органы. Учитывая вышеизложенное, является актуальным исследование системы липопероксидации и антиокислительной защиты клеток (АОЗ), состояние обмена окиси азота в формировании нарушений физиологического состояния почек, печени, миокарда.

Целью этой главы явилось изучение взаимосвязи между процессами ПОЛ - антиокислительной защиты клеток (АОЗ) и метаболизмом оксида азота, а также их участие в развитии дисфункции эндотелия, нарушений функциональной картины внутренних органов. Интенсивность СРО мы исследовали по содержанию конечного продукта реакции, зависящего от

тиобарбитуровой кислоты. Это изучение производили в красных кровяных клетках - эритроцитах. О способности организма обеспечивать антирадикальную защиту от окислительных продуктов судили по активности энзимов в АОС. Функцию внутренних органов оценивали по активности липопероксидации, Na, K-зависимой АТФ-азы, а также мембранных специфичных энзимов: ГГТП, АлАТ, АсАТ и ЩФ.

Эти исследования впервые проводились при интоксикации хлоридом кобальта и его комплекса с L-NAME, а также при терапии аминокислотой L-аргинин.

В эксперименте при токсическом воздействии хлоридом кобальта имеет место интенсификация окислительных процессов, нарастание содержания конечного продукта липопероксидации в красных кровяных клетках с $4,414 \pm 0,054$ нмоль/мл до $5,65 \pm 0,045$ нмоль/мл по сравнению с исходным уровнем, т.е. на 36,6%; в гомогенатах ренальной ткани с $2,162 \pm 0,042$ нмоль/мл до $2,87 \pm 0,027$ нмоль/мл, на 32,74% в корковом веществе и на 100,5% в мозговом веществе; паренхиматозной ткани печени с $1,84 \pm 0,0412$ нмоль/мг белка до $2,71 \pm 0,019$ нмоль/мг белка, на 47,4%; сердечной мышце с $2,51 \pm 0,0507$ нмоль/мг белка до $3,6 \pm 0,015$ нмоль/мг белка, на 45%. Все эти данные получены впервые при интоксикации хлоридом кобальта в концентрации близкой к физиологической. Известно, что кобальт необходим для жизнедеятельности живых систем, включая витамин В₁₂, который играет кофакторную роль во многих химических реакциях, но даже незначительное превышение его содержания оказывает негативное действие. Интенсивность процессов липопероксидации ограничивается антиокислительной системой (АОС) организма, представленной ферментами СОД, каталаза и α -глобулином - церулоплазмин (ЦП).

Автором при таком содержании кобальта (2 мг/кг массы тела) впервые изучены системные связи с данными интенсивности липопероксидации в красных кровяных клетках и АОС. Данные показали, что чем выше содержание кобальта в крови и длительнее интоксикация, тем интенсивнее протекает СРО в

эритроцитах. Систематическая интоксикация хлоридом кобальта производилась в течение 30 дней.

При введении крысам интактным и крысам с кобальтовой интоксикацией ингибитора eNOS - модифицированного L-аргинина, интенсивность липопероксидации усиливается и возрастает содержание вторичных метаболитов ПОЛ, в частности МДА.

При системной интоксикации хлоридом Co и ингибитором eNOS автором впервые показано развитие окислительного стресса и уменьшение содержания NOx соответственно на 28% и 23,4%. Вариации в наличии NOx коррелировали с содержанием МДА – вторичного результата липопероксидации (рисунок 1).

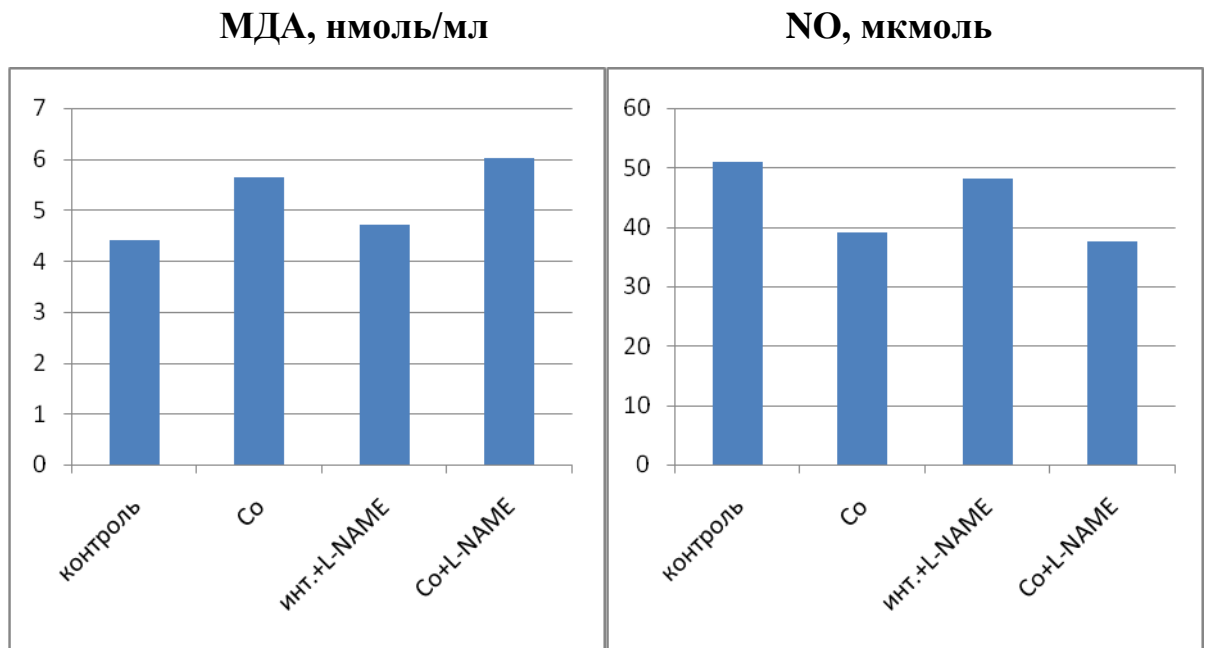


Рисунок 1 – Данные липопероксидации и содержания NO при системной интоксикации хлоридом кобальта и ингибитора eNOS - L-NAME

Анализ продемонстрировал, что существует причинно-следственная связь между содержанием NOx и интенсивностью липопероксидации. Уровень NOx зависит от указанных факторов:

1. реакции NO с супероксиданион-радикалом (O_2^-) с образованием продукта окисления, который называется пероксинитрит;
2. Окислительное влияние радикала O_2^- на ТГБП эндотелиальной NO-синтазы (eNOS).
3. Угнетение уровня воспроизведения NOS-3 и нарушение тканевой функции энзима.
4. Содержания ингибитора экспрессии eNOS.

В АОС функционируют ферменты: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, церулоплазмин и др. Впервые на фоне кобальта в дозе близкой к физиологической, автор исследовал активность супероксиддисмутазы, каталазы и концентрацию α -глобулина. Полученные результаты свидетельствуют об угнетении АОС, в частности, содержание СОД в красных кровяных клетках на значительный процент снизилось, а у каталазы выявлено увеличение активности фермента более 50%. Параллельно увеличилось содержание α -глобулина на 9,71% (рисунок 2).

Как следует из данных литературы, субстратом для образования NO является L-аргинин и его содержание, несомненно, является важным для этого процесса. Содержание субстрата для NO варьирует и зависит не только от того сколько его в крови, а как он проникает в сосудистую стенку с участием транспортного механизма. С другой стороны важно насколько L-аргинин используется в орнитинном цикле (Berkowitz D.E., WhiterLi. D. et al, 2003). следует отметить, что интенсивность работы NO-синтаза отражается на выработке оксида азота. Всё это предотвращает понижение образование оксида азота.

Использование L-аргинина энзимом синтазой оксида азота определяли в другом варианте у затравленных хлоридом кобальта животных в течение 30 дней. По окончании эксперимента в сыворотке крови определяли содержание оксида азота и активность липопероксидации. Результаты этих исследований показали, что концентрация окиси азота у подопытных животных повысилась при системной интоксикации на фоне введения L-аргинина.

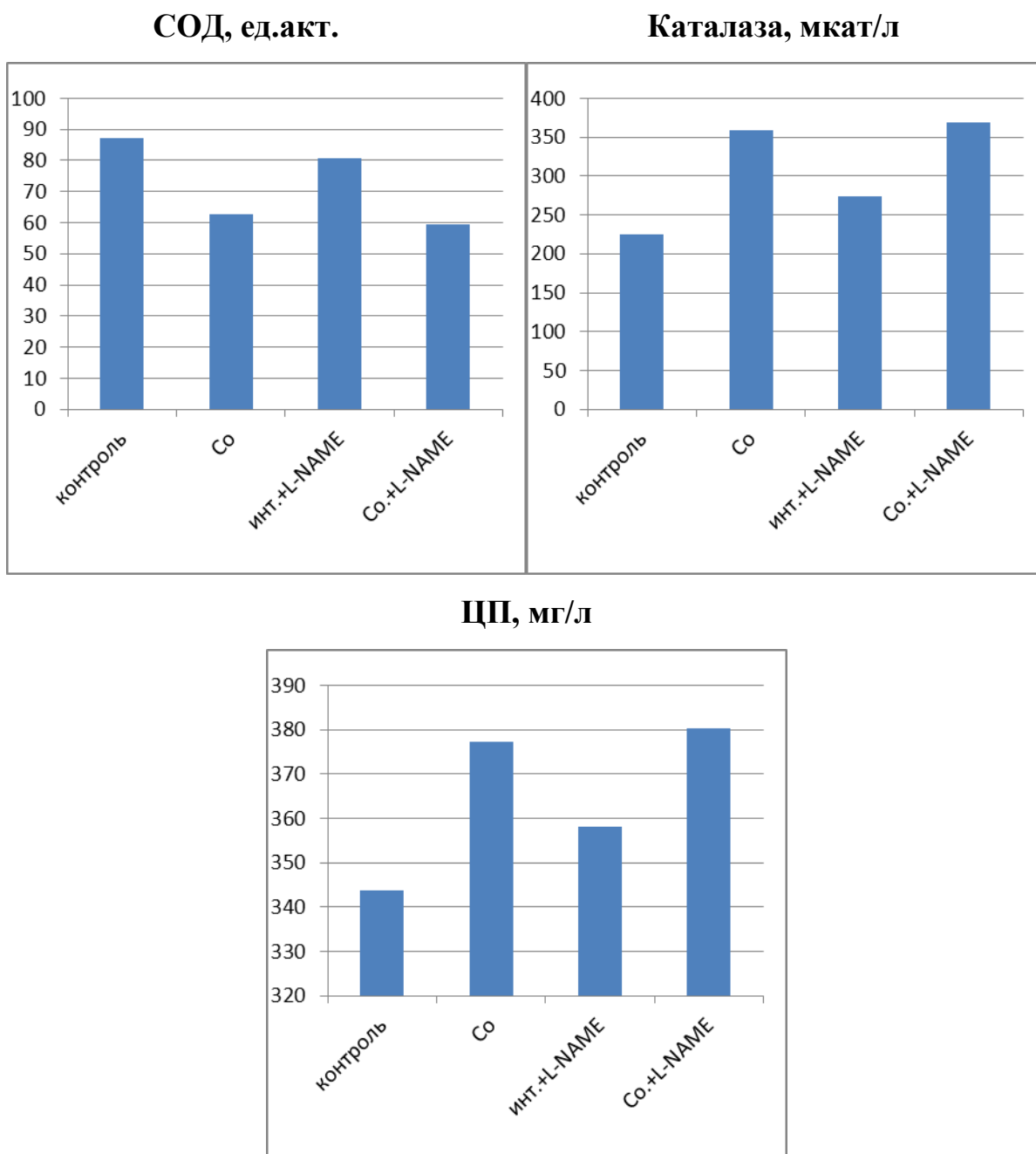


Рисунок 2 – Данные активности ферментов АОС при системной интоксикации хлоридом кобальта и введении ингибитора eNOS - L-NAME

В противоположность этому по принципу конкурентного ингибирования NO-синтазы модифицированным L-аргинином ингибируется липопероксидация, а именно вторичный результат МДА. Полученные результаты также показали, что системные токсические условия приводят к нарушению адаптационных, защитных механизмов (АОС), интенсифицирует пероксидацию липидов. Эти изменения окислительно-восстановительных

процессов в живой системе сопровождаются угнетением образования окиси азота и понижением его содержания (рисунок 3).

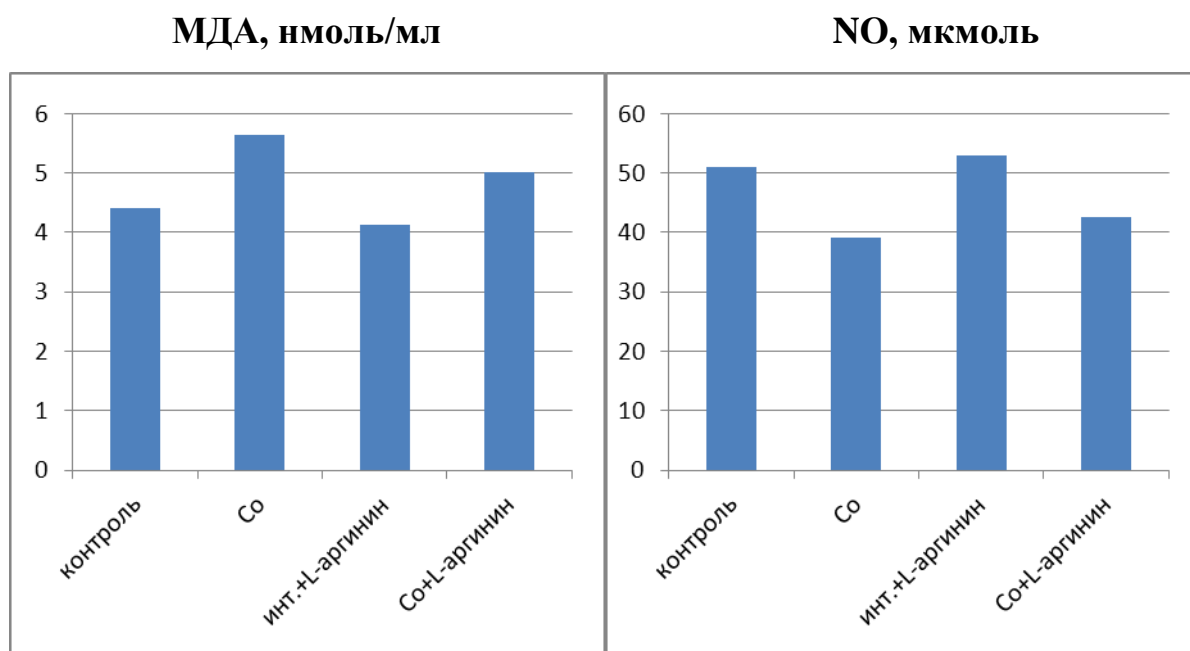


Рисунок 3 – Влияние L-аргинина на содержание МДА и NOx при системной интоксикации хлоридом кобальта

Результаты показали, что содержание конечного продукта липопероксидации понизилась у экспериментальных животных, сравнительно с вариантом без аминокислоты. АОС активировалась, в частности, СОД, а каталазы и концентрация ЦП снизились. Следовательно, L-аргинин обладает способностью у подопытных животных нормализовывать АОЗ клетки и устранить в ней расхождение и несоответствие (рисунок 4).

Известно, что каждая субъединица NO-синтазы состоит из двух доменов: редуктазного и оксидазного. Следует отметить, что это сложный ферментативный комплекс, который содержит в активном центре гем, имеет ряд коферментов, в том числе, тетрагидробиоптерин (ВН₄) осуществляя путем транспорта электронов «сопряжении» молекулярного O₂ и L-аргинина из которого и образуется оксид зота.

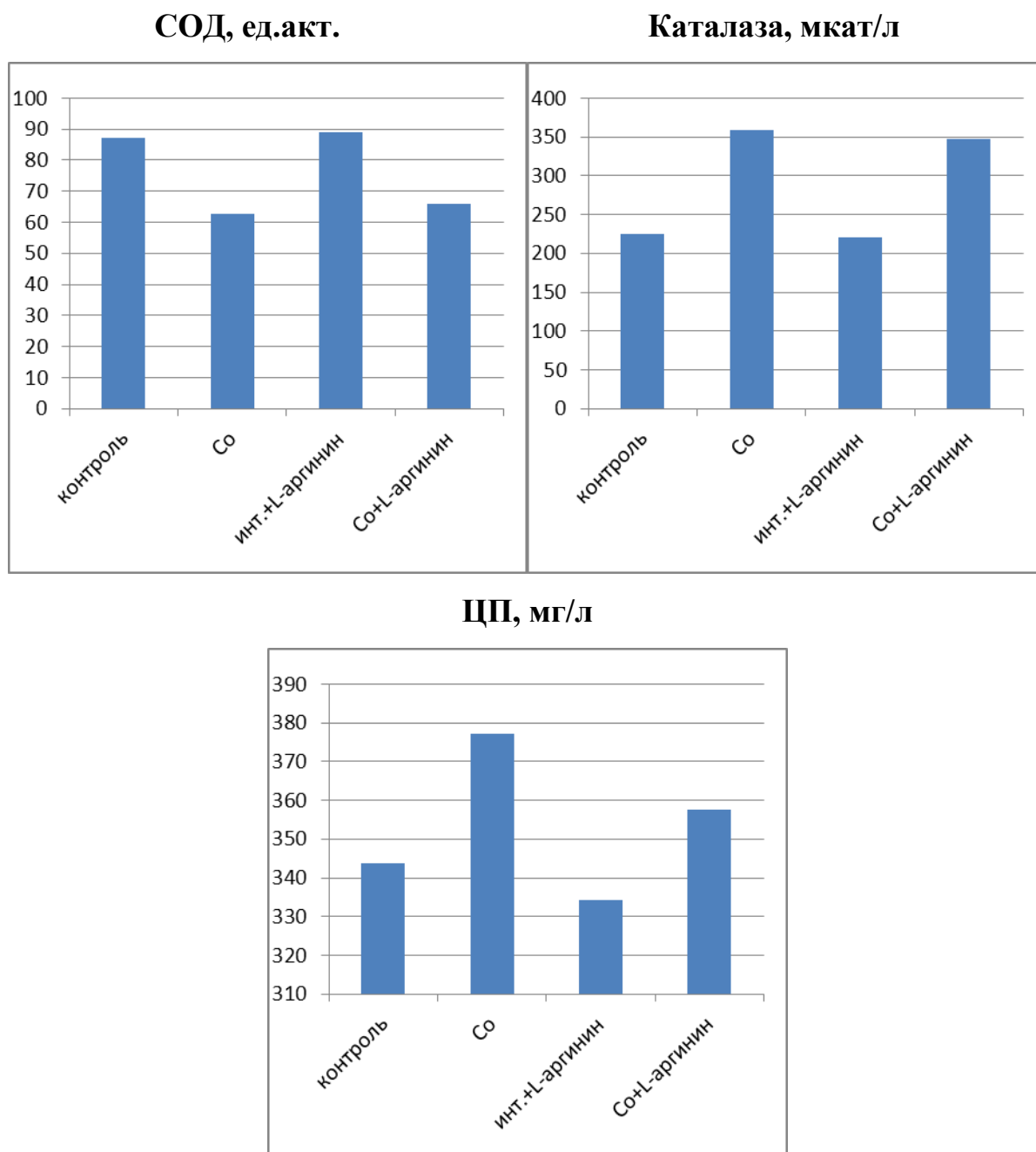


Рисунок 4 – Влияние L-аргинина на активность ферментов АОС при токсическом воздействии хлоридом кобальта

Моделирование токсической ситуации и одновременно дисфункции эндотелия введением тяжелого металла (хлорида кобальта), модифицированным L-аргинином и их комбинацией демонстрирует двоякую роль NO-синтазы, оказывается в зависимости от изменений во внутренней среде энзим способен продуцировать не только NO, но и АМК.

Можно прийти к заключению, что базальная концентрация NOx зависит от регуляторов активности NO-синтазы, L-аргинина и его модифицированного производного. Помимо этих факторов свое участие в регуляцию транспортных механизмов АК вносит и структура сосудистого эндотелия. При этом на его состояние оказывают влияние модифицированные липопероксидацией ЛНП или β -ЛП, являющиеся атерогенными. Отложение в сосудистой стенке ХС, вызывающего атерогенные изменения, может препятствовать транспорту L-аргинина в эндотелиоциты. В связи с этим, участие модифицированных β -ЛП выясняли в эксперименте.

Данные показали, что системная интоксикация хлоридом кобальта нарушает обмен холестерина, что выражается двукратным повышением общего ХС, ХС ЛНП и понижением антиатерогенных ЛВП (рисунок 5).

На сегодняшний день в науке весьма установленным является роль атерогенных ЛП в развитии атерогенеза. Мы это принимаем во внимание и считаем, что в наших экспериментальных моделях роль ХС и атерогенных ЛП несомненна. Развивается нехватка L-аргинина, из которого образуется окись азота, поэтому содержание продукта реакции понижается и нарушается его проникновение в гладкомышечную стенку сосуда. На фоне измененного обмена холестерина развиваются предатерогенные изменения в сосудистой стенке. Это отражается и на концентрации окиси азота. Выявлены межсистемные взаимосвязи между содержанием атерогенных ЛП и окисью азота, т.е. ее содержанием. Следует отметить еще повышение содержания в крови измененного L-аргинина, играющего роль ингибитора нитрооксидсинтазы.

Давая объяснение этим фактам, следует процитировать работы, свидетельствующие об изменениях в структуре энерго-образующих субклеточных фракций, в частности, митохондрий (Wagner АН, Kohler Т, 2000; Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М. и др., 2006; Chin J.H., Azhar S., Hoffman B.B. 1982; Zulli A., Widdop B., Hare D.L. et al., 2003).

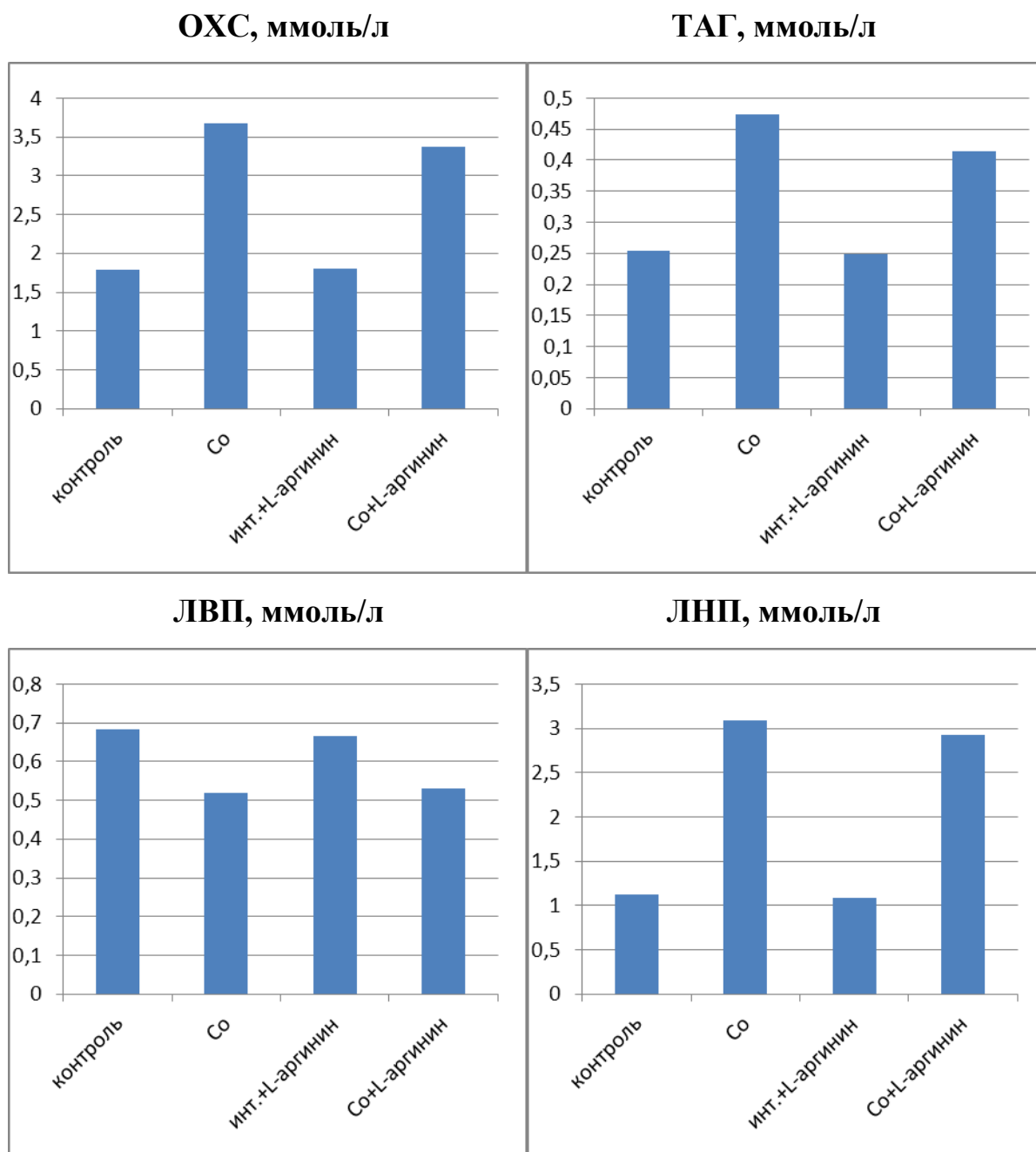


Рисунок 5 – Влияние L-аргинина на показатели обмена ХС при системной интоксикации хлоридом кобальта

На фоне введения ингибитора eNOS - L-NAME и интоксикации хлоридом кобальта участие β -ЛП еще более результативно в плане повреждения эндотелия сосудов и эти данные значительно значимы, нежели только на фоне L-NAME и интоксикацией хлоридом кобальта (рисунок 6).

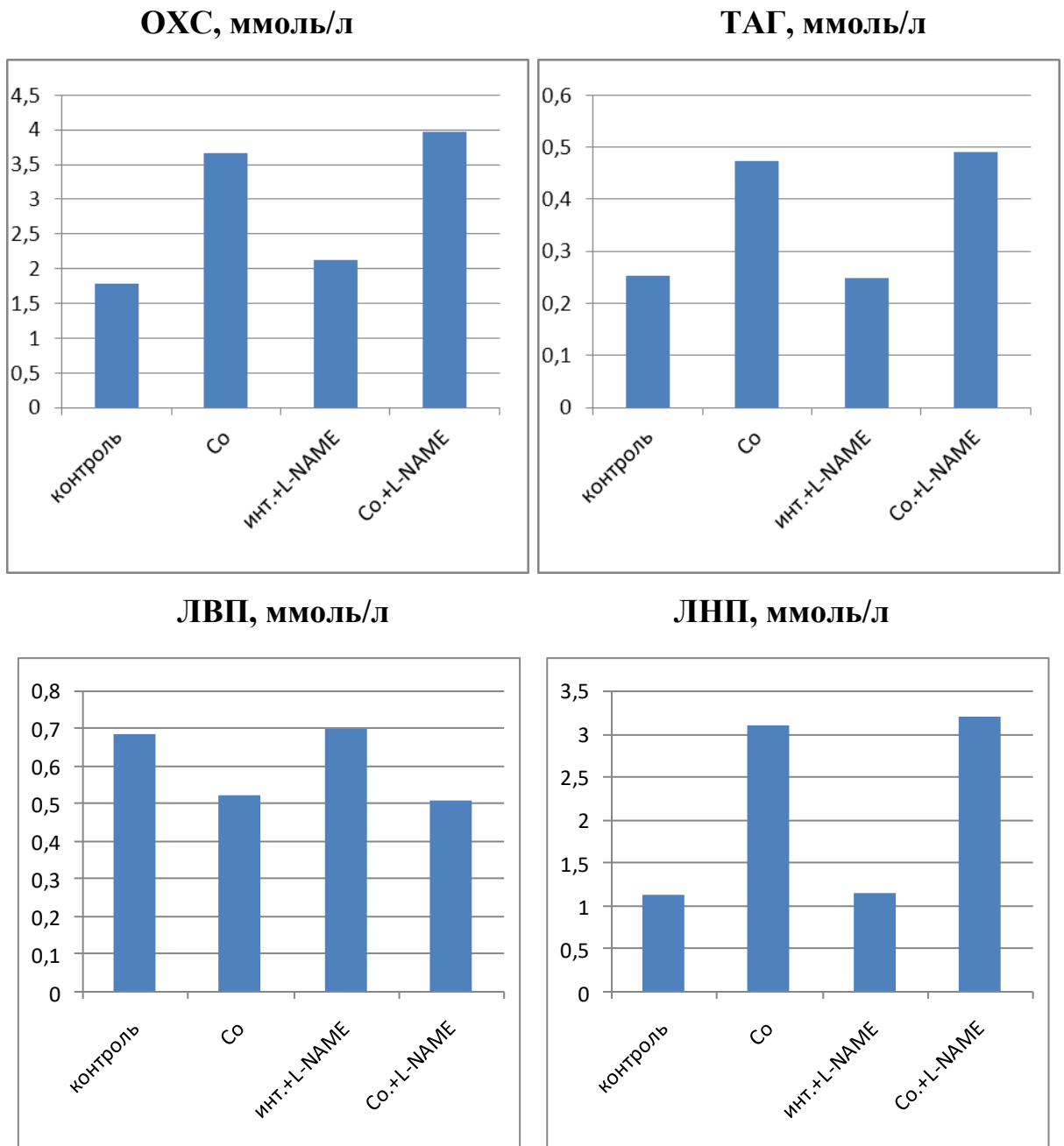


Рисунок 6 – Влияние метаболизма ХС при системной интоксикации хлоридом кобальта и ингибитора eNOS - L-NAME

Т.о., модификации L-аргинина весьма отрицательно влияют на содержание атерогенных факторов: общего ХС, ХС липопротеинов низкой плотности, а также на состояние энзима - нитрооксидсинтазы.

3.2. Изменение интенсивности общего патологического процесса ПОЛ – как патогенетического звена повреждения клеточных мембран внутренних органов

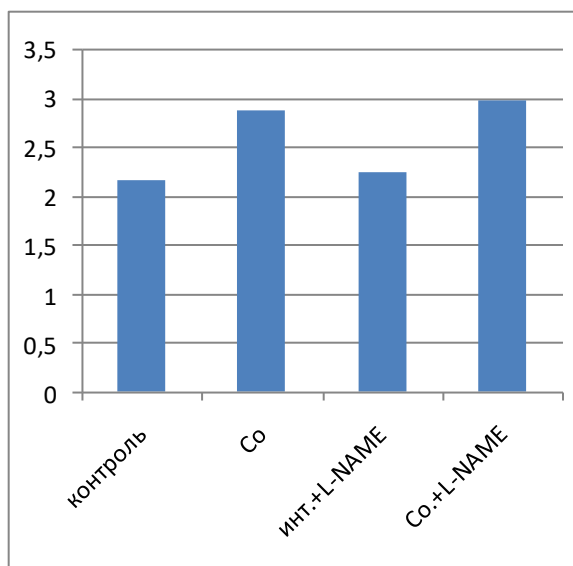
В токсических условиях происходят изменения во всех составляющих системы кровообращения, но особенно важно для гемодинамики нарушения в сосудах микроциркуляции. Понимая простую физиологическую истину, что изменения системы кровообращения не могут не отражаться на региональных процессах, т.е. на внутренних органах, что может характеризоваться как нефропатия, гепатопатия и кардиопатия (Аксенова М.Е., 2000). Токсические влияния реализуются путем развития и прогрессирования дисфункции эндотелия и изменением структуры клеточных мембран. Маркерами повреждения внутренних органов явилась оценка активности АТФ-азы в гомогенатах тканей почек, сердца и гепатоцита, а также активность сывороточных энзимов: трансаминаз, ГГТП и щелочной фосфатазы.

Результаты показали, что в модельных экспериментах процесс липопероксидации активируется, что привело к увеличению содержания МДА в корковом и мозговом веществе почек соответственно с $2,16 \pm 0,042$ нмоль/мг белка до $2,8 \pm 0,027$ нмоль/мг белка, и с $2,69 \pm 0,056$ до $5,4 \pm 0,019$ нмоль/мг белка ($p < 0,001$). Сравнительно с этим при действии аминокислоты у подопытных животных выявлено уменьшение содержания конечного продукта липопероксидации (МДА) в обоих слоях ренальной ткани, хотя величина не достигала контрольных значений. При действии модифицированного L-аргинина при кобальтовой интоксикации (Co + L-NAME) у подопытных животных выявлено более значительное увеличение содержания МДА, нежели в вариантах у интактных крыс с модифицированной аминокислотой и при токсическом воздействии (Co). Выявлены различия интенсивности липопероксидации, протекающей в корке и мозговом веществе ренальной ткани. Причем изменения происходят в сторону данных, полученных в мозговом веществе, что связано со структурными особенностями нефрона и метаболизма. Известно, что в корке преобладает окисление с доступом

кислорода, и оно заканчивается в цепи переноса электронов, т.е. дыхательной цепи, а, тем не менее, в мозговом слое почечного интерстиция располагается дистальный отдел нефрона, обеспечивающий основные процессы транспорта воды, катионов, включая тяжелые металлы. Это и приводит к более значительному образованию радикалов. Интенсивность липопероксидации выявлена и в печеночных, миокардиальных клетках. Содержание продукта распада полиненасыщенной жирной кислоты возрастает в гомогенатах печени с $1,84 \pm 0,041$ нмоль/мг белка до $2,71 \pm 0,019$ нмоль/мг белка., т.е. на 47,41%. Активные метаболиты кислорода индуцировали СРО в сердечной мышце по данным возрастания концентрации МДА с $2,51 \pm 0,050$ нмоль/мг белка до $3,6 \pm 0,015$ нмоль/мг белка ($p < 0,001$), (на 45%). Следовательно, продукты липопероксидации повышаются в ренальной, сердечной и печеночной тканях (рисунок 7, 8).

МДА почки, нмоль/мг белка

Корковый слой



Мозговой слой

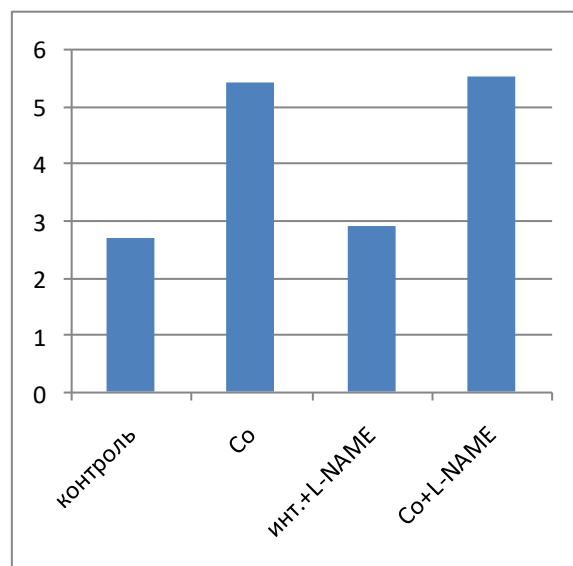


Рисунок 7 – Изменение интенсивности ПОЛ в клетках ренальной ткани (корковое и мозговое вещество) при системной интоксикации хлоридом кобальта и L-NAME

МДА, нмоль/мг белка

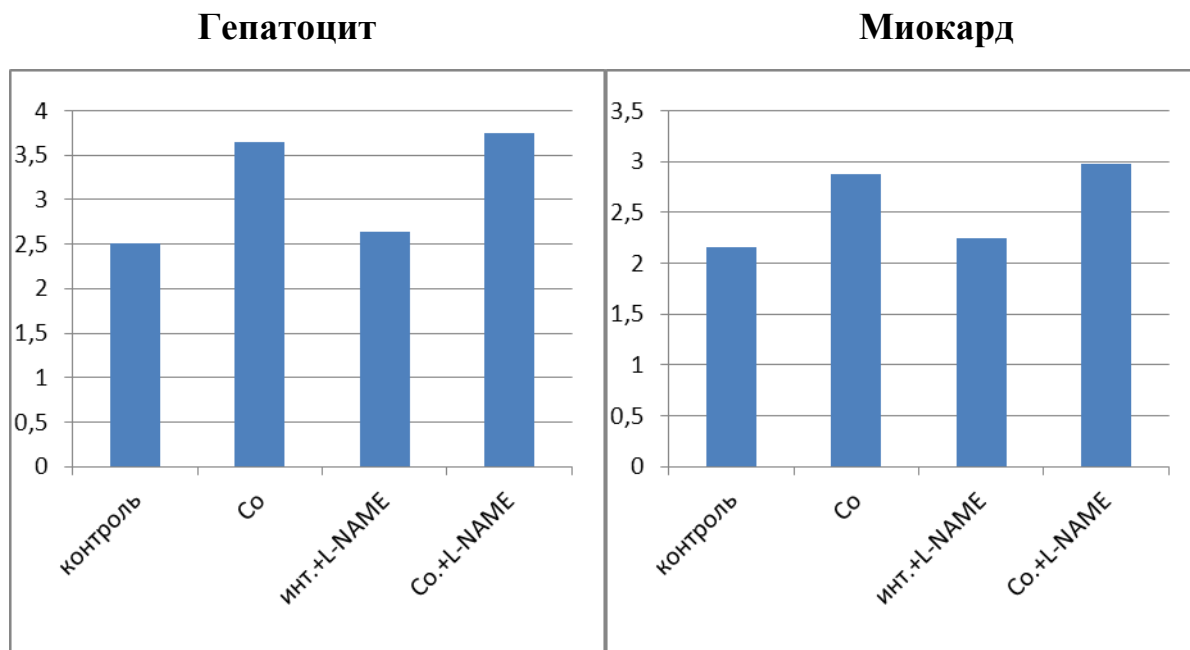


Рисунок 8 – Изменение интенсивности ПОЛ в гепатоците и миокарде при системной интоксикации хлоридом кобальта и L-NAME

Поддержание стационарного состояния липопероксидации обеспечивается системой АОЗ: СОД, каталазой, глутатионпероксидазой, глутатионредуктазой. В своих исследованиях автор изучал активность СОД в красных кровяных клетках, а также активность каталазы и содержание ЦП в плазме крови. Анализируя полученные результаты можно предположить, что нарушение функции СОД способствует повышению содержания супероксидного анион-радикала. Одновременно с этим происходило увеличение скорости распада пероксида, так как интенсифицировалась каталаза. Аналогичные изменения происходят и с ЦП – «ловушкой» свободных радикалов в сыворотке крови. Концентрация ЦП также повышается. Т.о., окислительный стресс приобретает системный характер и происходит не только в крови, но и в ренальных, сердечных и печеночных клетках, способствует нарушению фосфолипидного микроокружения мембранных ферментов. Данные показали, что одновременно происходит торможение активности Na,K-АТФ-азы в клетках печени, почек, сердца (рисунок 9, 10).

Na,K-ATФ-аза, мкмоль Рн/мг белка/час

Корковый слой

Мозговой слой

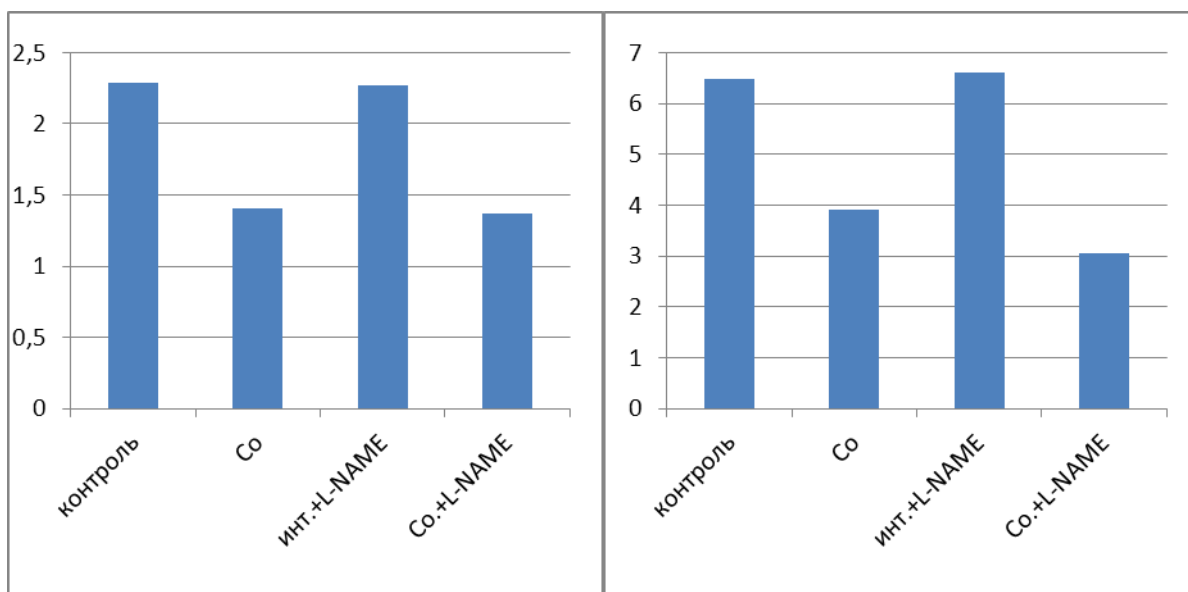


Рисунок 9 – Данные состояния Na-насоса в клетках ренальной ткани (корковый, мозговой слой) при системной интоксикации хлоридом кобальта и L-NAME

Na,K-ATФ-аза, мкмоль Рн/мг белка/час

Гепатоцит

Миокард

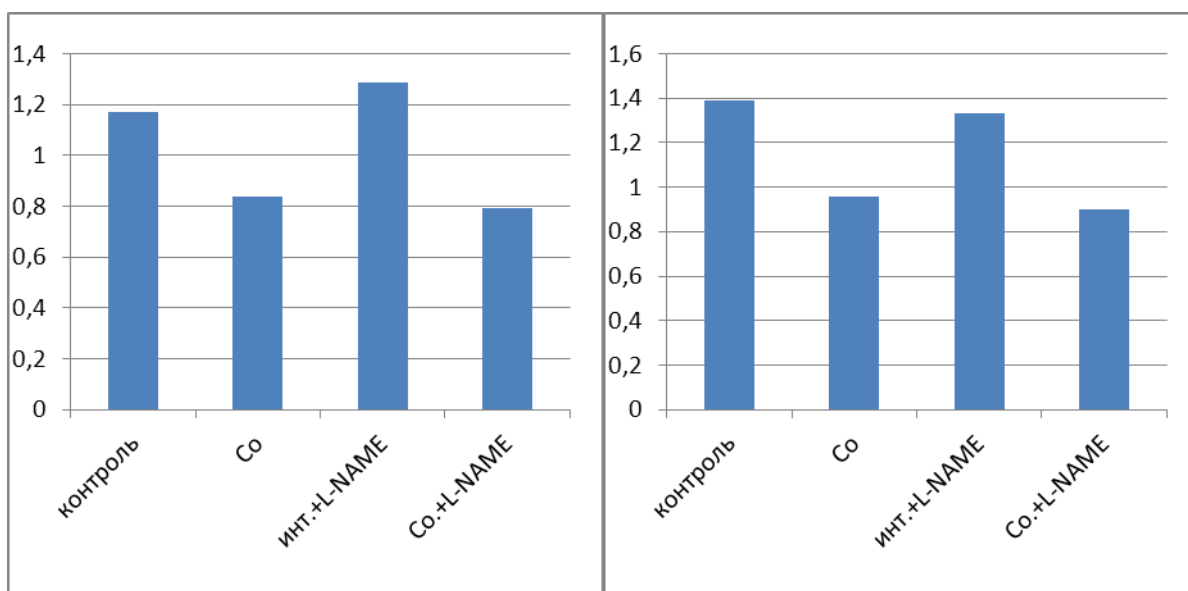


Рисунок 10 – Данные активности Na,K-ATФ-азы в гепатоците и кардиомиоците при системной интоксикации хлоридом кобальта и L-NAME

Активность Na-транспортирующего энзима ингибировалась в ренальной ткани соответственно с $2,29 \pm 0,013$ до $1,405 \pm 0,014$ мкмоль Рн/мг белка/час ($p < 0,001$) и с $6,47 \pm 0,185$ до $3,9 \pm 0,277$ мкмоль Рн/мг белка/час ($p < 0,001$). Результаты этой помпы функционально остаются пониженными при систематическом токсическом влиянии, а также под действием модифицированного L-аргинина – ингибитора eNOS в противоположность влиянию L-аргинина.

Патогенетическую роль в изменении активности Na,K-зависимой АТФ-азы сыграло изменение структуры фосфолипидов цитоплазматических мембран почечных канальцев, как следствие активации пероксидации в клетках ренальной ткани. В печеночной и в миокардиальной тканях отмечались однонаправленные изменения и снижение энергообразования, вследствие неэффективности восстановления кислорода в дыхательной цепи. Межсистемный анализ обнаружил обратную корреляционную связь между вторичным продуктом липопероксидации и состоянием Na-насоса в ренальной, сердечной тканях и в гепатоцитах у крыс с кобальтовой интоксикацией с L-аргинином и модифицированным L-аргинином. Цитируя данные Крыжановского Г.Н., 2002, следует отметить, что в условиях системной интоксикации и активации СРО имеют место внутримолекулярные изменения фосфолипидов цитоплазматических мембран. Это проявляется повышением вязкости, угнетением активности функциональных белков.

Нельзя не отметить характер изменений в крови специфических для органов энзимов АсАТ, АлАТ, мембранного фермента ГГТП и щелочной фосфатазы на фоне кобальта и комбинации кобальта с модифицированным L-аргинином (рисунок 11).

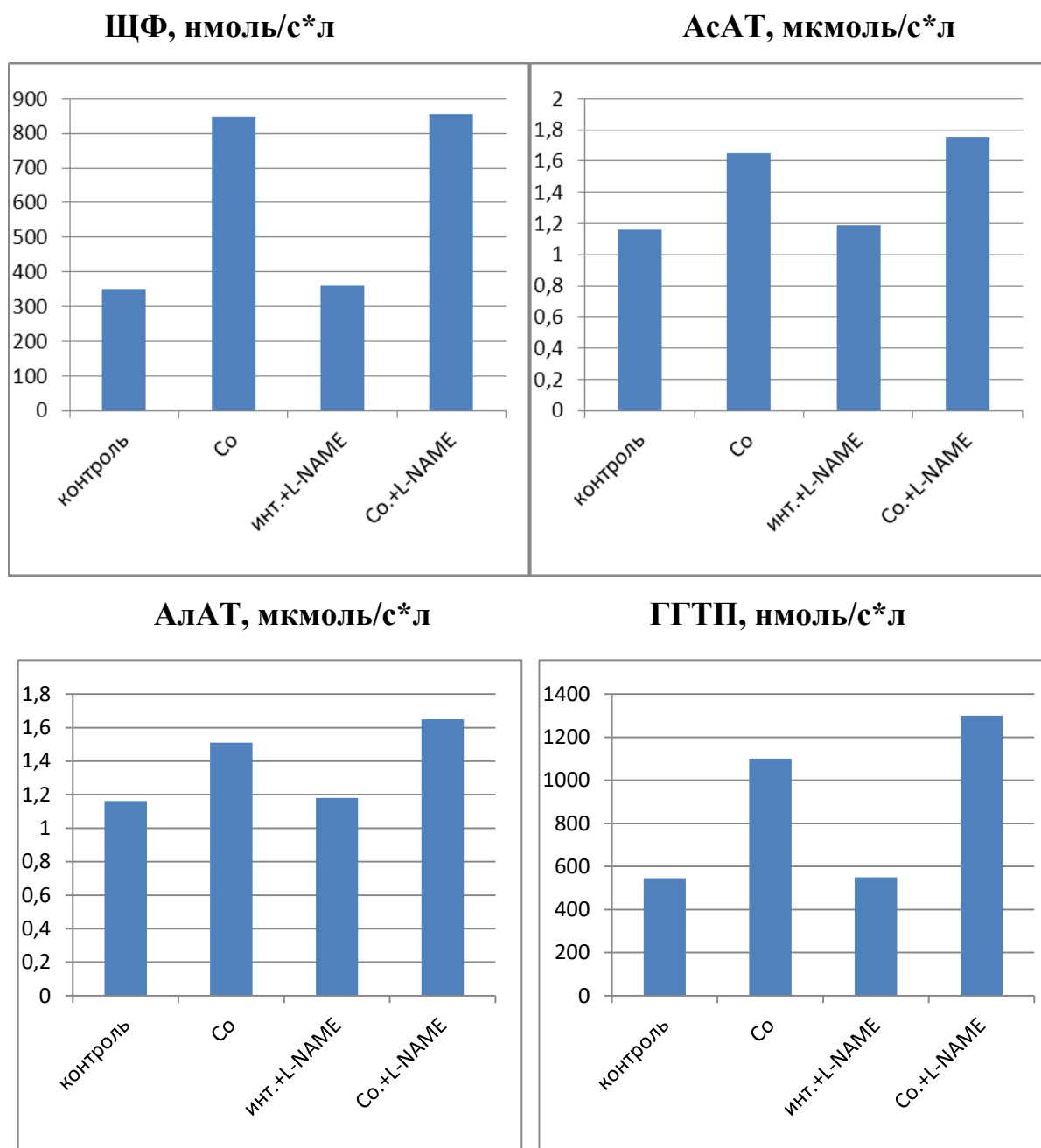


Рисунок 11 – Изменение активности экскреторного и специфичных для органов энзимов в сыворотке крови при системной интоксикации хлоридом кобальта и L-NAME

В противоположность этому введение L-аргинина при кобальтовой интоксикации способствует угнетению липопероксидации в ренальной ткани: корковом и мозговом веществе, а также в гепатоцитах и кардиомиоцитах. Показателем этого влияния является снижение содержания – МДА (рисунок 12,13).

МДА, нмоль/мг белка

Гепатоцит

Миокард

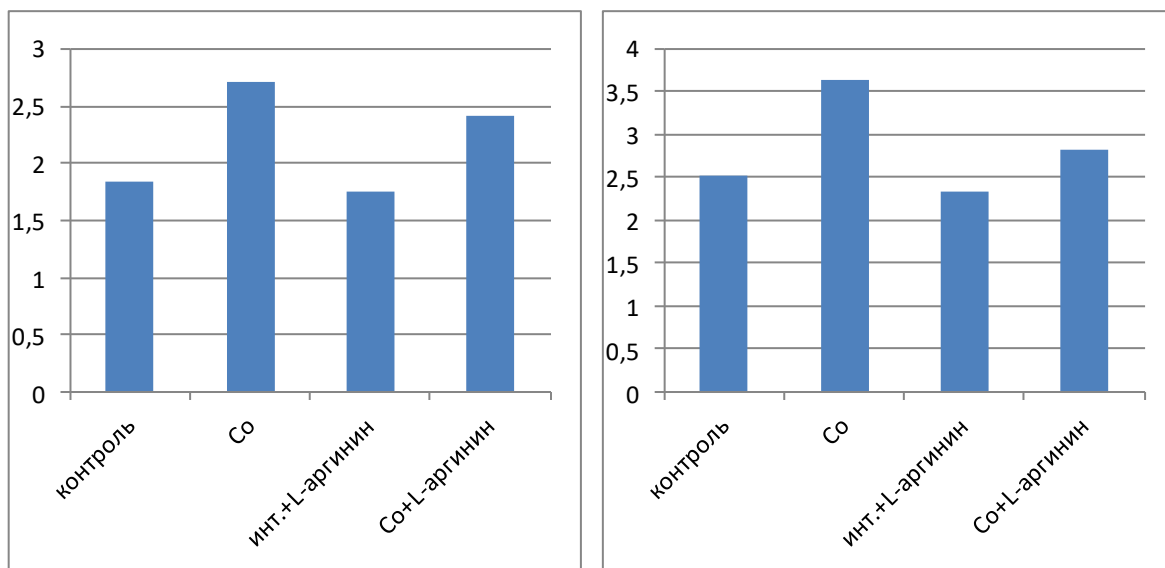


Рисунок 12 – Влияние L-аргинина на показатели ПОЛ в гепатоците и кардиомиоците при системном токсическом влиянии кобальта

МДА, нмоль/мг белка

Корковый слой

Мозговой слой

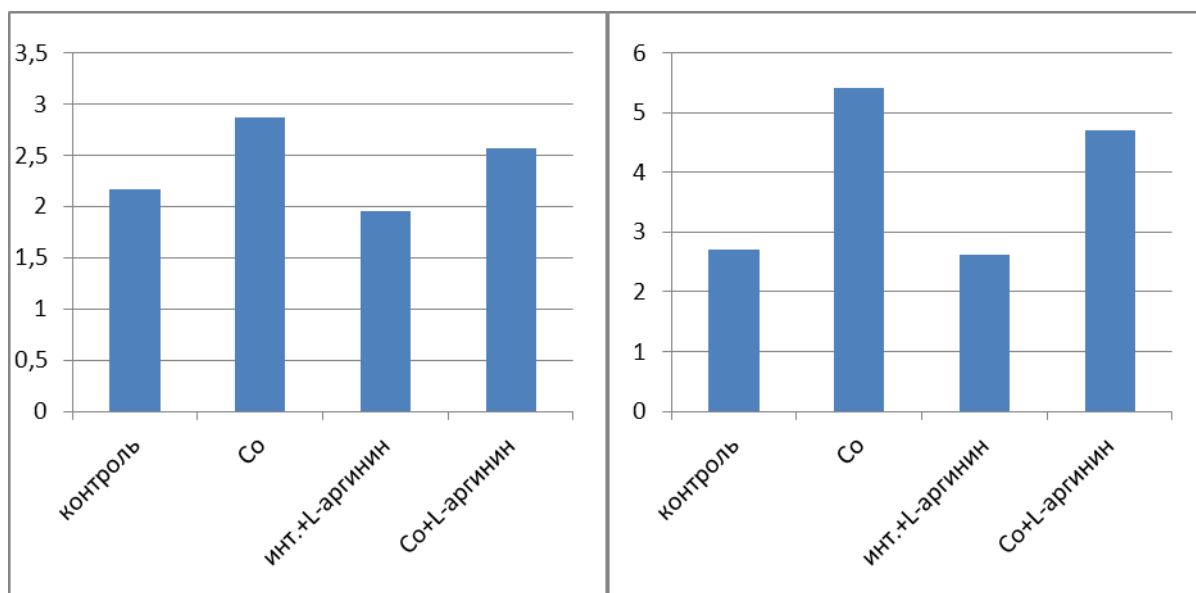


Рисунок 13 – Влияние L-аргинина на показатели ПОЛ в почечной ткани при системной интоксикации хлоридом кобальта

Снижение интенсивности ПОЛ сопровождается повышением активности АТФ-азы, активируемой Na и K, в тканях внутренних органов и

активности специфических (АлАЛ, АсАТ), ГГТП и экскреторного фермента – щелочной фосфатазы (рисунок 14-16).

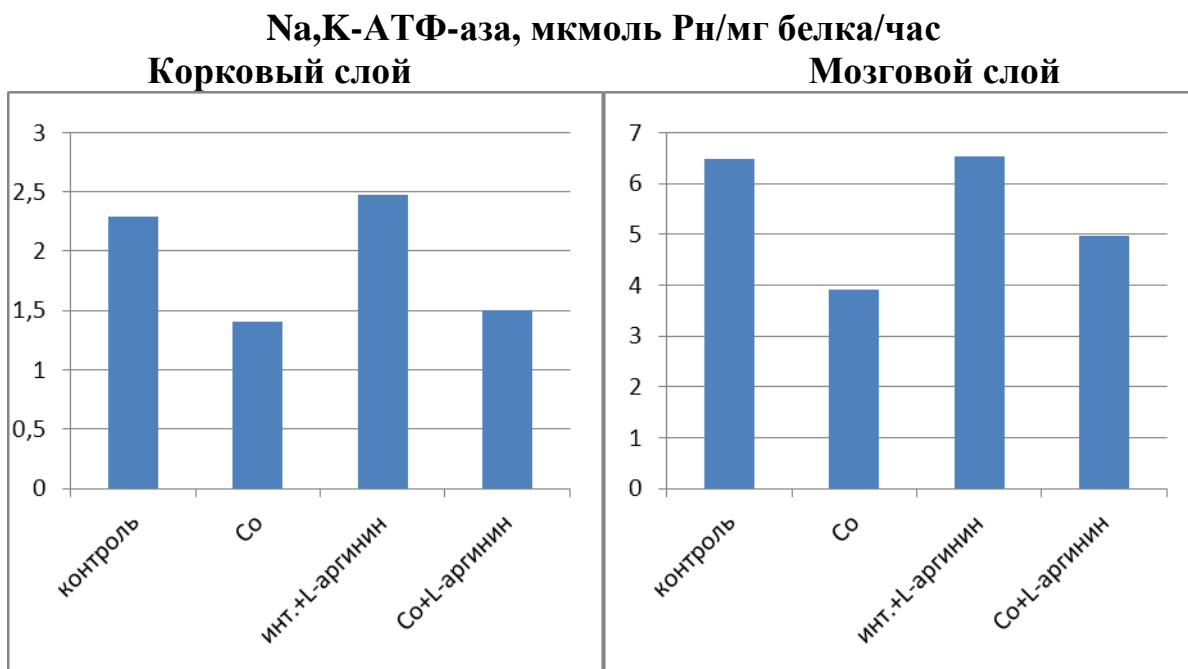


Рисунок 14 – Влияние L-аргинина на активируемую Na,K АТФ-азу ренальной ткани (корковый, мозговой слой) при системном токсическом влиянии (кобальт)

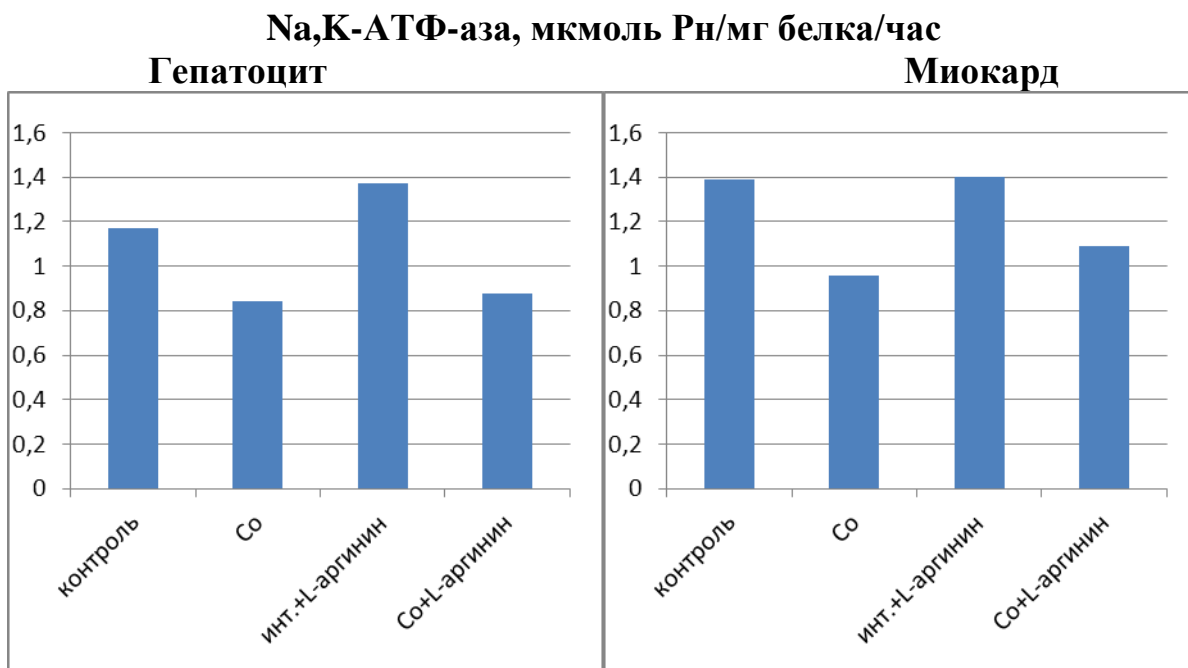


Рисунок 15 – Влияние L-аргинина на Na,K-активируемую АТФ-азу в гепатоците и миокарде при системной интоксикации хлоридом кобальта

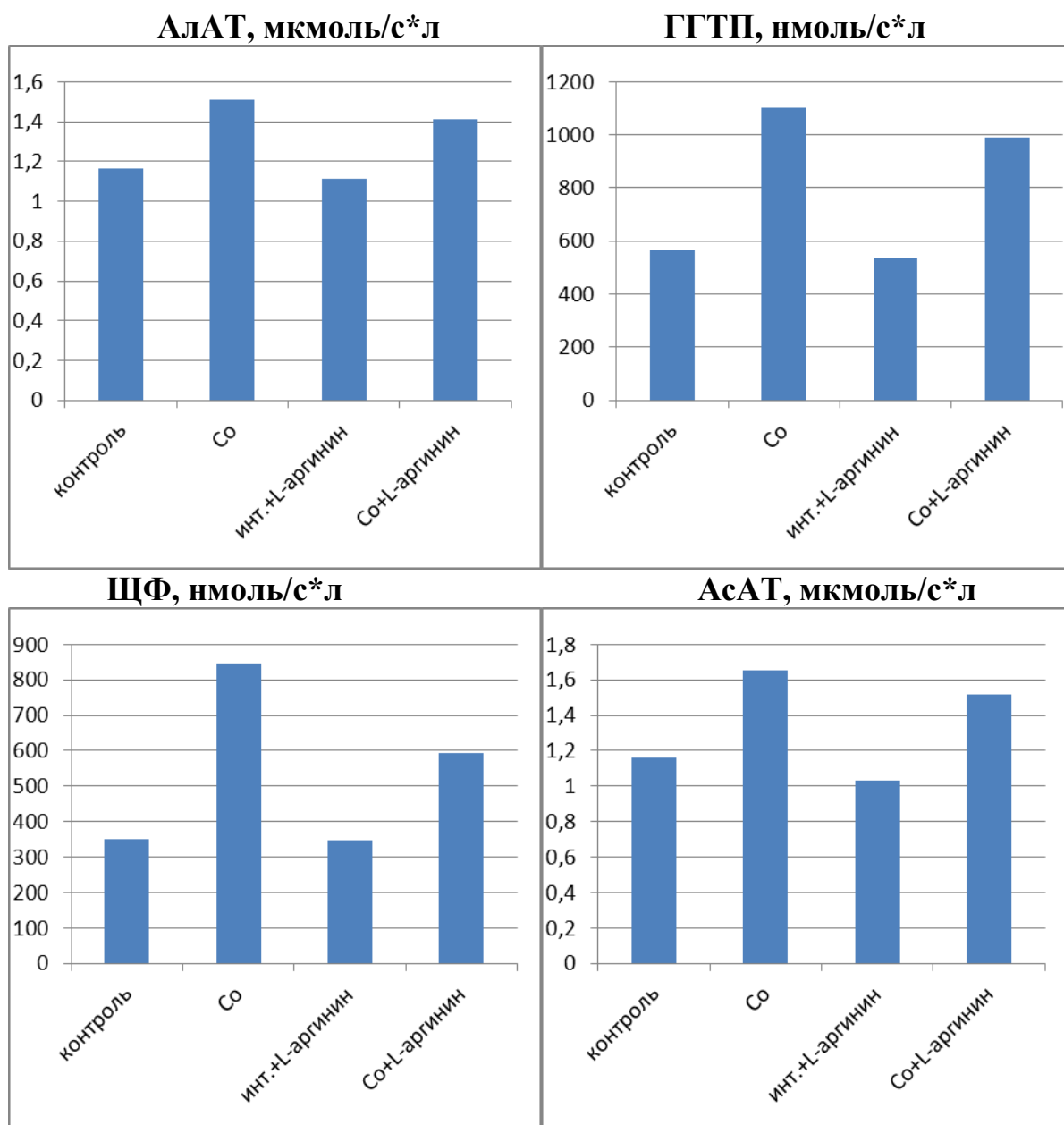


Рисунок 16 – Влияние L-аргинина на активность ферментов сыворотки крови при системной интоксикации хлоридом кобальта

Следовательно, полученные результаты позволили продемонстрировать доказательные результаты, свидетельствующие о внутримембранных изменениях внутренних органов. Установлена роль ряда сложных систем ПОЛ - АОС, NO-продуцирующей функции в развитии системных и органных нарушений.

Кобальтовая интоксикация в нашем эксперименте даже в незначительных концентрациях (2 мг/кг) способствует развитию метаболических и функциональных изменений.

Глава 4

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ АФОБАЗОЛА У КРЫС С КОБАЛЬТОВОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

4.1. Влияние афобазола на патогенетические звенья нарушений в обмене веществ

Одной из составляющих цели нашего исследования было изучение влияния афобазола, состояние системы ПОЛ – АОС, образование NOx, обмен холестерина и на показатели, характеризующие состояние внутренних органов.

В варианте, посвященном исследованию влияния афобазола на состояние ПОЛ при его введении - 10 мг/кг (1 месяц), было показано значительное угнетение интенсивности липопероксидации на фоне анксиолитика афобазол. Концентрация вторичного продукта липопероксидации на фоне афобазола снизилась с $5,65 \pm 0,045$ нмоль/мл до $4,52 \pm 0,03$ нмоль/мл, при $p < 0,001$.

Систематизация полученных результатов ингибирования ПОЛ афобазолом показала его выраженные антиоксидантные свойства. Для выяснения такой антиокислительной эффективности исследовали активность ферментов системы антиоксидантной защиты. Выявлено достоверное возрастание активности СОД с $62,76 \pm 0,99$ ед.акт. до $79,15 \pm 1,3$ ед.акт., на 26,1%, в то же время, исходно повышенная активность каталазы и концентрации церулоплазмينا достоверно снизились, соответственно с $359,31 \pm 4,24$ мкат/л до $253,1 \pm 2,28$ мкат/л (на 29,5%) и с $377,1 \pm 4,24$ мг/л до $347,1 \pm 4,02$ мг/л (на 7,99%). Однако данные энзима, метаболизирующий пероксид, по сравнению с контролем, остались повышенными, а концентрация церулоплазмينا соответственно снизилась до уровня контроля. Следует отметить, что перекись водорода H_2O_2 , как АФК образуется не только в реакции дисмутации супероксиданион радикала, но и во многих других химических реакциях. Поэтому можно полагать, что повышенная активность каталазы и концентрации ЦП направлены на превращение H_2O_2 в O_2 и H_2O . Можно считать

это проявлением защитной реакции организма в условиях интоксикации хлоридом кобальта с целью компенсации показателей гомеостаза в системе ПОЛ - АОС. Эти данные согласуются с результатами исследования Серединина С.Б., Воронина М.В., 2009 из НИИ фармакологии РАМН. Они установили антиоксидантные свойства препарата и его способность к восстановлению состава клеточных мембран на других тканях, в частности, структурах головного мозга, на модели иммортализованных клеток гиппокампа НТ-12 методом конфокальной микроскопии.

Выявлены весьма доказательные изменения активности ферментов АОС на фоне афобазола (рисунок 17).

Следует отметить, что афобазол эффективно оказывает влияние на расхождение показателей АОС. «Повышенная активность СОД приводит к накоплению супероксид-анион радикала, способствует снижению образованию перекиси водорода (H_2O_2) и вследствие этого меньшая потребность в каталазе, разрушающей пероксид» (Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, Chiu YW, Chen HC., 2005). Нужно полагать, что изменения во второй составляющей в системе ПОЛ - АОЗ клеток и является причиной его антиоксидантного действия.

В исследованиях у подопытных крыс с кобальтовой экспозицией на фоне терапии концентрация NO_x возросла статистически достоверно, т.е. афобазол значимо повлиял на этот показатель. Аналитический подход к интерпретации результатов выявил эффективность в отношении показателей, характеризующих гомеостаз оксида азота.

При помощи корреляционного анализа была выявлена эффективность действия афобазола на активность ферментов АОЗ клеток и процессы ПОЛ. В токсических условиях, вызванных экспозицией хлоридом кобальтом у крыс, терапия афобазолом показала корреляционные связи между показателями.

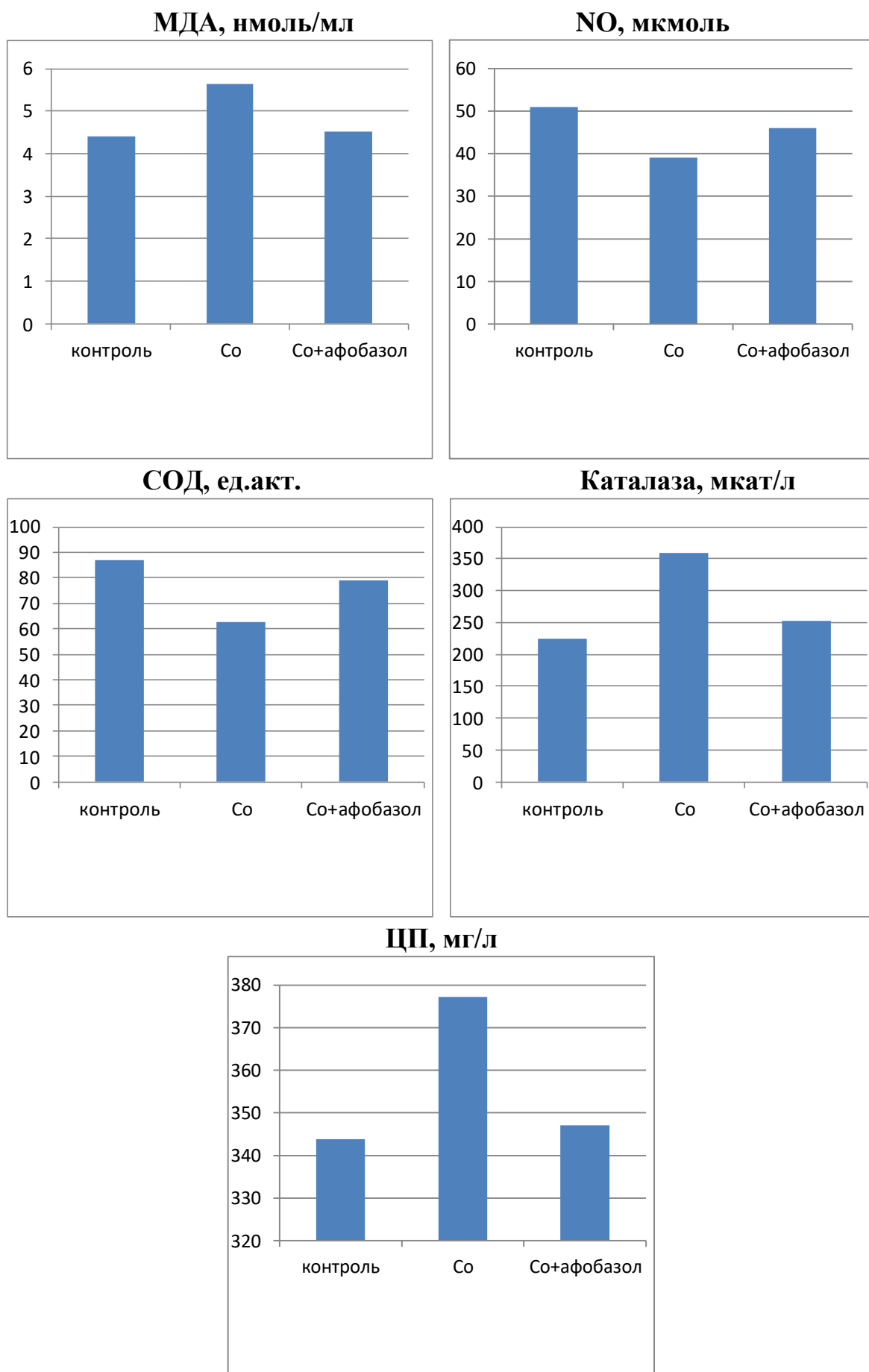


Рисунок 17 – Влияние афобазола на активность ферментов АОЗ клеток при системной интоксикации хлоридом кобальта

Так выявлена положительная связь между активностью каталазы и концентрацией МДА соответственно ($r = + 0,59$), $p < 0,001$ и концентрацией ЦП ($r = 0,61$), $p < 0,001$, отрицательной связью между уровнем повышения активности СОД и снижения концентрации МДА ($r = - 0,58$), $p < 0,001$, обратно выраженной достоверной связи ($r = - 0,66$), $p < 0,001$ между показателями ПОЛ и NO.

Следовательно, лечение афобазолом оказалось эффективным, выявлена положительная динамика биохимических параметров, играющих роль в развитии дисфункции эндотелия.

В модельных экспериментах установлено, что нарушение продукции NO связано с двумя основными факторами: наличием самого субстрата L-аргинина и конкурирующего с ним модифицированного L-аргинина. На уровень экспрессии фермента eNOS и биодоступность NO могут влиять эти регуляторы.

Транспорт аминокислоты в гладкомышечную клетку сосудистой стенки, как субстрата для NO-синтезирующего фермента, определяется функционированием механизма у-транспортера. На этот механизм оказывают влияние окисленные ЛНП (oЛНП), способные вызывать атерогенные изменения в сосудистой стенке. В другом варианте, поэтому мы исследовали показатели обмена холестерина в токсических условиях у крыс. Систематизация данных показала, что лечение афобазолом вызывает достоверное снижение концентрации ОХС с $3,6 \pm 0,043$ ммоль/л до $2,4 \pm 0,034$ ммоль/л (на 34,3%), значительное – ХС в ЛНП с $3,09 \pm 0,012$ ммоль/л до $1,99 \pm 0,005$ ммоль/л (на 35,5%), $p < 0,001$ и повышение ХС ЛВП с $0,52 \pm 0,022$ ммоль/л до $0,604 \pm 0,02$ ммоль/л (на 16,1%), ($p < 0,001$). Концентрация ТАГ также одновременно снижается с $0,473 \pm 0,021$ ммоль/л до $0,301 \pm 0,02$ ммоль/л (на 57,1%) (рисунок 18). Как известно, содержание ХС в крови зависит с одной стороны от его продукции, т.е. синтеза и с другой стороны - от его утилизации клетками тканей. На основании полученных нами результатов можно считать, что афобазол, способствуя нормализации фосфолипидного состава клеточной мембраны, может способствовать реактивности рецепторов к

ЛНП и, следовательно, процессу поглощения ХС клетками. Это и может приводить к снижению содержания ХС в циркулирующей системе.

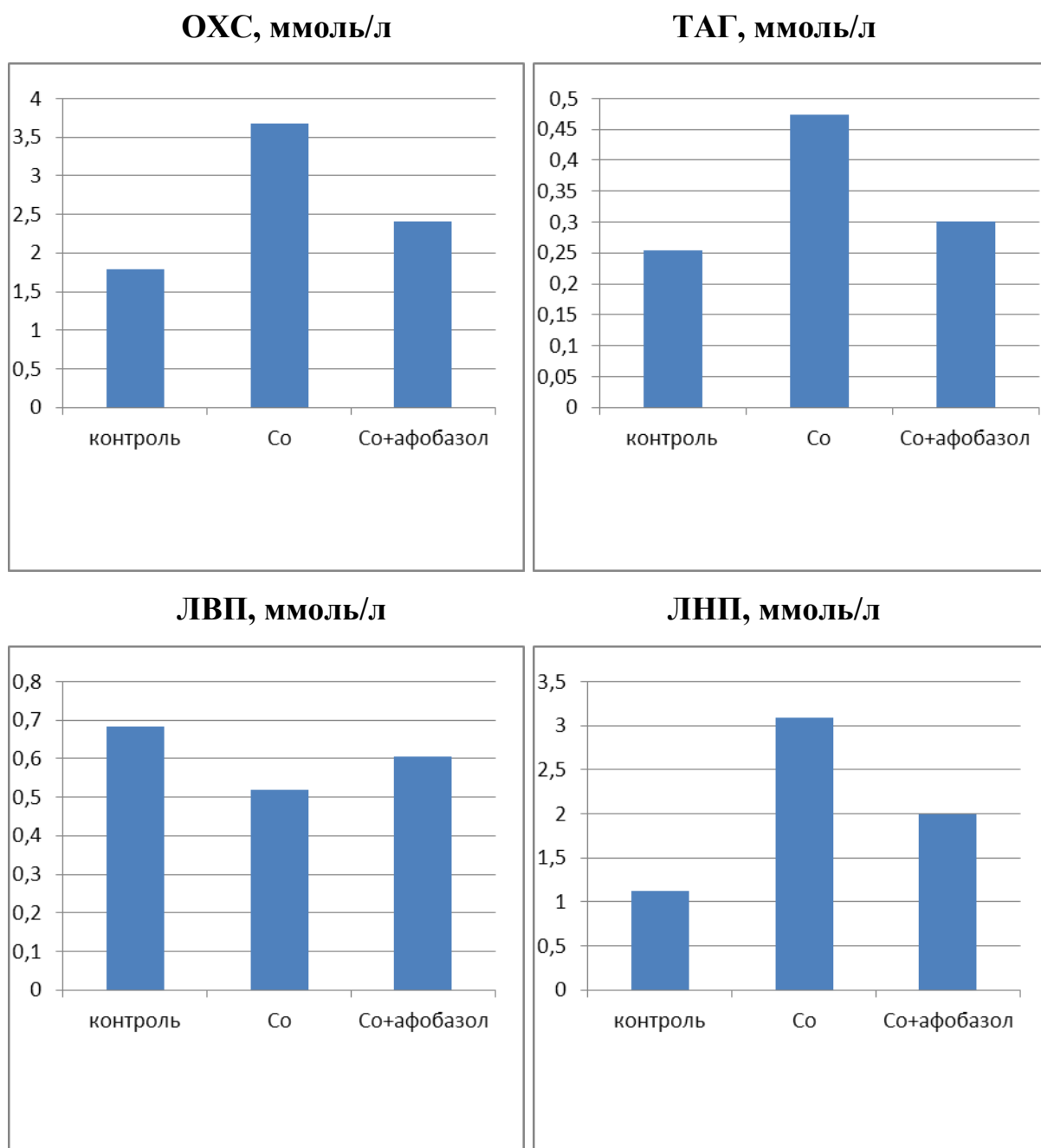


Рисунок 18 – Влияние афобазола на обмен ХС при системной интоксикации хлоридом кобальта

Исследование связи между липопротеинами сыворотки крови и состоянием азотистого гомеостаза (NOx) выявило обратную корреляцию между ними ($r = - 0,69$; $r = - 0,72$). Значит, нормализация обмена ХС при

ингибировании ПОЛ приводило к повышению доступности оксида азота. Это подтверждается исследованиями ряда ученых (Malard V., Berenguer F., 2007; Cooke I. P., 2007; Lankin V.V., 2003; Дзугкоев С.Г. и др., 2013), установивших, что экспрессия NOS-3 тормозится и уменьшается образование оксида азота в условиях перекисидации липидов и достижения малонового диальдегидом уровня 2-10 мкмоль/л. Торможение превращения L-гуанидин-¹⁵N₂-аргинина в ¹⁵N/-нитрит (специфический индикатор NOS-активности) лежит в механизме угнетения eNOS.

Следовательно, результаты исследований, продемонстрировавшие антиоксидантные свойства афобазола в токсических условиях, способствуют повышению транспорта L-аргинина в сосудистую стенку и соответственно концентрации NOx. Другим фактором, регулирующим доступность АК для eNOS является нормализация метаболизма ХС. И наконец, можно полагать, что "афобазол оказывает влияние и на сам фермент eNOS, т.е. на его экспрессию", (Дзугкоев С.Г., Можяева И.В., Такоева Е.А. и др., 2014).

На основании полученных данных можно полагать, что причиной сниженного содержания NO могло быть угнетение экспрессии eNOS, а афобазол стимулировал этот метаболический аспект, регулирующий содержание оксида азота в сыворотке крови.

Участие эндотелиальной дисфункции, как фактора риска для патологии висцеральных органов: почек, печени и миокарда у крыс с кобальтовой интоксикацией описана в предыдущей части главы. В ней мы исследовали влияние афобазола на показатели липоперекисидации, активность Na-транспортирующего фермента в гомогенатах этих органов, а также в сыворотке крови специфичных для органов энзимов: АлАТ, АсАТ, ГГТП щелочной фосфатазы при систематическом введении хлорида кобальта. Данные показали, что в ренальной ткани отмечается снижение концентрации МДА на фоне афобазола как в корковом слое интерстиция соответственно с $2,87 \pm 0,027$ нмоль/мг белка до $1,75 \pm 0,037$ нмоль/мг белка, так и в мозговом слое соответственно с $5,41 \pm 0,019$ нмоль/мг белка до $3,12 \pm 0,066$ нмоль/мг белка, при

$p < 0,001$. Статистический анализ показывает, что концентрация МДА в этих слоях почки статистически значимых различий почти не имеет при сравнении с контрольными значениями. В гомогенатах сердечной и печеночной тканей выявлено угнетение ПОЛ. В гепатоцитах на фоне афобазола отмечено снижение с $2,713 \pm 0,019$ до $2,01 \pm 0,028$ нмоль/мг белка, на 34,9%, $p < 0,001$; в миокарде соответственно отмечено снижение с $3,64 \pm 0,015$ до $2,71 \pm 0,013$ нмоль/мг белка, на 34,3% при $p < 0,001$.

Таким образом, анализируя полученные нами данные, можно утверждать о достоверном снижении интенсивности ПОЛ в клетках ренальной, сердечной и печеночной тканей (рисунок 19).

Угнетению интенсивности липопероксидации способствует активация АОС: активность СОД в эритроцитах повысилась, а каталазы и церулоплазмина снизились. Однако, показатели, характеризующие каталазу и концентрацию церулоплазмина в условиях снижения образования АФК и угнетения ПОЛ понижаются, но не достигают контрольных величин. Лечение афобазолом регулирует дисбаланс в активности ферментов АОС и способствует улучшению функции фермента, обеспечивающего дисмутацию O_2^- , т.е. СОД.

Следовательно, афобазол нормализует взаимоотношения в системе ПОЛ-АОЗ. Окислительные процессы при систематической интоксикации хлоридом кобальта приобрели системный характер и, возможно, сопровождались повреждением мембранных структур внутренних органов. Поэтому мы посчитали необходимым исследовать активность мембранного энзима - Na,K-зависимой АТФ-азы в гомогенатах ренальной, миокардиальной тканей и гепатоцитах. Параллельно с этим измерялась активность сывороточных, специфичных для органов, ферментов - АлАТ, АсАТ, ГГТП и щелочной фосфатазы на фоне введения афобазола.

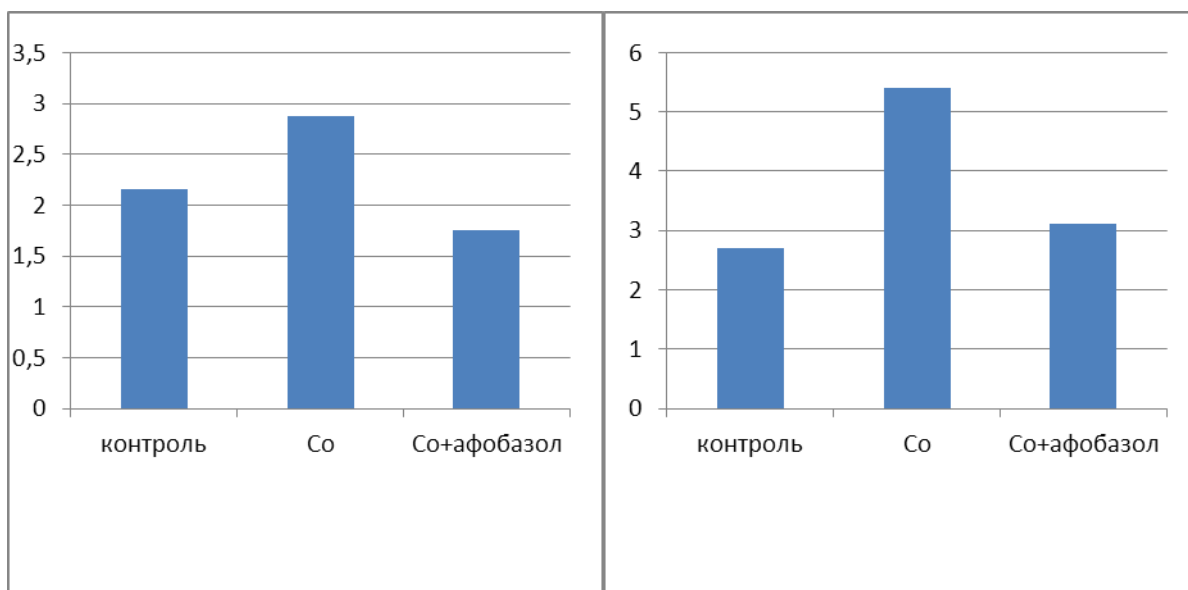
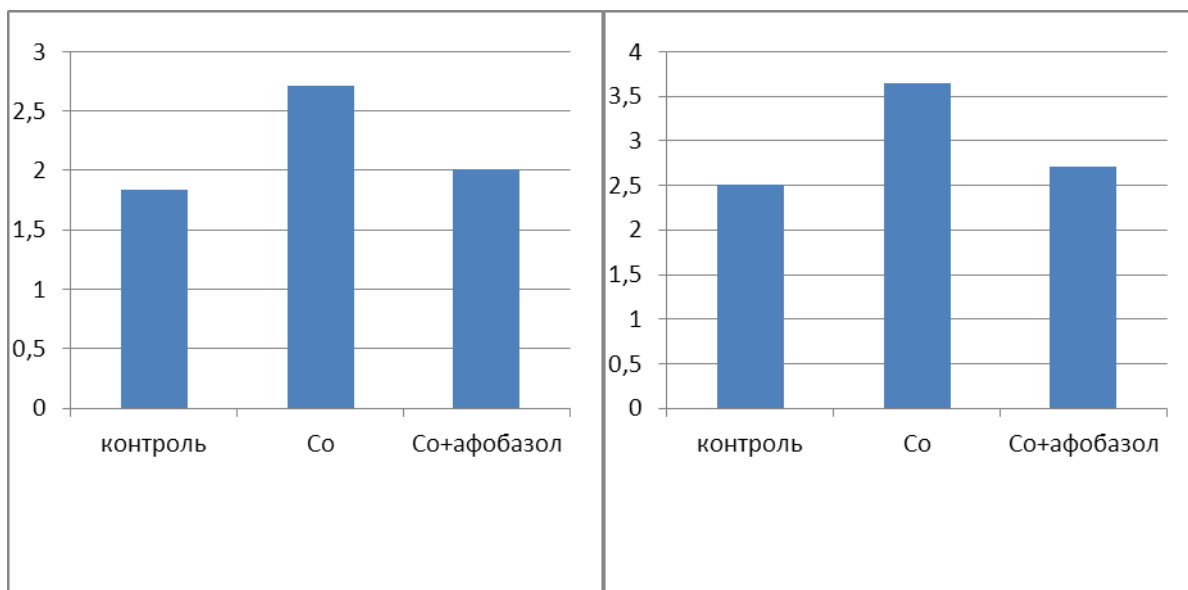
МДА ренальной ткани (корка)**МДА - медулла****нмоль/мг белка****МДА гепатоцит****МДА миокард****нмоль/мг белка**

Рисунок 19 – Влияние афобазола на содержание МДА в крови и внутренних органах и NOx при системной интоксикации хлоридом кобальта

Наши данные впервые показали, что при интоксикации тяжелым металлом (хлоридом кобальта) имеет место повышение активности Na,K-АТФ-азы в корковом и мозговом слоях почек, а также в гепатоцитах и кардиомиоцитах на фоне лечения афобазолом. Полученные данные

свидетельствуют о восстановлении молекулярной структуры цитоплазматических мембран клеток (ЦПМН) висцеральных органов, повышении их гидрофобности и снижении проницаемости на фоне монотерапии афобазолом, вследствие его антиоксидантного действия (рисунок 20, 21).

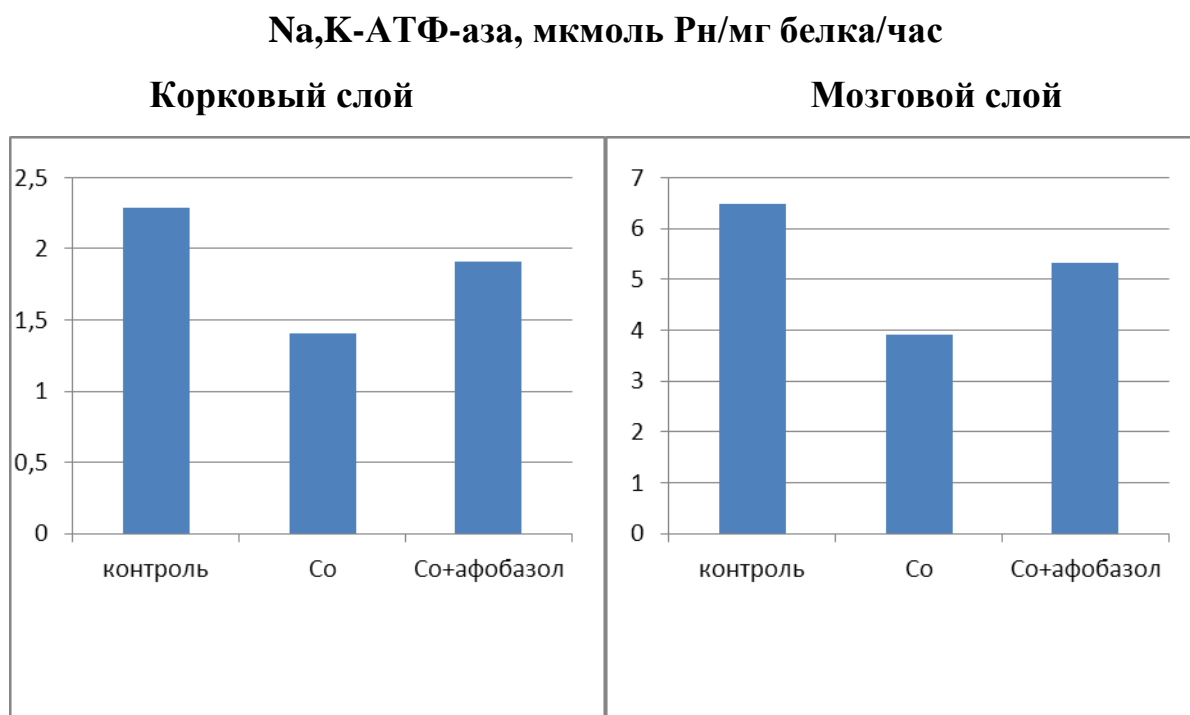


Рисунок 20 – Влияние афобазола на активность Na,K-АТФ-азы в клетках ренальной ткани (корковый, мозговой слой) при системной экспозиции солью кобальта

Проведение анализа взаимосвязей между энзимом, обеспечивающим Na,K обмен и вторичным продуктом липопероксидации показало наличие обратной связи соответственно в корковом и мозговом слоях ренальной ткани, а также в печени и сердце соответственно: $r = - 0,82$, $r = - 0,78$, $r = - 0,80$, $r = - 0,84$.

Na,K-АТФ-аза, мкмоль Рн/мг белка/час

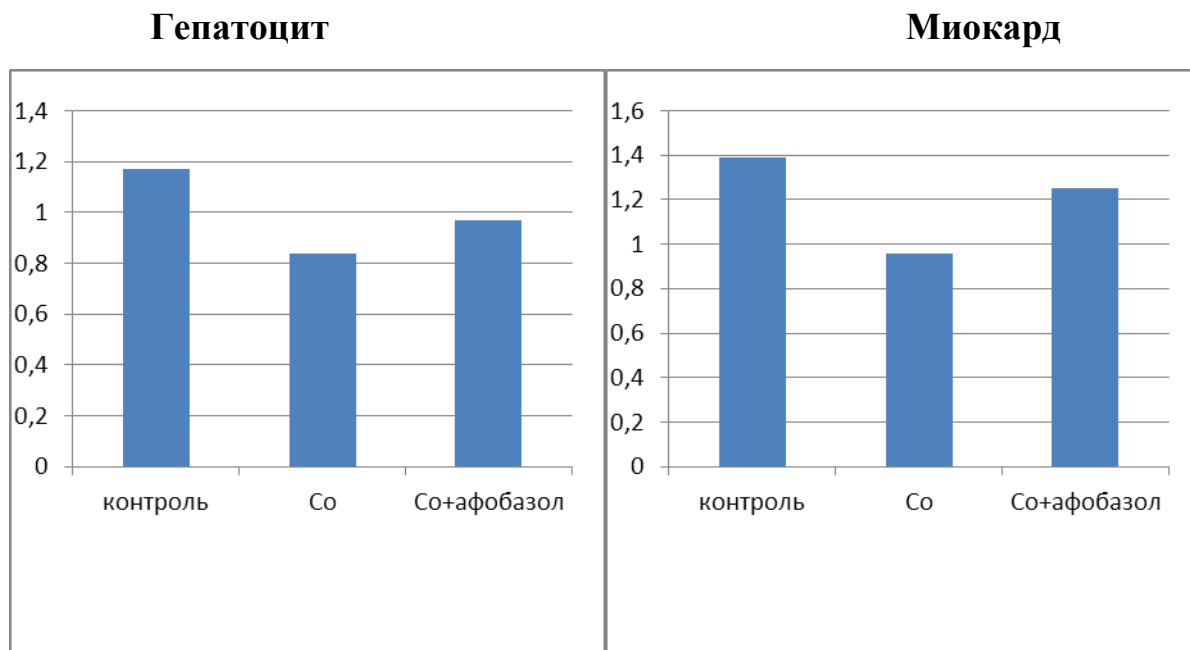


Рисунок 21 – Изменение состояния Na-насоса в гепатоците и кардиомиоците под влиянием афобазола при системной интоксикации хлоридом кобальта

Восстановление молекулярной структуры фосфолипидов клеточных мембран клеток почек, сердца и печени на фоне монотерапии афобазолом способствовало снижению в сыворотке крови активности специфичных для этих органов энзимов: АлАТ, АсАТ, ГГТП и экскреторного фермента щелочной фосфатазы. Так активность АлАТ на фоне афобазола соответственно снизилась с $1,51 \pm 0,022$ мкмоль/с/л до $1,28 \pm 0,03$ мкмоль/с/л ($p < 0,001$), на 17,96%; АсАТ с $1,65 \pm 0,024$ мкмоль/с/л до $1,29 \pm 0,058$ мкмоль/с/л, ($p < 0,001$), на 27,9%; ГГТП с $1100 \pm 25,68$ нмоль/с/л до $600,1 \pm 15,01$ нмоль/с/л, на 45,4% при $p < 0,001$ (рисунок 22).

Т.о., перенос сигма-рецептора под влиянием афобазола в цитоплазматическую мембрану способствует восстановлению их фосфолипидного состава, нарушенного усилением перекисных процессов (Halliwee В, 2006; Серединин С.Б., Воронин М.В., 2009).

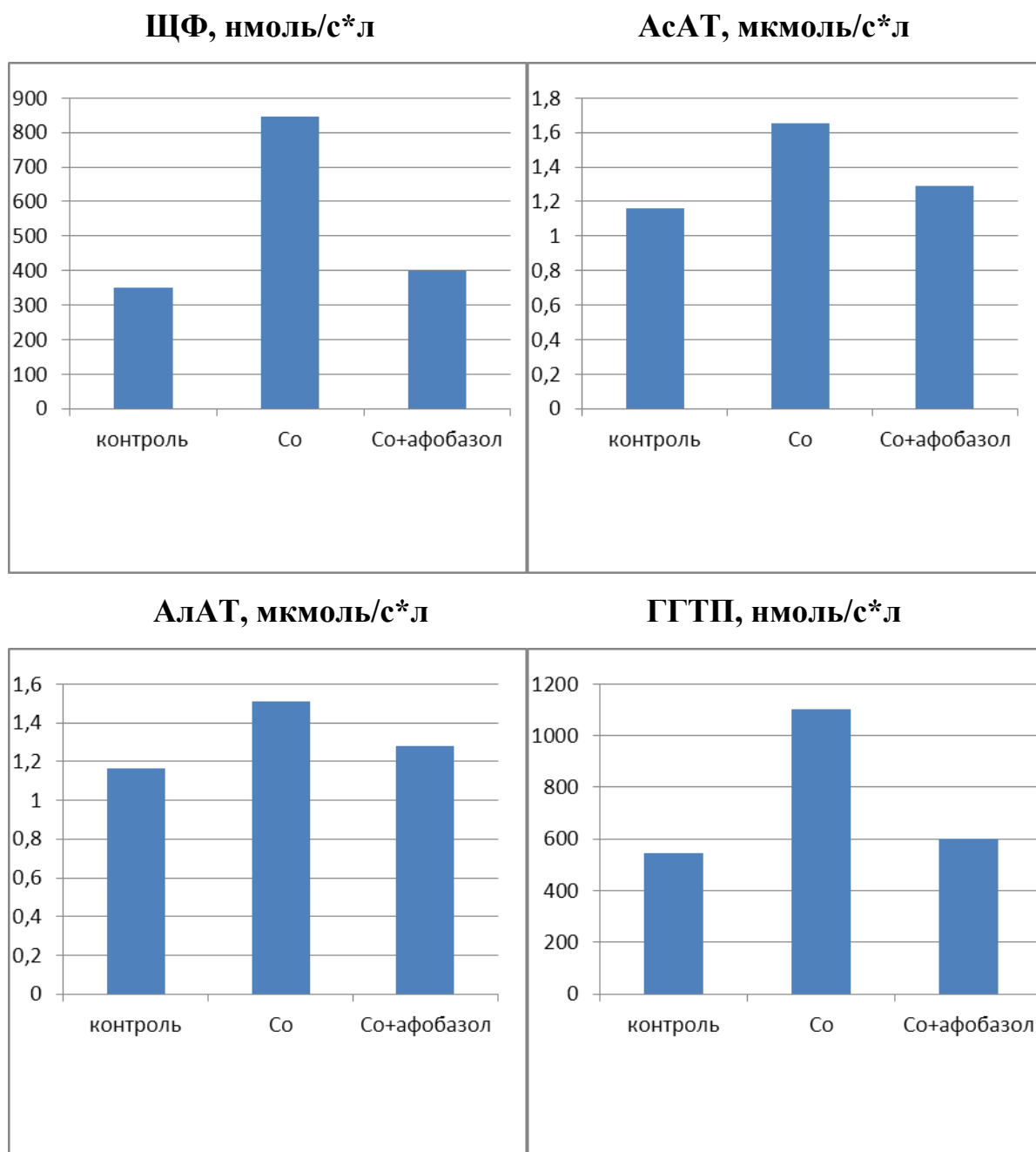


Рисунок 22 – Влияние афобазола на активность экскреторного и органоспецифичных энзимов в сыворотке крови при системной интоксикации хлоридом кобальта

Возобновление физико-химических свойств мембран клеток внутренних органов на фоне подавления пероксидации липидов терапией афобазолом ограничивает проницаемость клеток для трансаминаз – АЛАТ, АсАТ, а также ГГТП. Отмечается также увеличение в сыворотке крови концентрации NO, что способствовало не только вазодилатации, но и расслаблению желчных ходов и

желчевыделению, в результате чего имело место снижение активности в сыворотке крови щелочной фосфатазы, как правило, экскретируемой с желчью в кишечник. Нормализации содержания оксида азота, очевидно, способствовало уменьшение активности iNOS и увеличение образования eNOS, которая защищает эндотелий от СРО повреждения (Calvert J.W., Lefler D.J, 2009). Позитивные изменения в метаболизме липидов, т.е. угнетение липопероксидации препятствует превращению фосфолипидов в лизофосфолипиды, а, следовательно, сохранению молекулярной структуры мембран клеток внутренних органов.

Т.о., афобазол стимулирует функциональную активность СОД в крови, что ограничивает липопероксидацию и способствует повышению концентрации суммарных метаболитов NOx. В этих условиях восстанавливается взаимосвязь между редуктазным и оксидазным доменами фермента eNOS, определенную роль в которой играют восстановленные коферменты, в частности ТГБП (В₄). Снижение содержания атерогенных β-липопротеинов и повышение α-ЛПП приводит к лучшему поступлению NO в сосудистую стенку. Можно считать, что эти метаболические изменения в сыворотке крови оказывают влияние на функцию эндотелия и могут способствовать позитивной динамике в структуре мембран внутренних органов. Это положение подтверждается данными активности мембранных ферментов и снижением в сыворотке крови специфичных для висцеральных органов энзимов.

Глава 5

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ АФОБАЗОЛА И РЕГУЛЯТОРОВ ЭКСПРЕССИИ eNOS У КРЫС С КОБАЛЬТОВОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ

5.1. Влияние комплекса - афобазол и регуляторы экспрессии eNOS на патогенетические звенья нарушений в системе ПОЛ – АОС и обмена NO

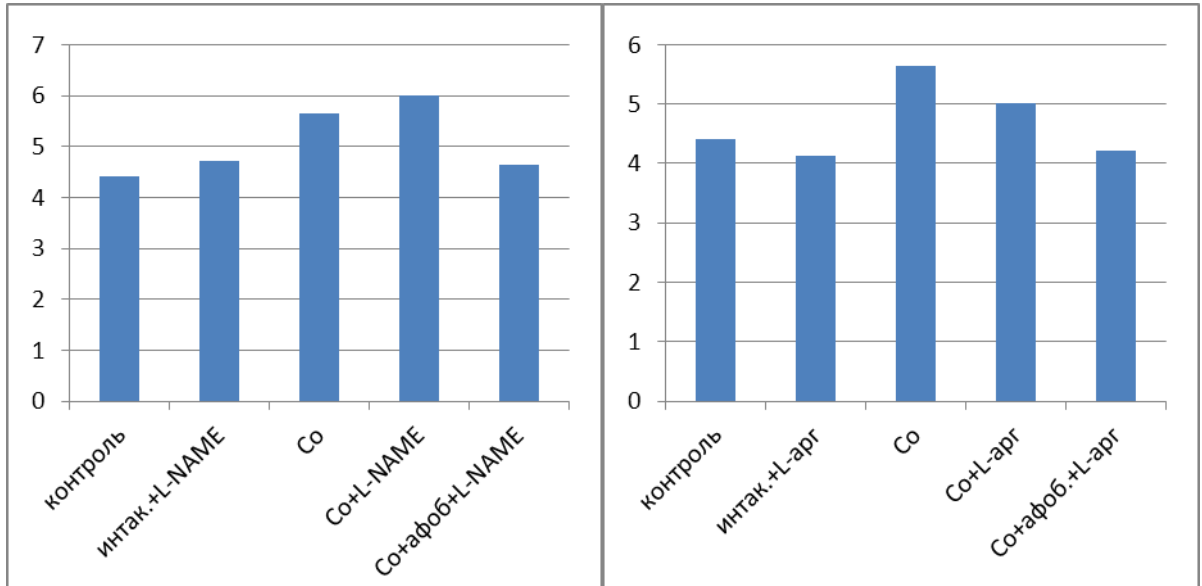
Глава посвящается изучению влияния нового анксиолитика афобазола и его комплекса с L-аргинином и модифицированной аминокислотой на показатели ПОЛ - АОС и другие метаболические нарушения. Полученные в предыдущей главе результаты продемонстрировали существенное угнетение липопероксидации на фоне анксиолитика афобазол. Однако, более выраженная эффективность афобазола отмечается в комплексе с L-аргинином, по сравнению с монотерапией. Содержание конечного продукта липопероксидации понижается под влиянием аминокислоты и ее комбинации с афобазолом. Изучение влияния модифицированного L-аргинина показало, что он способствует интенсификации липопероксидации, повышает содержание МДА в крови.

Полученные результаты показали ингибирование ПОЛ афобазолом и индуктором экспрессии eNOS и выявили, что наиболее эффективным является комбинированная терапия афобазолом + L-аргинин. Влияние терапии на интенсивность ПОЛ обусловлено восстановлением активности АОС, в частности, СОД, хотя активность каталазы и α -глобулина при этом снижается. Следует отметить, что содержание церулоплазмينا понизилось почти до уровня контроля.

Перекись водорода, как АФК, образуется во многих химических реакциях, уровень супероксиданион радикала в крови не дает полного представления о состоянии АМК, поэтому можно полагать, что повышенная активность каталазы и концентрация ЦП направлены на превращение H_2O_2 в O_2 и H_2O , что является проявлением защитной реакции организма в условиях

интоксикации хлоридом кобальта с целью компенсации показателей гомеостаза в системе ПОЛ – АОС (рисунок 23, 24).

МДА, нмоль/мл



NO, мкмоль

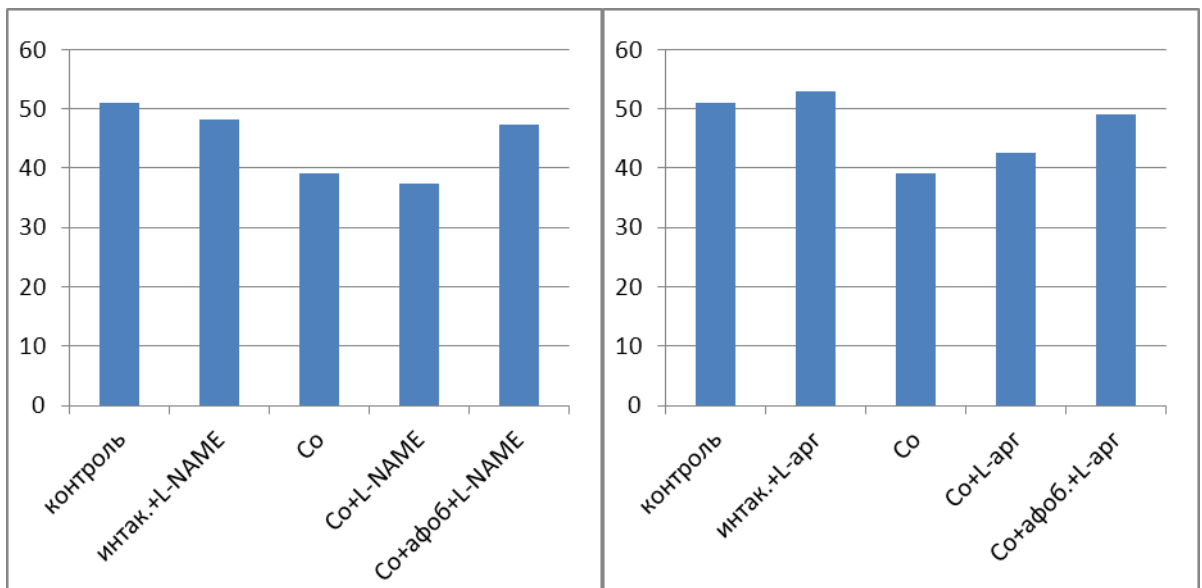
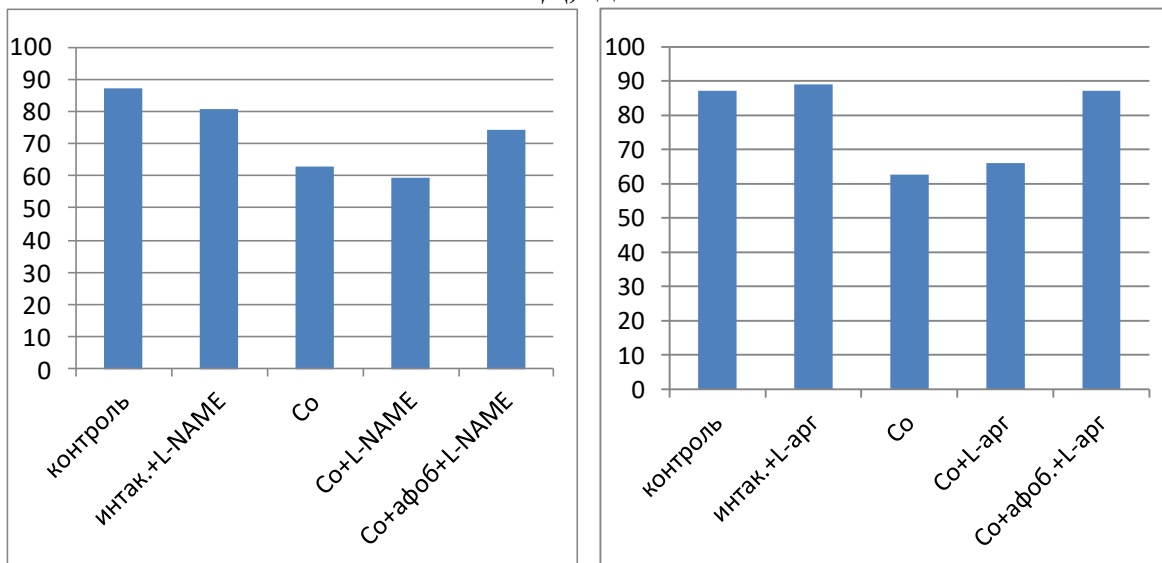
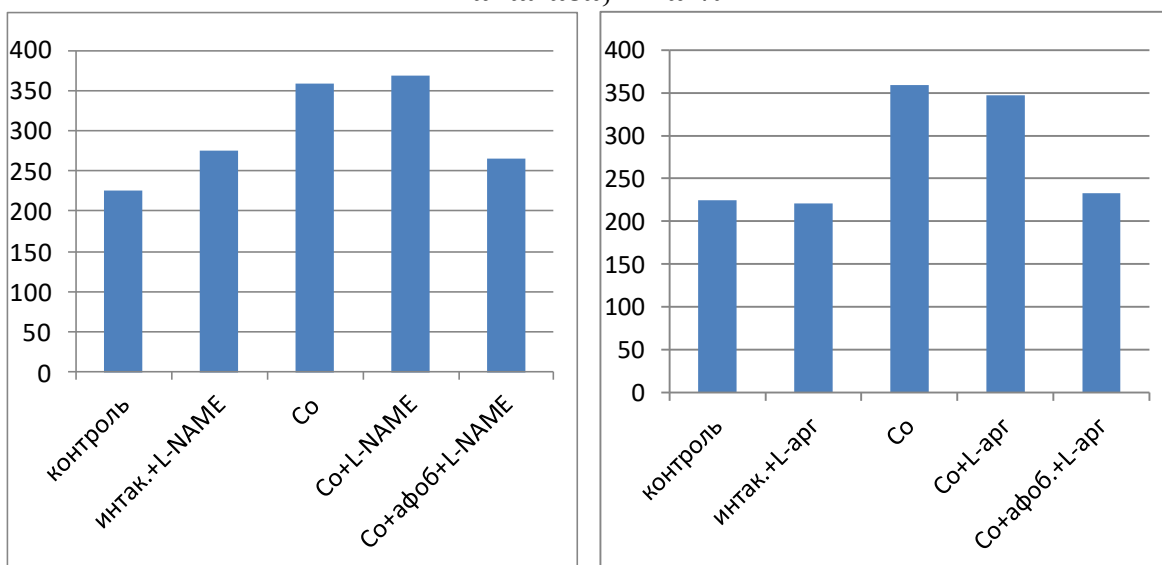


Рисунок 23 – Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на интенсивность ПОЛ и содержание NO у крыс с интоксикацией хлоридом кобальта

СОД, ед. акт.



Каталаза, мкат/л



ЦП, мг/л

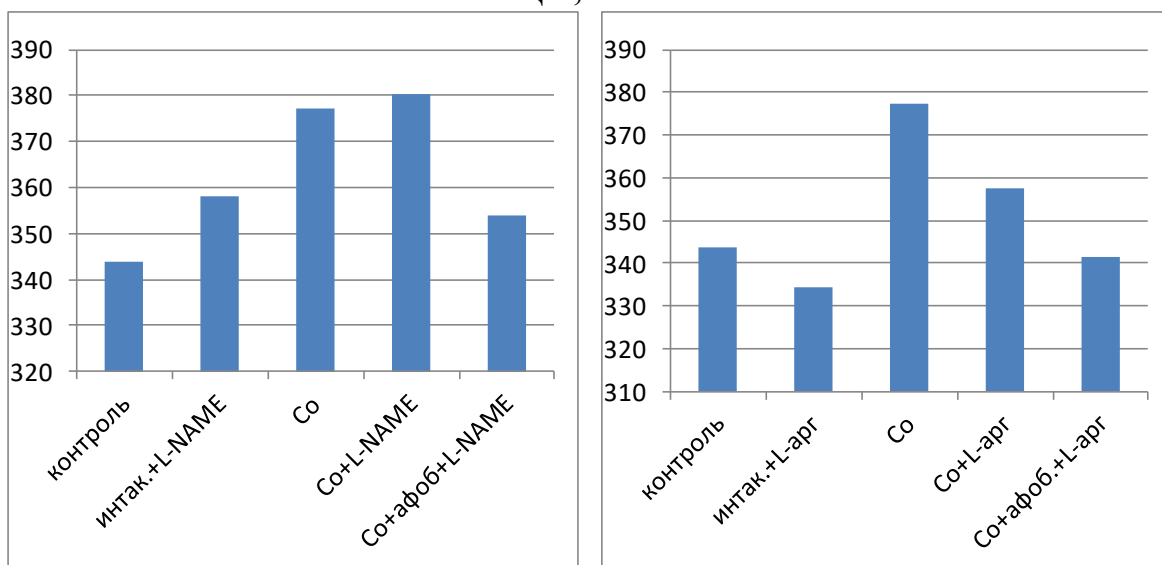


Рисунок 24 – Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на активность ферментов АОС при интоксикации хлоридом кобальта

Выявлены характерные изменения активности ферментов АОС под влиянием афобазола + модифицированный L-аргинин. Нужно отметить, что эффективность афобазола была менее выраженной. Полученные результаты коррелируют с исследованиями Chang JM, et al, 2005. В результатах анализа терапии афобазолом на фоне модифицированного L-аргинина у подопытных животных с экспозицией кобальтом происходит достоверное возрастание концентрации NOx (25,9%), причем, менее значимо, чем под влиянием комплекса афобазол + L-аргинин.

Эффективность влияния антиоксидантов на процессы ПОЛ и ферменты АОЗ подтверждена межсистемным корреляционным анализом. Выявлена у подопытных животных с токсическим влиянием на фоне терапии обратная взаимосвязь между системой ПОЛ и активностью ферментов АОС. Происходило повышение концентрации NOx. Сравнительный анализ показал наличие обратной связи с МДА при всех вариантах лечения соответственно ($r = -0,66$), $p < 0,001$.

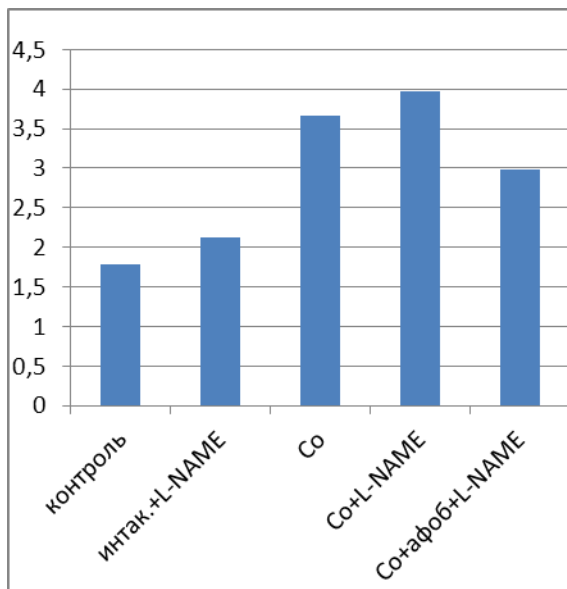
Следовательно, монотерапия афобазолом и в комплексе с аминокислотой вызвали позитивную динамику метаболических процессов и показали возможность изменения функции сосудистой выстилки в аналогичном направлении. Систематическое применение афобазола повлияло на несоответствие в сложном комплексе ПОЛ – АОЗ. Устранение расхождений в нем привело к повышению содержания оксида азота. Причиной нарушенного обмена оксида азота может быть сниженная доступность аминокислоты для нитрооксидсинтазы и появление в крови модифицированного L-аргинина, являющегося ингибитором энзима. Указанные факторы могут влиять на воспроизведение eNOS и биодоступность NO.

Доступность субстрата для eNOS зависит от молекулярной структуры эндотелия, на которую восстанавливающе действует афобазол, принимая во внимание антиоксидантное его действие и повышение транспорта ХС в клетку, а также и противоиатерогенное действие ЛВП. В другом варианте под влиянием афобазола и аминокислоты снизилось содержание общего ХС и ХС

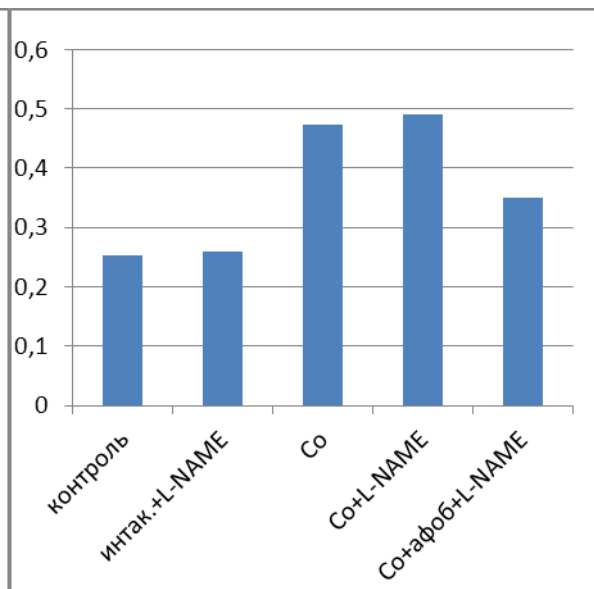
липопротеинов низкой плотности и повысился ХС ЛВП. При этом снижается и концентрация ТАГ (рисунок 25).

L-NAME

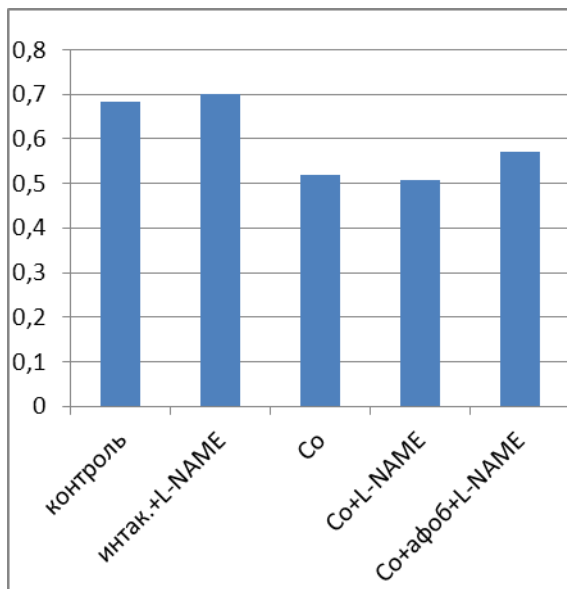
ОХС, ммоль/л



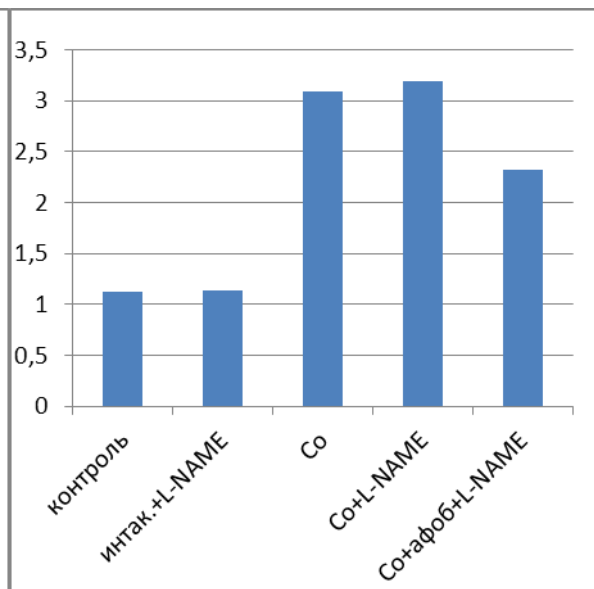
ТАГ, ммоль/л



ЛВП, ммоль/л



ЛНП, ммоль/л



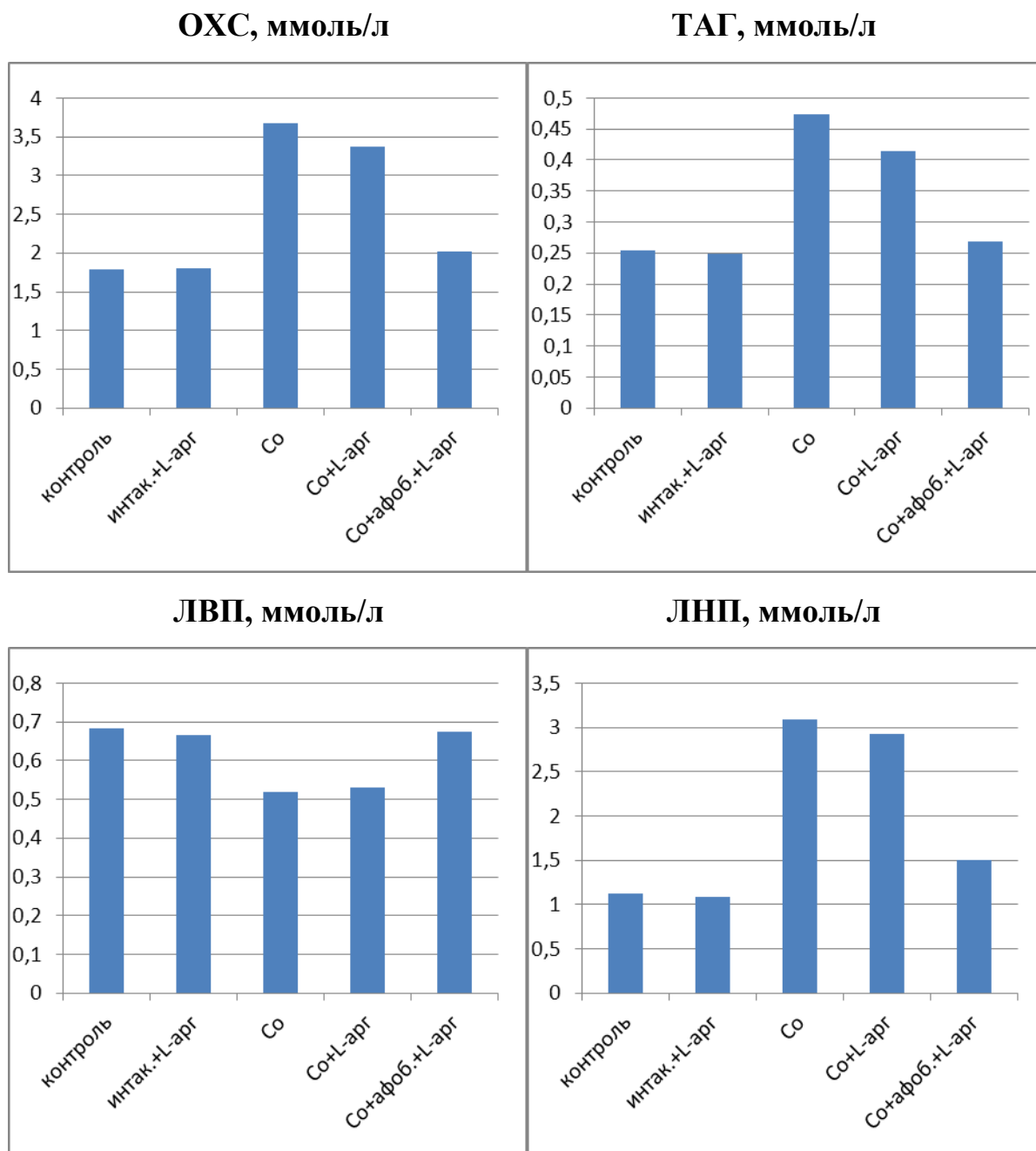
L-аргинин

Рисунок 25 – Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на обмен ХС у крыс с интоксикацией хлоридом кобальта

Выявлены межсистемные взаимосвязи между изменением обмена окиси азота и ХС ЛП низкой плотности. Превентивность предатерогенных изменений в сосудистой стенке способствовало лучшему транспорту оксида азота в ГМК. Исследования Lankina V.V., 2003 и Дзугкоева С.Г., 2013 и др. подтверждают эту возможность влияния афобазола. Изучение влияния аминокислоты в

течение месяца затравленным крысам ежедневно показали изменение активности окислительно-восстановительных процессов и увеличение содержания оксида азота. Установили, что афобазол, угнетая окислительные процессы, улучшает транспорт L-аргинина в ГМК, соответственно увеличивает концентрацию NOx. Синергизмом в этом направлении обладает улучшение обмена ХС, сопровождающееся снижением содержания не только общего ХС, но и его атерогенных фракций – β -липопротеинов. Наши данные позволяют сделать заключение о том, что афобазол и комбинация его с аминокислотой действует на фермент, продуцирующий оксид азота. Противоположные эффекты на содержание оксида азота и МДА оказывает афобазол в комплексе с модифицированным L-аргинином. Это подтверждается в исследованиях Дзугкоева С.Г., Можяевой И.В., Такоевой Е.А., и др., 2014. Можно полагать, комплекс L-аргинина и афобазола вызывает стимулирование уровня экспрессии eNOS.

Конкурентный ингибитор eNOS – модифицированный L-аргинин взаимодействует с активными участками eNOS и нарушает перенос электронов между оксидазным и редуктазным доменами фермента путем уменьшения восстановленного потенциала железа.

На основании полученных данных можно полагать, что причиной сниженного содержания NO могло быть угнетение экспрессии eNOS. Введение афобазола, обладающего антиокислительными свойствами при использовании модифицированного L-аргинина, приводило к угнетению СРО и снижению концентрации МДА в крови. При действии модифицированного L-аргинина, являющегося ингибитором NO-синтазы, выявляется способность образовывать АФК. Афобазол препятствует способности eNOS продуцировать АМК при введении модифицированного L-аргинина. Считаем, что афобазол препятствует угнетению активности iNOS и стимулированию эндотелиальной NO-синтазы (NOS-2). Такие данные в литературе присутствуют (Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R., 2006; Somers J.R., Beck P.L., Lees-Miller J.P. et al., 2008).

5.2. Влияние комплекса афобазол+L-аргинин на функциональные показатели внутренних органов у крыс при токсическом состоянии, вызванном солью кобальта

Исследования влияния афобазола и L-аргинина показали, что состояние окислительно-восстановительных процессов в ренальном веществе достоверно не отличается от контрольных величин. Такого плана изменения происходили в сердечной мышце и в гепатоцитах. Афобазол оказался эффективным и в комплексе с ингибитором eNOS - модифицированным L-аргинином, способствовал снижению интенсивности окислительных процессов, но результаты были сравнительно ниже уровня контроля и монотерапии.

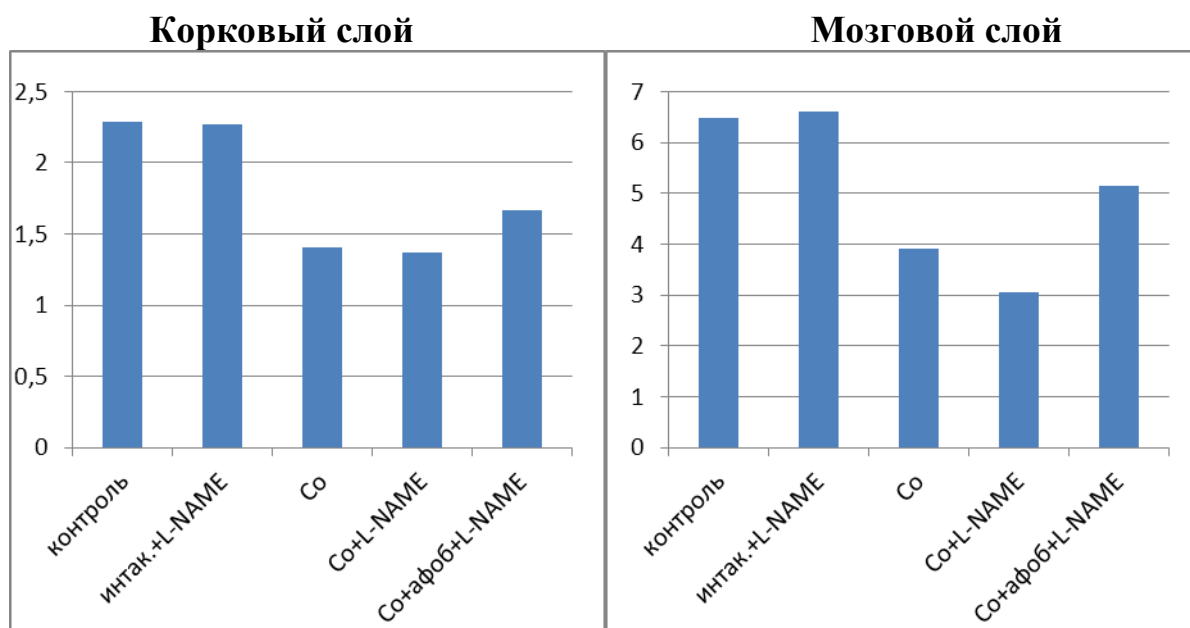
Угнетению интенсивности липопероксидации способствует, в частности, энзим, осуществляющий дисмутацию O_2^- , который активируется на фоне афобазола. Нарбатываемый в реакции дисмутации пероксид разлагается каталазой и ЦП. В условиях снижения АФК и угнетения ПОЛ снижается активность этих энзимов, но не достигает контрольных величин. Комплексное применение афобазола с модифицированным L-аргинином, ингибируя воспроизведение энзима, вызывает разобщение между редуктазными и оксидазными доменами фермента.

Следовательно, одним из важных свойств афобазола является не только ингибирование ПОЛ, но и устранение расхождений в системе ПОЛ – АОС.

Систематическая интоксикация хлоридом кобальта выявила системный характер и, возможно, сопровождалась повреждением функционального состояния внутренних органов. Поэтому мы посчитали необходимым исследовать активность мембранного фермента – Na-транспортирующего в гомогенатах почечной печеночной и миокардиальной тканях. Параллельно с этим измерялась активность сывороточных специфических для органов энзимов - АлАТ, АсАТ, мембранного - ГГТП и экскреторного энзима – щелочной фосфатазы под влиянием афобазола. Данные автора впервые продемонстрировали возрастание активности АТФ-азы, активируемой Na^+ и K^+ в ренальной, сердечной тканях и гепатоцитах под влиянием афобазола. Еще

большая эффективность была при терапии комплексом афобазол + аминокислота. В конечном результате все эти влияния афобазола нашли свое отражение в восстановлении молекулярной структуры мембраны клетки. Поскольку сам анксиолитик - афобазол обладает антиоксидантными свойствами, он оказывается эффективным на фоне ингибитора eNOS – L-NAME, хотя его влияние не так сильно выражено (рисунок 26,27).

**Na,K-АТФ-аза (мкмоль Рн/мг белка/час)
L-NAME**



L-аргинин

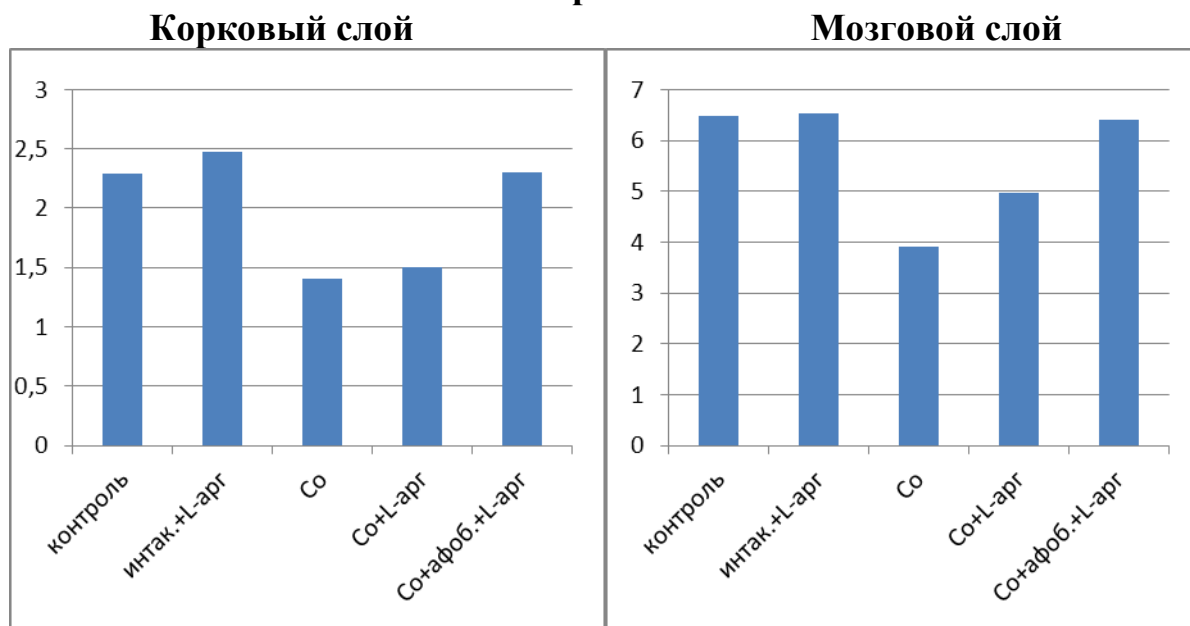
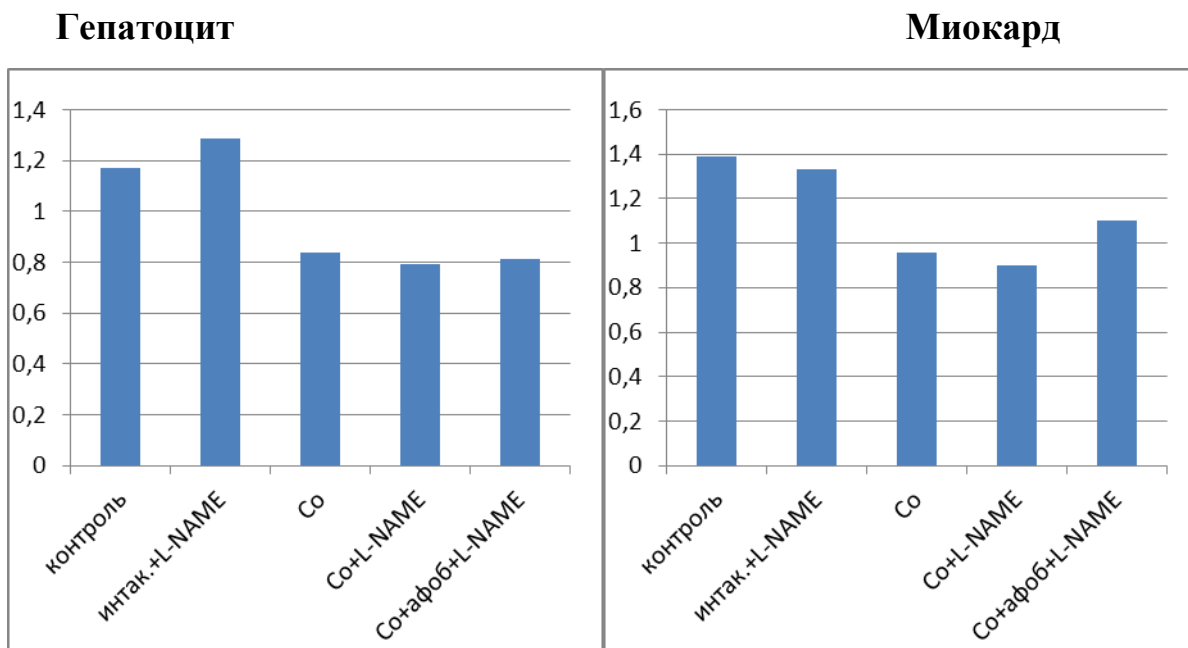


Рисунок 26 – Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на активируемую Na,K АТФ-азу ренальной ткани у крыс с интоксикацией хлоридом кобальта

Na,K-ATФ-аза (мкмоль Рн/мг белка/час)

L-NAME



L-аргинин

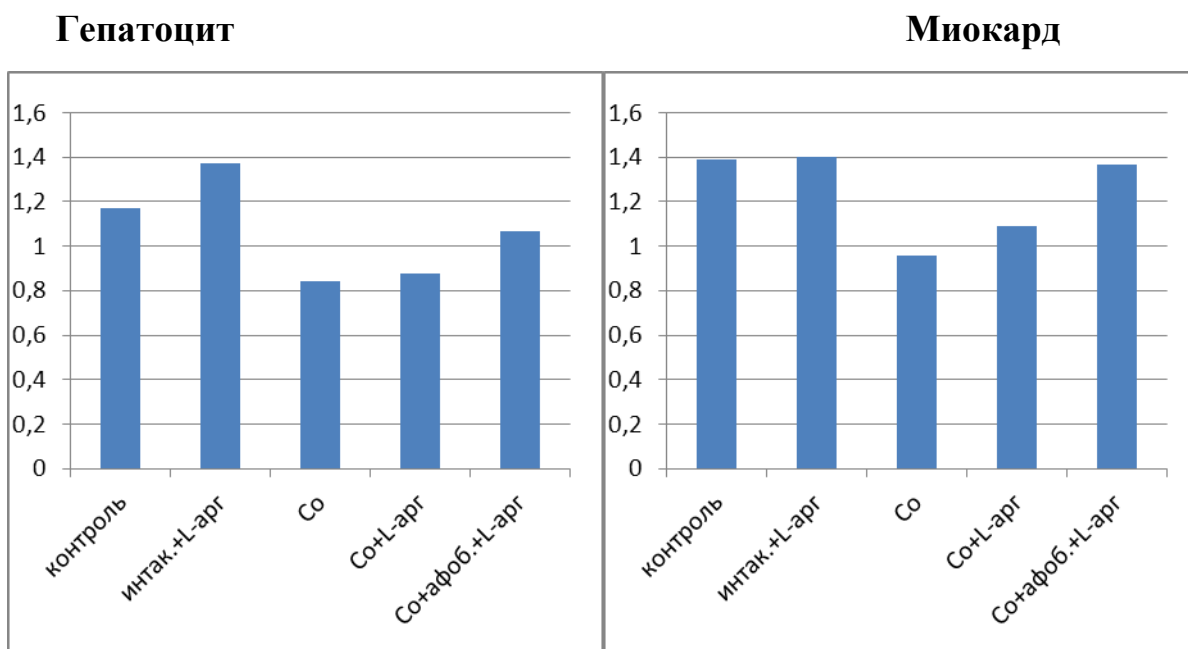
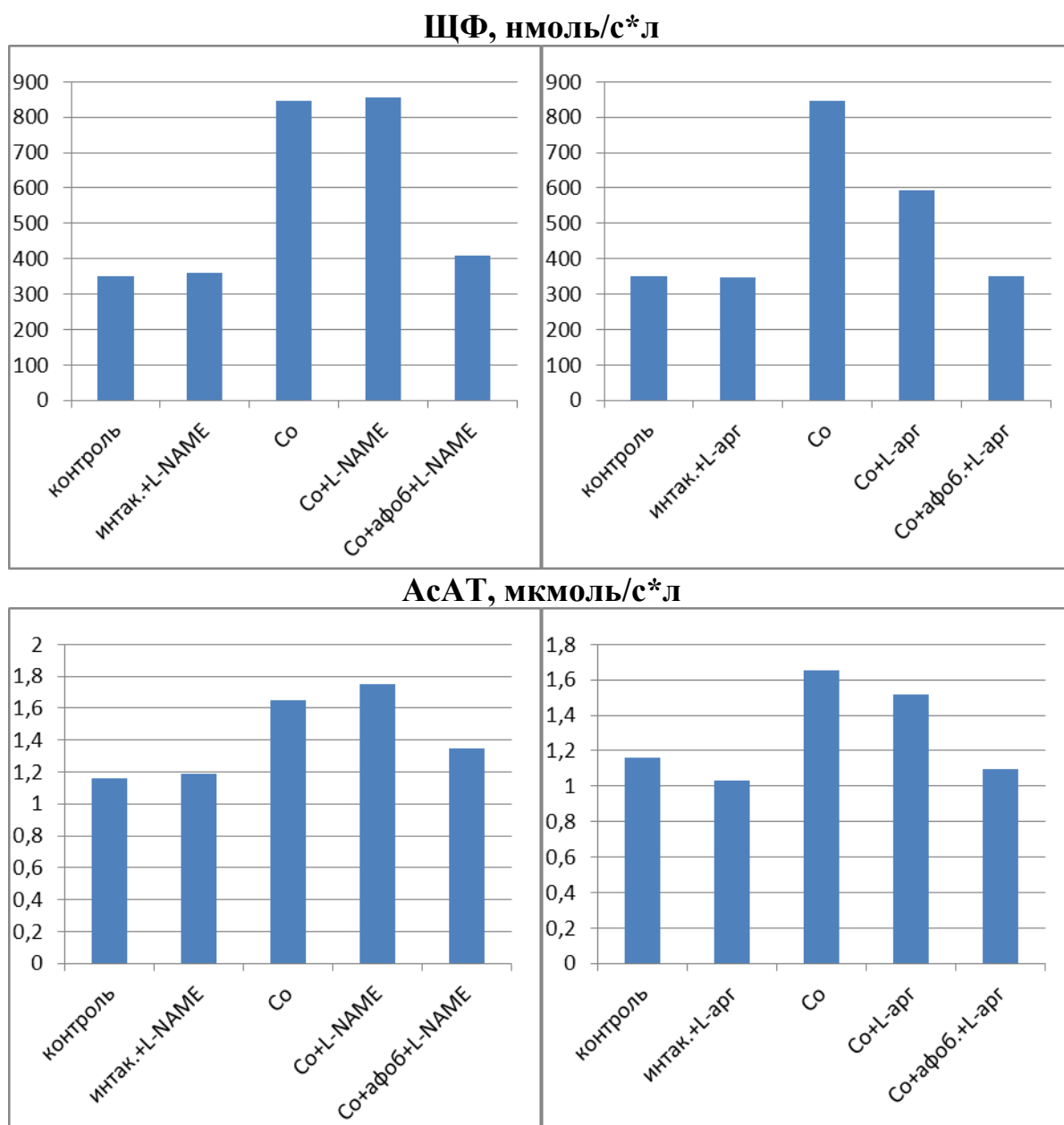


Рисунок 27 – Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на активируемую Na,K АТФ-азу ренальной ткани у крыс с интоксикацией хлоридом кобальта

Анализ межсистемных связей показал, что между содержанием конечного продукта ПОЛ в ренальной, сердечной тканях и гепатоцитах и АТФ-

азой существует обратное взаимодействие. Встраивание сигма-1 рецептора с липидными микродоменами в ЦП мембрану клеток внутренних органов привело к восстановлению липидного микроокружения для белков, в частности, ферментов. Следствием этих влияний афобазола является повышение активности АТФ-азы и сниженное содержание энзимов, специфичных для органов, в сыворотке крови. Эти эффекты были эффективнее при терапии комплексом афобазол + аминокислота, и менее значимая терапия происходила афобазолом на фоне модифицированного L-аргинина. Афобазол и его комплекс с L-аргинином оказался более эффективным в этих механизмах влияния (рисунок 28).



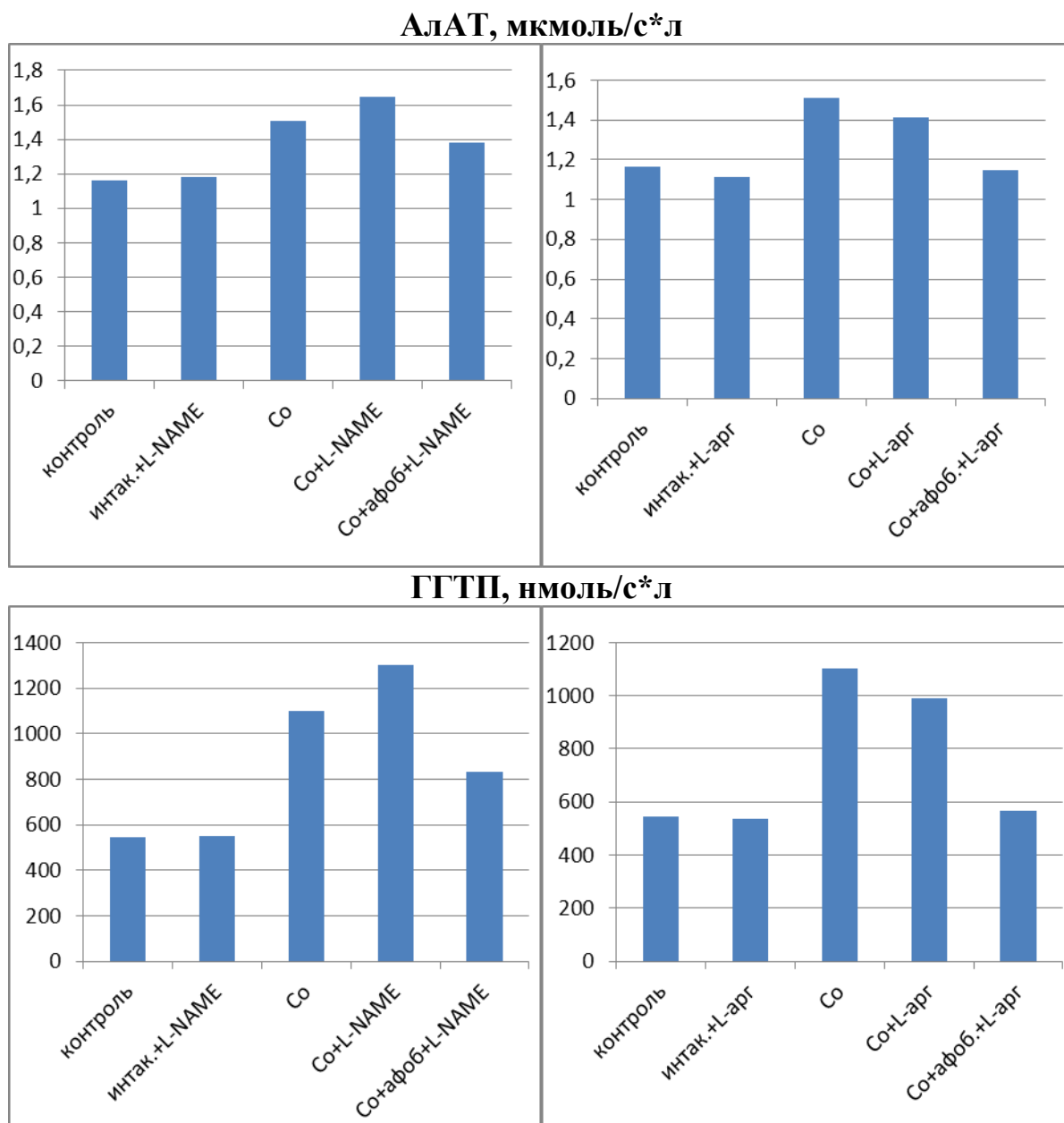


Рисунок 28 – Влияние афобазола и регуляторов экспрессии eNOS на активность экскреторного и органоспецифичных энзимов в сыворотке крови при системной интоксикации хлоридом кобальта

Афобазол и L-аргинин, обладающие антиоксидантными свойствами, вызывают не только позитивные метаболические изменения, но и частично происходило восстановление молекулярной структуры клеточных мембран в ренальной, сердечной тканях и гепатоцитах. В противоположность этому модифицированный L-аргинин – L-NAME препятствовал активации мембранного фермента в клетках внутренних органов (почки, печень, сердце), а также снижению активности специфичных для висцеральных систем энзимов в сыворотке крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсификация процессов ПОЛ и нарушение метаболизма NO является патогенетическим звеном отрицательного влияния цветных металлов, включая кобальт. Метаболиты липопероксидации вызывают структурно – функциональные изменения в клеточных мембранах. Нарушение молекулярной структуры фосфолипидного бислоя в результате окисления ПНЖК может приводить к понижению функциональной активности структурных белков и ферментов (Гутникова А.Р., Махмудов К.О. и др., 2009; Дзугкоева Ф.С, Дзугкоев С.Г. и др., 2009).

Однако кобальт, будучи микроэлементом, играет важную биологическую роль в организме, входит в состав цианкобаламина (В₁₂), влияет на гемопоэз, процессы кроветворения, является кофактором ряда ферментов. Вместе с тем избыточное содержание кобальта в организме вызывает повреждение в сосудистой системе и внутренних органах, включая почки, могут происходить в них дистрофические и некробиотические изменения, приводящие к нарушению их функционирования (Бондаренко Л.В., 2007; Генинг Т.П. и др., 2004; Szakmary E. et al., 2001; Zhang Y. et al., 1990). Наряду с органами выделения, кобальт повреждает миокардиоциты, гепатоциты, в которых происходит обезвреживание ксенобиотиков (микросомальное окисление).

Кобальт, как липофильное вещество, легко всасывается в сосудистую систему, при этом оказывает повреждающее действие на сосудистый эндотелий, являющийся патогенетическим звеном развития сосудистых осложнений. Систематическая кобальтовая интоксикация вызывает изменение биохимических показателей крови - маркеров повреждения эндотелия. Повышенные концентрации кобальта, через образование активных форм кислорода, инактивируют ферменты аэробного окисления, включая цикл Кребса, повреждают внутреннюю мембрану митохондрий, что способствует нарушению функционирования дыхательной цепи. В результате ингибирования

аэробных процессов и дыхательной цепи развивается патологический процесс - гипоксия (Охрименко С.М., и др. 2005; Соседова Л.М., 2014). Одним из основных сосудорасширяющих веществ является окись азота, которая обладает мощным вазодилатирующим и вазопротекторным эффектом. Итак, снижение уровня биологически активного NO, продуцируемого сосудистым эндотелием или снижение его биодоступности, исследователи считают ведущим фактором развития эндотелиальной дисфункции (Марков Х.М., 2005). Среди основных механизмов следует отметить и изменения активности и/или экспрессии eNOS, сниженный синтез NO из L-аргинина, чувствительность ГМК к NO или его распад при взаимодействиях с АФК, включая O_2^- , а также другие продукты липопероксидации. Для его образования нужны два одновременных явления: функция нитрооксидсинтазы и продукция аминокислоты – L-аргинин, из которого и образуется оксид азота (Саульская Н.Б., Горбачевская А.И., 2010). Оксид азота является мессенджером внутриклеточных регуляторных процессов, необходимых для протекания адекватного метаболизма (Ванин А.Ф., 2000; Тарасенко Н.В. и др., 2011). Поэтому, снижение концентрации окиси азота в крови является составляющей компонентой общего патологического процесса, метаболических нарушений и негативных изменений во всей системе кровообращения. Развивается характерное для этого состояние, которое называется дисфункцией эндотелия, тоже общий патологический процесс, лежащий в основе сосудистых осложнений (Марков Х.М., 2005).

В доступной литературе авторами описаны разные методологические подходы, но очень мало или отсутствуют исследования о регулирующем влиянии афобазола и эндогенных субстратов, влияющих на обмен NO и экспрессию eNOS в условиях окислительного стресса. В доступной литературе почти отсутствуют комплексные исследования, посвященные изучению механизмов влияния афобазола и его комбинации с эндогенными регуляторами экспрессии eNOS на патогенетические звенья дисфункции эндотелия и

изменения со стороны ренальной, сердечной тканей, а также основной биохимической лаборатории – гепатоцита.

Поэтому следующая задача заключалась в изучении причин повреждения сосудистой стенки и мембран клеток почек, печени, миокарда, т.е. комплексно изучить роль причинно-следственных связей нарушения системного окислительного процесса и дефицита оксида азота в патогенезе сосудистых нарушений.

Эксперименты проводили на 190 крысах-самцах линии Wistar в возрасте 10-14 мес., массой 175 - 220 г. В контрольную группу входили интактные животные (n=30), по возрасту и массе сопоставимые с основной группой. Модели NO-дефицитных состояний создавали введением хлорида кобальта впервые в дозе 2 мг/кг массы животного и его комбинации с L-NAME у крыс. Развитие токсических влияний определяли по прошествии месяца.

Дизайн исследований был следующий:

1. контрольная группа – 30 голов;
2. крысы с кобальтовой интоксикацией без лечения – 20 голов;
3. интактные крысы + L-аргинин в дозе 10 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
4. интактные крысы + L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
5. крысы с Co + L-NAME в дозе 25 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
6. крысы с Co + L-аргинин в дозе 10 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
7. крысы с Co + афобазол в дозе 10 мг/кг веса животного в течение 30 дней – 20 голов;
8. крысы с Co + афобазол в дозе 10 мг/кг веса животного + L-аргинин 10 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;
9. крысы с Co + афобазол в дозе 10 мг/кг веса животного + L-NAME 25 мг/кг в течение 30 дней – 20 голов;

На фоне систематической интоксикации хлоридом кобальта у подопытных животных выявилась активация общего патологического процесса

липопероксидации, причем не только в эритроцитах, а почти во всех клетках организма, т.е. системный окислительный процесс. Интенсивность ПОЛ зависит от уровня кобальта в плазме крови и эритроцитах и между ними выявляется однонаправленная взаимосвязь ($r = + 0,57$, $p < 0,001$). Доказано статистически значимое уменьшение функциональной активности СОД в биологических средах на фоне интенсификации окислительных процессов. В противоположность этому, функция каталазы и ЦП активизировались – как проявление компенсаторной реакции организма.

Не только СОД отвечает за реакцию дисмутации супероксиданион радикала, продуктом которого является пероксид, но пероксид образуется во многих других химических реакциях. Поэтому повышение активности каталазы и концентрации ЦП являются свидетельством адаптивной реакции организма с целью инактивации метаболита - перекиси водорода.

Нарушение окислительно-восстановительных процессов в токсических условиях является основной составляющей в патогенезе NO-дефицитного состояния. Повышение содержания вторичного продукта ПОЛ - МДА на 10,9% приводит к снижению концентрации суммарных метаболитов оксида азота на 28,0% ($p < 0,001$). Эти метаболические нарушения лежат в основе развития дисфункции эндотелия, при этом патогенетическую роль играют межсистемные корреляционные связи. Установлено наличие отрицательной сильной связи между снижением концентрации NOx и повышением МДА в крови ($r = 0,67$).

Для определения роли аминокислоты L-аргинина и его поступления в эндотелиоциты автор изучал изменения в обмене ХС: ОХС, ХС ЛНП, ХС ЛВП, ТАГ. Результаты исследований показали, что кобальтовая интоксикация вызвала статистически достоверное увеличение содержания общего холестерина, причем, в ЛВП выявлено снижение его уровня и повышение в ЛНП, т.е. в атерогенных ЛП, которые являются факторами риска развития атерогенеза. Одновременно отмечается увеличение содержания триацилглицеринов.

Таким образом, в токсических условиях выявляется повышение атерогенных липопротеинов - β -липопротеинемия – факторов риска развития

дисфункции эндотелия, что и способствует предатерогенным изменениям в эндотелии сосудов. Анализируя причинно-следственные связи, автор считает, что при повышении реактивных радикалов и образование липоперекисей ПНЖК, происходит молекулярная перестройка фосфолипидов, что отражается на структуре цитоплазматической мембраны. Вызванные модифицированные ЛНП изменяя эндотелий сосудов, включая предатерогенные и антиатерогенные изменения, которые являются патогенетическим звеном нарушения транспортного механизма L-аргинина. Роль L-аргинина в регуляции образования NO установлена.

Поступление в организм модифицированного L-аргинина, угнетающего нитрооксидсинтазу, сопровождалось повышением концентрации общего холестерина и ХС ЛНП. Концентрация ХС ЛВП показала статистически убедительное снижение.

Из полученных данных вытекает заключение, что важной составляющей патогенеза NO-дефицитного состояния и нарушения функции сосуда, надо считать аминокислоту - L-аргинин. Участие L-аргинина в патогенетическом звене снижения продукции NOx и его целенаправленная терапия играют общее медико-биологическое значение (Моргулис И.И., Хлебопрос Р.Г., 2005).

Итак, итоговые результаты показали, что введение аминокислоты приводит, несомненно, к повышению концентрации оксида азота, включая особые условия – системное токсическое состояние. Параллельно с этим устраняется рассогласование в сложной функциональной системе ПОЛ - АОЗ и выявляется увеличение концентрации NOx. В противоположность этому при введении подопытным животным модифицированного L-аргинина отмечается два параллельных процесса: активация общего патологического процесса - липопероксидации, сопровождающаяся повышенным содержанием МДА и снижением функции NO-синтазы и концентрации NOx. В эффектах токсического воздействия хлорида кобальта участвует изменение в молекулярной структуре NO-синтазы, что и является причиной недостаточной функции и возможности продукции активных радикалов O₂ вместо оксида азота.

В основе развития токсических повреждений лежит прогрессирующее нарушение функции эндотелия и физико-химических свойств мембран клеток внутренних органов. Маркерами повреждения деятельности внутренних органов являются повышение в крови содержания специфичных для органов энзимов: трансаминаз (АлАТ, АсАТ), мембранного и экскреторного энзимов, соответственно ГГТП и фосфатазы, активной в щелочной среде, а также АТФ-азы, активируемой Na и K при системной интоксикации хлоридом кобальта.

Данные анализа показателей мембранных нарушений клеток внутренних органов при нарушении окислительно-восстановительного потенциала у подопытных животных свидетельствуют о доказательном снижении активности Na,K-транспортирующего фермента в ренальной, сердечной тканях и в гепатоцитах.

Полученные автором результаты согласуются с литературными сведениями об умеренном снижении энергообразования, дефиците АТФ и АТФ-зависимых энзимов, включая АТФ-азу, активируемую Na и K (Суворов И.М., Успенская Н.В. и др., 1978; Дзугкоева Ф.С. и др., 2009).

С целью коррекции была применена патогенетически обоснованная терапия афобазолом и его комплекс с L-аргинином. В другом варианте корректирующая роль афобазола на состояние системы ПОЛ – АОС, обмен ХС, мембранных механизмов нарушений в клетках внутренних органов исследовались при систематическом введении кобальта и модифицированного L-аргинина. Все результаты в исследованиях автора нашли свое доказательное подтверждение, поскольку все данные были обработаны статистически и были достоверны. Контролем служили данные, полученные только под влиянием аминокислоты и модифицированного L-аргинина у подопытных животных с токсическим воздействием.

Результаты влияния афобазола в ренальной ткани показывают угнетение липопероксидации. Статистика демонстрирует о приближении метаболических изменений – как факторов риска развития дисфункции эндотелия к контрольным значениям. Однонаправленные данные, характеризующие интенсивность СРО, выявлены при лечении комбинации афобазола с

аминокислотой. Такой комплекс афобазол + аминокислота оказал более доказательное угнетение общего патологического процесса ПОЛ по данным содержания МДА в ренальной, сердечной тканях и гепатоцитах. Терапия афобазолом на фоне NO-дефицитного состояния, вызванного модифицированным L-аргинином, вызвала не столь значимые изменения в изучаемых системах. Показаны характерные, но менее эффективные изменения содержания энзимов в сыворотке крови при терапии афобазолом на фоне Co и модифицированного L-аргинина.

Существуют причинно-следственные связи между повышением активности СОД и наличием супероксид-анион радикала. Образовавшаяся в реакции дисмутации перекись водорода распадается в реакции с участием каталазы. Эти взаимосвязи предупреждают образование пероксинитрита, способного оказывать повреждающее действие на эндотелий (Chang JM, et al., 2005; Меньщикова Е.Б., Зенков Е.К., 2013).

Более значимая и обоснованная патогенетически коррекция несостоятельности и расхождений в системе ПОЛ – АОЗ выявлена под влиянием комплекса афобазол+L-аргинин. В противоположность этому действие афобазола на фоне Co с модифицированным L-аргинином оказывается не столь позитивным, что выражается в менее значимых изменениях активности СОД, каталазы и концентрации церулоплазмينا.

Анализируя механизм влияния афобазола следует отметить участие сигма-1 рецептора, способного мигрировать в мембрану клетки в составе липидных микродоменов (Halliwell V., 2006). Следует считать, что инициированный афобазолом транспорт сигма-1 рецептора в область цитоплазматической мембраны может способствовать восстановлению фосфолипидного состава мембран, нарушенного ПОЛ. Эти данные были получены авторами в условиях *in vivo* и *ex vivo* на культуре клеток нейронов гиппокампа при оксидативном стрессе (Середенин С.Б., Воронин М.В., 2009; Cuevas J., Behensky A., Deng W., 2011). Другая версия авторов допускает, что подавление свободно-радикальной агрессии афобазолом обусловлено его способностью уменьшать через сигма-1-рецепторы активность iNOS

(Vagnerova K, Hurn P.P., Bhardwai A., Kirsch J.B., 2006). Это рассматривается как основной механизм нарушения функции ишемизированных кардиомиоцитов.

Таким образом, терапия афобазолом приводит к равновесию в сопряженной системе ПОЛ – АОС, активации и завершению аэробных процессов окисления, восстановлению адекватности метаболизма. Данные показали возрастание функциональной способности АТФ-азы, активируемой Na и K в ренальной, сердечной тканях и гепатоцитах при терапии афобазолом и комплексом с аминокислотой. Следовательно, анксиолитик афобазол в комплексе с аминокислотой через сигма-1-рецепторы цитоплазматической мембраны клеток приводит к структурным изменениям фосфолипидного бислоя, т.е. липидного микроокружения. Эффективность анксиолитика – афобазола и его комплекса с аминокислотой на метаболические и функциональные изменения подтвердилась проведением внутрисистемного и межсистемного корреляционного анализа.

В соответствии с разработанной схемой о механизмах влияния афобазола на эндотелиальную дисфункцию играет роль коррекция звеньев патогенеза: ингибирование общего патологического процесса – ПОЛ, устранение недостаточности АОС. Подавление вторичных метаболитов благоприятствует нормализации структуры эндотелия сосудов и цитоплазматических мембран. Изменения в метаболизме ХС способствуют лучшему проникновению L-аргинина в ГМК сосудистой стенки и соответственно продукции окиси азота. Происходит восстановление фосфолипидного состава сосудистой стенки и цитоплазматических мембран висцеральных органов. Маркерами этих позитивных изменений является уменьшение вторичных продуктов ПОЛ, восстановление липидного микроокружения АТФ-азы и ее активности, и снижение содержания специфических для органов энзимов в крови. Полученные результаты доказательны и статистически достоверны, что позволяет рекомендовать использование афобазола и его комплекс с L-аргинином для устранения токсического влияния тяжелых металлов на организм (рисунок 29).

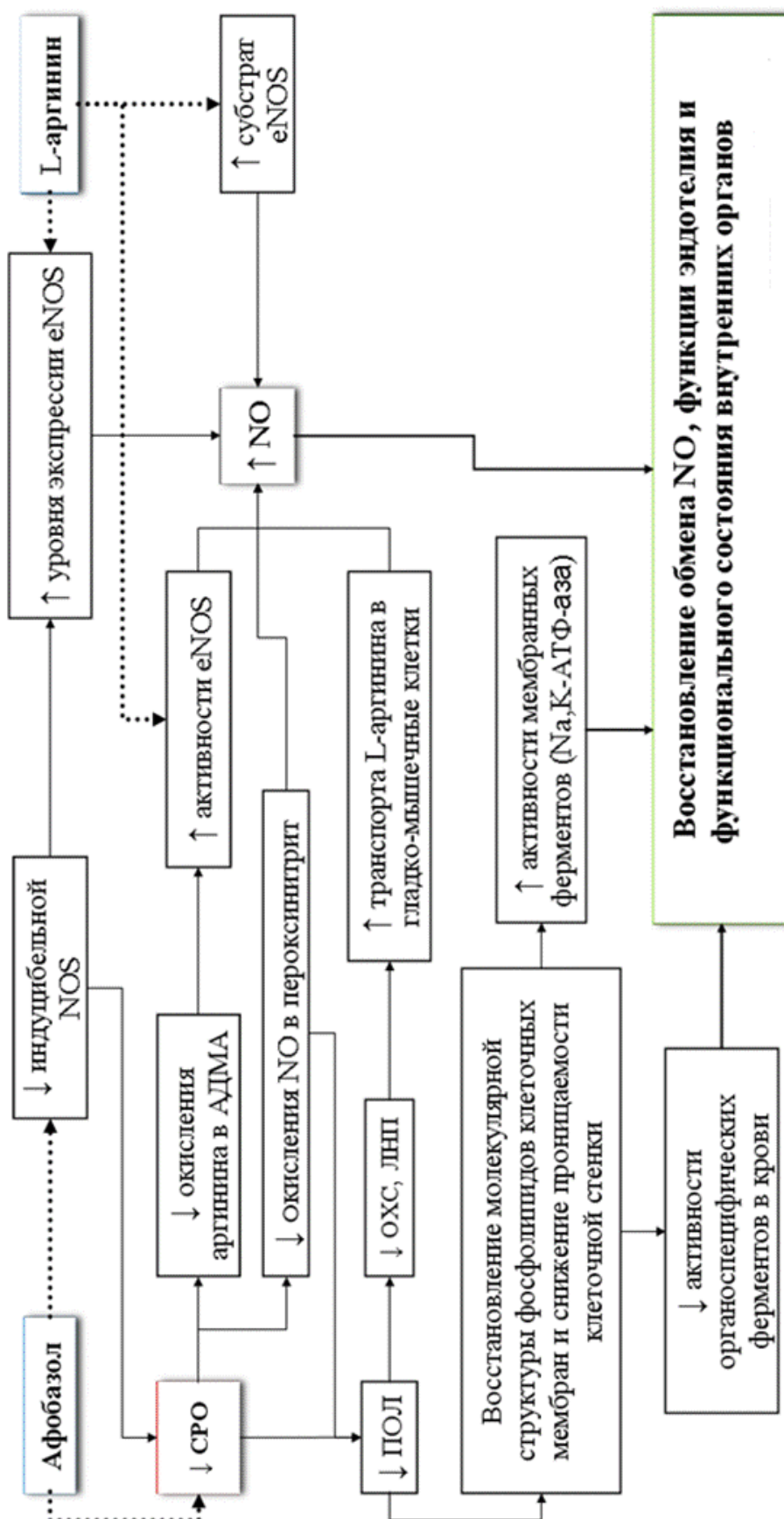


Рисунок 29 – Влияние афобазола на патогенетические звенья дисфункции эндотелия и патологию висцеральных органов (печени, почек, сердца) при интоксикации хлоридом кобальта

ВЫВОДЫ

1. Афобазол в токсических условиях, вызванных кобальтом, обладает способностью принимать на себя электроны АМК, снижает их реактивность, подавляет развитие общего патологического процесса – окислительного стресса. Маркерами этого влияния афобазола является понижение содержания МДА в эритроцитах, в печеночной, сердечной и ренальной тканях. В защитных системах организма от окислительных процессов выявляется повышение активности СОД и устраняется дисбаланс в АОС. Снижение интенсивности липопероксидации - как патогенетического звена NO-дефицитного состояния сопровождается повышением концентрации суммарных метаболитов оксида азота.

2. Афобазол, угнетая развитие общего патологического процесса ПОЛ, восстанавливает липидное микроокружение и активность Na,K-АТФ-азы и уменьшает содержание в сыворотке крови специфичных для органов энзимов: трансаминаз – АлАТ, АсАТ, а также ГГТП и щелочной фосфатазы.

3. Комбинация афобазола с L-аргинином эффективнее угнетает липопероксидацию. В этом механизме участвует АОС, характеризующаяся восстановлением рассогласования в ней, вследствие возрастания функциональной способности СОД и снижения активности каталазы и концентрации ЦП. Содержание оксида азота увеличивается, активируется NO-образующая функция и доступность аминокислоты L-аргинина в эндотелий, нарушенная ингибитором eNOS - L-NAME.

4. В механизме повышения доступности субстрата L-аргинина для ГМК сосудистой системы принимает участие антиоксидантное действие афобазола и положительная динамика в обмене холестерина. Происходит снижение в сыворотке крови атерогенных β -липопротеинов.

5. Степень выраженности корригирующего влияния афобазола на патогенетические механизмы метаболических нарушений в висцеральных органах потенцируется регулятором экспрессии eNOS– L-аргинином и она

снижается на фоне ингибитора eNOS–модифицированного L-аргинина (L-NAME).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки степени токсичности тяжелых металлов, в частности кобальта, в организме рекомендуем учитывать состояние пероксидации липидов, а также метаболизма NO и ХС, особенно атерогенных липопротеинов и активность в сыворотке крови органоспецифичных ферментов: АлАТ, АсАТ, ГГТП и экскреторного – щелочной фосфатазы.
2. Позитивное влияние на поддержание метаболического гомеостаза анксиолитиком афобазолом и L-аргинином, позволяет рекомендовать такой методологический подход для коррекции нарушений в условиях действия экопатогенных факторов (тяжелых металлов), особенно для работающих на вредных производствах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- **ADMA** – ассиметричный диметиларгинин
- **eNOS (NOS-3)** – эндотелиальная NO-синтаза
- **L-NAME** – L-nitro-arginin-methyl-ester–NG аргининметиловый эфир
- **Na⁺,K⁺АТФ-аза** – натрий, калиевая аденозинтрифосфатаза
- **NO** – оксид азота
- **АДФ** – аденозиндифосфат
- **АлАТ** – аланинаминотрансфераза
- **АМК** – активные метаболиты кислорода
- **АОЗ** – антиокислительная защита
- **АОС** – антиоксидантная система
- **АсАТ** – аспартатаминотрансфераза
- **АТФ** – аденозинтрифосфат
- **АФК** – активные формы кислорода
- **ГГТП** – гаммаглутамилтранспептидаза
- **ГМК** – гладко-мышечная клетка
- **ЛНП** – липопротеиды низкой плотности
- **ЛВП** – липопротеиды высокой плотности
- **МДА** – малоновый диальдегид
- **ОХС** – холестерин общий
- **СОД** – супероксиддисмутаза
- **ПОЛ** – перекисное окисление липидов
- **СРО** – свободнорадикальное окисление
- **ТАГ** – триацетилглицериды
- **ТГБП** – тетрагидробиоптерин
- **ЦПЭ** – цепь переноса электронов
- **ЩФ** – щелочная фосфатаза
- **ЭК** – эндотелиальная клетка
- **ЭПР** – эндоплазматический ретикулум

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов В.В. Интеграция иммунной и нервной систем. – Новосибирск: Наука, 1991. – 237 с.
2. Аведисова А.С., Чахава В.О., Лесс Ю.Э., Малыгин Я.В.. Тревожные расстройства. Новые лекарственные препараты в терапии генерализованного тревожного расстройства // Consilium Medicum. - 2006. - №2. - С. 122-127.
3. Аведисова А.С., Чахава В.О., Лесс Ю.Э., Малыгин Я.В. Новый анксиолитик "Афобазол" при терапии генерализованного тревожного расстройства: результаты сравнительного исследования с диазепамом // Consilium Medicum. – 2006. - №8. - С. 116-119.
4. Акмаев И.Г. Взаимодействие нервных, эндокринных и иммунных механизмов мозга // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 1998. – Т. 98, №3. – С. 54-56.
5. Акмаев И.Г., Гриневич В.В. Нейроиммуноэндокринология гипоталамуса. – М.: Медицина, 2003. – 168 с.
6. Акопов С.Э., Канканян А.П. Инактивация оксида азота (NO) полиморфноядерными лейкоцитами как механизм развития поражений пародонта // Стоматология. – 1996. –Т. 76, № 2. – С. 12-14.
7. Аксенова М.Е. Тяжелые металлы: механизмы нефротоксичности // Журнал "Нефрология и диализ". - 2000. - Т.2. - №1-2. – С.39-43.
8. Албегова Н.Р. Физиологический анализ влияния цеолита ирлит-1 на почечные эффекты хлорида кобальта, его распределение и выведение из организма: Автореф.дисс. .канд.биол.наук., Ростов/Дону, 2004.-С.21.
9. Албегова Н.Р., Брин В.Б., Албегова Ж.К. Влияние глины Ирлит-1 на почечные эффекты хлорида кобальта, его распределение в организме и экскрецию с мочой // Вестник МАНЭБ. - Том 7. - №2(50).- 2002. - С.61-67.
10. Албертс А., Брей Д., Льюис Р. и др. Молекулярная биология клетки: В 3 т.: Пер. с англ. 2-е изд. М.: Мир, 1994.

11. Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г. Неврозы и перекисное окисление липидов. М.: Наука, 1991. - 144с.
12. Александровский Ю.А., Поюровский М.В., Незнамов Г.Г., Середенин С.Б. Перекисное окисление липидов при эмоциональном напряжении и неврологических расстройствах // Журнал неврологии и психиатрии. – 1988. - №88(11). – С. 95–101.
13. Аметов А. С., Демидова Т. Ю., Косых С. А. Синтез оксида азота в эндотелии сосудов у больных СД 2-го типа // Клиническая медицина. – 2005. - №8. – С. 62-68.
14. Антипова Т.А., Сапожникова Д.С., Бахтина Л.Ю. и др., Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. - Т72. - №(1). – С. 12-14.
15. Бабюк И.А., Шульц О.Е.. Исследование эффективности Афобазола для лечения больных с генерализованным тревожным расстройством // Международный неврологический журнал. – 2008. – Т. 3. - №19. - С. 93-96.
16. Баласанян М.Г. Изучение роли оксида азота в механизмах нейропротекторного и анксиолитического действия афобазола в сравнительном аспекте. Автореф. дис. докт. фар. наук, Ереван (2003).
17. Баласанян М.Г. Тезисы докладов 2-го съезда Российского научного общества фармакологов // «Фундаментальные проблемы фармакологии» - 2003. - Т. 1. - С. 57.
18. Баласанян М.Г. Анксиолитическая активность афобазола в условиях гипокинезии у крыс с высокой и низкой двигательной активностью // Медицинская наука Армении / НАН Армении.- 2003. - С. 15-21.
19. Банин В.В., Алимов Г.А. Эндотелий как метаболически активная ткань: синтетические и регуляторные функции // Морфология. – 1992. - № 2. – С. 10-35.
20. Башилов А.В., Русланов А.Д. Изучение процессов окисления липидов методом моделирования // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. - 2009. -Т. 1. -№ 7. - С.42-44.

21. Болдырев А.А. Функциональная активность Na,K-АТФ-азы тканей в норме и при патологиях. // Украинский биохимический журнал. - 1992. -Т. 64. - №5. - С.3-10.
22. Бондаренко Л.В. Генетическая токсикология // Экологическая генетика. - 2007. - Т.5. - №1. - С. 39-41.
23. Брин В.Б. и соавт. Профилактика накопления и стимуляция экскреции тяжелых металлов с помощью применения цеолитоподобных глин ирлитов в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий. - 2006. - Т. XIII.-№3. - С.48.
24. Буланкина Н.И., Ганусова Г.В., Охрименко С.М., Яковенко М.Г. Влияние хлорида кобальта и триптофана на некоторые показатели метаболизма у крыс разного возраста // VI Международный симпозиум «Биологические механизмы старения» (26-29 мая 2004г., Харьков).– Харьков. - 2004. - С.74.
25. Бурлакова В.Б. Закономерности действия антиоксидантов – эффективных мембранопротекторов на нормальное и патологическое состояние клеток. Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов. Тезисы докладов всесоюзного симпозиума. Рига, 1982.
26. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 3-5.
27. Варич В.Я., Ванин А.Ф., Овсянникова Л.М. Обнаружение эндогенной окиси азота в печени мышей методом электронного парамагнитного резонанса // Биофизика. - 1987. - №32, вып 6. - С. 1062-1063.
28. Васильева Е.М., Баканов М.И., Марков Х.М. Влияние системы L-аргинин-NO на активность АТФаз и ПОЛ эритроцитов // Бюл. Экспер. биол. – 1999. – Т. 128, № 9. –С. 321-323.
29. Веденский А.Н. // Клиническая флебология. – М., 1988. - С. 216.
30. Верещагин Е.И., Тарасов Р.С., Астраков С.В., Волков С.Г. Нейропротекция кетаминот и допаминсберегающими препаратами в остром

периоде черепно-мозговой травмы и терапии апаллического синдрома // Анестезиология и Реаниматология. – 2004. – №4. – С.47-51.

31. Виглинская А.О., Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин и др. Тканевая биодоступность афобазола и его основных метаболитов у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2007.- Т. 143, № 5. - С. 528-530.

32. Виленский Б.С. Инсульт: профилактика, диагностика и лечение. - СПб.: 2009. – 210 с.

33. Вишневецкий В. Ю., Ледяева В.С. Выбор маркерных тяжелых металлов для оценки степени токсичности воздействия на организм человека // Известия Южного федераль. университета. - 2013. - № 9 (146). – С. 170-176.

34. Власов А.П., Григорьева Т.И., Лещанкина Н.Ю., Начкина Э.И., Арсентьев И.Н., Кирпичников А.А., Нынь Е.М. Коррекция патологических изменений системы гемостаза при синдроме эндогенной интоксикации // Вестник новых медицинских технологий. - 2009. - Т.ХVI. - № 4. - С. 83-84.

35. Волин М.С., Дэвидсон К.А., Камински П.М. и др. Механизмы передачи сигнала оксидант – оксид азота в сосудистой ткани // Биохимия. – 1998. – Т. 63. - №7. – С. 958-65.

36. Воронина Т.А., С.Б. Серединин и др., Перспективы поиска анскиолитиков // Экспер. и клин. фармакол. - 2002. - Т 65. - №5. С. 4-17.

37. Генинг Т.П., Ксейко Д.А. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в системе «сыворотка крови-эритроцит» при острой циркуляторной гипоксии. // Успехи современного естествознания. - 2004. - №4. - С. 17-20.

38. Галаева И.П., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А. и др., Бюл. эксперим. биол. мед., - 2005. - Т. 140. - №11. – С. 545-548.

39. Гиляревский С.З. Применение нитратов при сердечно-сосудистых заболеваниях: границы доказанного и реальная практика // Сердце. - 2004. – Т. 3. - № 3. - С. 150-155.

40. Глинка Н.Л. // Общая химия. – М., 1960. - 733с.

41. Гоженко А.И., Насибуллин Б.А., Кохно Ю.С. Активность NO-синтазы слизистой оболочки желудка при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 7. – С. 8-10.
42. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. и др. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях // Бюлл. Экспер. биол. мед. – 2000. – № 7. – С. 6-9.
43. Голубев В.Л., Левин Я.И., Вейн А.М. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. – М: МЕДпресс. - 2000. – 416 с.
44. Горрен А.К.Ф., Майер Б. // Биохимия. - 1998. – Т. 63, № 7. С. 870-880.
45. Грибакина О.Г., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Жердев В.П., Серединин С.Б. Фармакокинетическое взаимодействие Афобазола с лозартаном – препаратом-субстратом цитохрома CYP2C9 в эксперименте // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2013. – Том 76. - № 3. - С. 35-37.
46. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Коваленко А.В., Соколов М.А. Механизмы повреждения ткани мозга на фоне острой фокальной ишемии // Журнал неврологии и психиатрии. – 1999. - №2. – С.65-70.
47. Гутникова А.Р., Махмудов К.О., Саидханов Б.А., Таджикулова О.Д., Эргашев Н.А., Асраров М.И., Косникова И.В. О мембранотропном действии солей тяжелых металлов и основных путях его коррекции // Журнал Токсикологический вестник. Ташкент. -2009.- №3.- С.- 21-26.
48. Джиоев И. Г., Фидарова А.М. Некоторые особенности функции и морфологии почек крыс в условиях различных моделей экспериментальной почечной недостаточности // Вестник новых медицинских технологий. -2008. - Т.15. - С.38-39.
49. Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Гиголаева Л.В., Такоева Е.А., Дзугкоева Ф.С., Маргиева О.И. Системный окислительный стресс и биохимические маркеры повреждения внутренних органов // Фундаментальные исследования. - №7. - 2014. - С. 478-481.
50. Дзугкоева Ф.С, Дзугкоев С.Г., Такоева Е.А., Тедтоева А.И., Битарова

- Ж.Р., Можаяева И.В. Влияние солей тяжелых и цветных металлов на водо- и электролитно-выделительную функцию почек // *Фундаментальные исследования*. - 2009. - №9. - С.40-42.
51. Дзугкоева Ф.С., Гиголаева Л.В., Такоева Е.А., Можаяева И.В., Кусова А.Р. Влияние хлорида кобальта на биохимические и функциональные показатели дисфункции эндотелия в эксперименте у крыс // *Материалы XXII съезда физиологического общества им. И.П.Павлова*. – Волгоград. - 2013. - С. 149.
52. Дзугкоев С.Г., Можаяева И.В., Отиев М.А., Маргиева О.И., Дзугкоева Ф.С. Влияние L-карнитина, афобазола и их комбинации с L-аргинином на биохимические и гистологические показатели дисфункции эндотелия при кобальтовой интоксикации у крыс // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. - №2. – Т.59. – 2015. – С. 70-75.
53. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Серединин С.Б. Антимутагенные и антитератогенные свойства афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. - Том 72, № 1. - С. 46-51.
54. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В. Механизмы токсического действия неорганических соединений. М.: Медицина, 1989. - 131-134 с.
55. Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Кулакова А.В. Тезисы докладов 3-ей Межд. конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам», 15-18 мая, Суздаль (2001), с. 57.
56. Жанатаев А.К., Дурнев А.Д., Серединин С.Б. Изучение антимутагенной активности афобазола *in vivo* // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2000. – Т. 63, №2. – С. 57-59.
57. Зенина Т.А., Гавриш И.В., Мелкумян Д.С., Серединина Т.С. Изучение нейропротекторных свойств афобазола в опытах *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. - 2005. - Т.140, № 8. - С.161-163.
58. Зенина Т.А., Силкина И.В., Серединин С.Б., Мирзоян Р.С. Влияние афобазола на содержание продуктов свободно радикального окисления и активность каталазы у крыс с ишемией головного мозга // *Эксперименталь. и*

клиническая фармакология. - 2006. - Т.69, № 4. - С.47-50.

59. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.В. Окислительный стресс: биохимические и патофизиологические аспекты // М.: МАИК Наука / Интерпериодика. - 2001. – С.340.
60. Игнатова М.С., Харина Е.А., Солбирова Т.Н. и др. Нефропатии в регионе, загрязненном солями тяжелых металлов, возможности лечебно-профилактических мероприятий // Терапевтический архив. - 2004. - №1. - С. 33–37.
61. Исидоров В. А. Экологическая химия. // СПб.: Химиздат. -2001. –С.303.
62. Каверина Н.В., Попова Е.П., Яркова М.А., Серединин С.Б. Влияние афобазола на вариабельность ритма сердца у крыс, отличающихся по поведению в тесте «Открытое поле» // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. - Том 72, № 1. - С. 33-40.
63. Казимирко В.К., Мальцев В.И Антиоксидантная система и ее функционирование в организме человека. // Здоровье Украины. - 2004. - № 98. – С. 27-33.
64. Калиман П.А., Беловецкая И.В. Влияние хлорида кобальта на активность ключевых ферментов метаболизма гема в печени крыс // Биохимия. - 1986.- Т.51, вып.8. - С. 1302-1306.
65. Камышников В.С. Определение содержания (активности) церулоплазмينا // Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. - Минск. - 2003. – Т.2. - С. 71-79.
66. Коломийцева М.Г., Габович Р.Д. Микроэлементы в медицине. М.: Медицина. - 1970.- С. 151-155.
67. Колюцкая Е.В. Терапия соматизированной тревоги: опыт применения препарата Афобазол (обзор литературы) // Психические расстройства в общей медицине. – 2013. - №2. - С. 22-25.
68. Кондрашова М.Н., Лесогорова М.Н, Шноль С.Э. Метод определения неорганического фосфата по спектрам поглощения молибдатных комплексов в ультрафиолете // Биохимия. – 1965. – Т.30, вып. 3. – С. 567-562.

69. Конторщикова К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии: Учебное пособие. Н.Новгород. - 2000. - 24 с.
70. Корокин М.В., Покровский М.В., Новиков О.О., Гуреев В.В., Денисюк Т.А., Корокина Л.В., Полянская О.С., Рагулина В.А, Покровская Т.Г., Даниленко Л.М., Белоус А.С. Влияние L-аргинина, витамина В6 и фолиевой кислоты на показатели эндотелиальной дисфункции и микроциркуляции в плаценте при моделировании L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. –Т. 152. – № 7. – С. 77–79.
71. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. - 1988. - №1. - С. 16-19.
72. Кротенко Н.М., Смирнова Л.П., Логинов В.Н. и др. Влияние нейрорепитической терапии на состояние перекисного окисления липидов и систему глутатиона у больных шизофренией // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. – 2010. – С. 133–135.
73. Крукиер И.И. Продукция NO и окислительная деструкция белков в плаценте при физиологической беременности и плацентарной недостаточности // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 2003. – Т.133. №3. - С. 418-421.
74. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляционная патология. М: Медицина. 2002. – 362 с.
75. Кулес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей, ГЭО-ТАР-Медиа, Москва. 2008. – 304 с.
76. Куценко С. А. Основы токсикологии. // СП.-б.: Санкт-Петербург. -2002. – С. 456.
77. Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты pro et contr // Кардиология. - 2004. - Т.44. - №2. – С. 72-81.
78. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Осис Ю.Г. Моделирование каскада ферментативных реакций в липосомах, включающих свободнорадикальное

- окисление, восстановление и гидролиз полиеновых ацилов фосфолипидов для исследования влияния этих процессов на структурно-динамические параметры мембраны // Биохимия. - 2002. - Т.67. - №5. - С. 679.
79. Левина Э.Н. Общая токсикология металлов // Л. -1972. - С. 9-12.
80. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты // Материалы международной конференции молодых ученых и VI школы им. Н. М. Эммануэля. - Москва-Новосибирск. - 2013. – С. 32-37.
81. Макаревич О.П., Голиков П.П.. Методика определения супероксиддисмутазы // Лабораторное дело. - 1983.- № 6. - С. 24–27.
82. Малахов В.О. Початкові стадії хронічних церебральних ішемій (патогенез, клініка, лікування, профілактика). Харків. - 2004, 228 с.
83. Маленюк Е.Б., Аймашева Н.П., Манухина Е.Б. и др. Вовлечен ли оксид азота в адаптационную защиту органов от стрессорных повреждений? // Бюллетень эксперимен. биол. и мед. – 1998. – Т. 126. - № 9. – С. 274-277.
84. Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Стресс, адаптация и оксид азота // Биохимия. – 1998. – Т.63. -№7. – С.992-1006.
85. Марков Х.М. L-аргинин – оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов // Кардиология. – 2005. - Т.6. – С. 87-95.
86. Медведев В.Э. Терапия пограничных психических расстройств в кардиологическом стационаре (Опыт применения Афобазола) // Российский национальный конгресс кардиологов и конгресс кардиологов стран СНГ. Материалы симпозиума «Проблемы современной психокardiологии». М., 2007. - С.13-19.
87. Медведев В.Э., Добровольский А.В., Троснова А.П. Опыт применения афобазола у кардиологических больных с невротическими, соматизированными и связанными со стрессом расстройствами // Психические расстройства в общей медицине. – 2006. -№2. - С. 36-39.
88. Медведев В.Э.. Терапия тревожных расстройств у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (опыт применения афобозола) // Архив внутренней медицины. 2013. -№ 3(11). - С. 70-76.

89. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты // Слово, М. - 2006. – 556 с.
90. Метельская, В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — № 6. — С. 15 – 18.
91. Мирзоян Р.С., Хайлов Н.А., Ганьшин Т.С. Цереброваскулярные эффекты афобазола при сочетанной сосудистой патологии мозга и сердца // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. - Том 73. - № 5. - С. 2-7.
92. Михайлова Н. М., Сиряченко Т.М. Тревожные расстройства в позднем возрасте // РМЖ. - 2006. - № 14(29). - С. 2080-2084.
93. Моргулис И.И., Хлебопрос Р.Г. Биологическая роль кобальта. // Красноярский научный центр СО РАН СибФУ. - Красноярск. - 2005.
94. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Маметова Л.Э. Новый селективный анксиолитик Афобазол // Журн. неврол. и психиат. им. С.С.Корсакова. – 2005. - № 105 (4). – С.48-54.
95. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В. и др., Результаты клинического изучения селективного анксиолитика афобазола. Экспер. и клин. фармакол. - 2001. - №2. – С. 15-19.
96. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Серединин С.Б., Результаты клинического изучения селективного анксиолитика афобазола. Экспер. и клин. фармакол. – 2001. - № 64(2). – С.15-19.
97. Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С., Золотов Н.Н., Колясникова К.Н., Метлина М.В. Терапевтическое влияние анксиолитиков Феназепам и Афобазола на содержание малонового диальдегида в плазме крови и психическое состояние больных с тревожными расстройствами // Психические расстройства в общей медицине. – 2014. - №2. – С. 40-47.
98. Немченко О.И. Новые возможности терапии вегетативных проявлений тревоги у гинекологических больных // Гинекология. – 2007. - №3. - С. 45-49.

99. Ноздрюхина Л.Р. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. М.: Наука, 1977. - С. 184.
100. Озорнина Н.В., Озорнин А.С., Говорин Н.В. Терешков П.П. Изменения показателей липопероксидации и антирадикальной защиты у больных с первым психотическим эпизодом шизофрении при терапии типичными и атипичными нейролептиками // Забайкальский мед. вестн. – 2011. - №1. – С. 10–16.
101. Орджоникидзе Э.К., Рощин А.В. Кобальт токсичность, биологический контроль // Гигиена труда и проф. заболевания.- 1991. - №12. - С. 1-4.
102. Охрименко С.М., Гурьева Н.Ю., Калиман П.А. Адаптация ферментов липидного и азотистого обмена у крыс при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта и ртути // Вестник Харьковского национального университета. им. В.Н. Каразина. - 2005. - Вып.1-2. - №709.
103. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике // Под редакцией А.А. Покровского. – 1969. Медицина. - М. - С. 61.
104. Полковникова Ю.А., Степанова Э.Ф., Куль И.Я. Биофармацевтические исследования спансул афобазола *in vitro* // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. - 2010. - № 10(81). Вып. 10. - С. 89-92.
105. Прилипко Л.Л., Ерин А.Н., Беляев Б.С. и др. Активация перекисного окисления липидов в организме больных шизофренией и маниакально-депрессивным психозом // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова. – 1987. - №87 (1). – С. 100–103.
106. Раевский К.С. Оксид азота новый физиологический мессенджер: возможная роль при патологии центральной нервной системы // БЭБИМ. – 1997. - Т. 123. - № 5. – С. 484-490.
107. Рейхерт Л.И., Быченко С.М., Кичерова О.А., Подлuzская И.Д., Тенина О.А., Соколова А.А. Роль окислительного стресса в механизмах формирования демиелинизирующего процесса при рассеянном склерозе // Журнал «Неврологический вестник им. Бехтерева». – 2006. - Т. XXXVIII, вып. 3-4. - С. 40-45.

108. Реутова М.А., Сюняков С.А., Сюняков Т.С., Незнамов Г.Г. Анксиолитик афобазол – субъективная оценка действия препарата больными с тревожно-астеническими расстройствами // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. - Том 73. - № 9. - С. 6-12.
109. Рослая Н.А. Особенности клиники и течения профессиональных токсико-пылевых бронхитов у рабочих, подвергающихся воздействию вольфрама и кобальта // Вестник РАМН. - 2004. - №3. - С. 42-45.
110. Рудакова А.В. Нужны ли статины в стационарах? Фармакоэкономический аспект проблемы // Атмосфера. Кардиология. - 2004. № 1. – С. 40-43.
111. Рудакова Р.И., Бусыгина И.Н. Вопросы инфекционной патологии // Омск. - 1970. - С. 325-326.
112. Рясина Е.В., М.В. Воронин, С.Б. Серединин. Взаимодействие производных 2-меркаптобензимидазола с σ^1 рецепторами // Химико-фармацевтический журнал. - Том 46. - № 6. – 2012. - С. 12-13.
113. Салей А.П., Рецкий М.И. Роль оксида азота в формировании мотивационного поведения и обучения // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация. – 2003. – №1. – С. 75-80.
114. Саульская Н.Б., Горбачевская А.И. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - Санкт/Петербург. – 2010. – С. 419-424.
115. Свищенко Е.П., Гулкевич О.В. Опыт применения препарата Афобазол® у пациентов с гипертонической болезнью и тревожными расстройствами (расширенный реферат) // Психические расстройства в общей медицине. - 2014. - №1. – С. 56-60.
116. Серединин С.Б., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Кравцов О.Ю., Жердев В.П. Фармакокинетика афобазола у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. - Том 70. - № 2. - С. 59-64.
117. Серединин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия Афобазола // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2009. - № 1. - С. 3-11.

118. Серединин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г. и др. Фармакогенетическая концепция анксиоселективного эффекта // Вестн. РАМН. -1998. - №11. – С. 3-9.
119. Серединин С.Б., Дурнев А.Д. Фармакологическая защита генома / С. Б. Серединин, А. Д. Дурнев. - М. : ВИНТИ, 1992. - 159,[1] с. : ил.; 22 см.; ISBN 5-201-13371-1.
120. Силкина И.В., Александрин В.В., Ганьшина Т.С., Серединин С. Б., Мирзоян Р.С. Усиление кровоснабжения ишемизированного мозга под влиянием афобазола // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2004. - Том 67. - № 5. - С. 9-12.
121. Силкина И.В., Зенина Т.А., Серединин С.Б., Мирзоян Р.С. Влияние афобазола на содержание продуктов свободнорадикального окисления и активность каталазы в условиях ишемии головного мозга // Эксперимен. и клиническая фармакология. – 2006. - Том 69. - № 4. - С. 47-50.
122. Смердова Л.Н, Шандренко С.Г., Дмитренко М.П. Метод визначення участі оксиду азоту в механізмі дії хімічних речовин // Совр. пробл. Токсикологии. – 2002. – № 4. – С. 32-34.
123. Смирин Б.В., Покидышев Д.А., Малышев И.Ю. и др. Депонирование оксида азота как фактор адаптационной защиты // Рос. физиол. Журн. Им. И.М. Сеченова. – 2000. –Т. 86, № 4. – С. 447-454.
124. Смулевич А.Б., Андрющенко А.В., Романов Д.В., Сиранчиева О.А.. Терапия пограничных психических расстройств (исследование эффективности и переносимости афобазола) // Психические расстройства в общей медицине. – 2006. - №1. - С. 10-16.
125. Смулевич А.Б., Сыркин А.Л., Дробижев М.Ю. и др. Психокardiология. М., С.В. М.: МИА, 2005. 779 с.
126. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соровский образовательный журнал. – 2000. – Т.6. – С. 27-34.

127. Стокле Ж.-К., Мюлле Б., Андрианцитохайна Р., Клещев А. Гиперпродукция оксида азота в патофизиологии кровеносных сосудов // Биохимия. – 1998. - №63 (7). – С. 976-83.
128. Суворов И.М., Успенская Н.В., Родина Г.Ю. и др. Кобальтовые миокардиопатии в клинике профессиональных заболеваний // Клиническая медицина. - 1978. - Т.LVI. - №10. - С. 58-63.
129. Суворов И.М., Добрынина В.В., Климец И.С., Чекунова М.П. Распределение кобальта в организме и действие его на обменные процессы // Врачебное дело. - 1982. - №2. - С. 107-110.
130. Судаков Н.П., Никифоров С.Б., Константинов Ю.М. и др. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – №5. – С. 332-336.
131. Тарасенко Н.В., Конратьева Е.И., Пузырев В.П., Молекулярно–генетические маркеры системы метаболизма оксида азота у больных сахарным диабетом I типа // Молекулярная медицина. - 2011. - №6. - С. 33.
132. Татарский Б.А., Бисерова И.Н. Использование Афобазола при лечении пароксизмальной формы фибрилляции предсердий // РМЖ. - 2007. - № 9. - С. 760-766.
133. Тенина О.А., Рейхерт Л.И., Быченко С.М., Кичерова О.А., Маркина О.Л. Роль оксида азота в особенностях клинических проявлений рассеянного склероза // IV терапевтический форум «Актуальные вопросы диагностики, лечения и профилактики наиболее распространенных заболеваний внутренних органов»: Материалы форума. – Тюмень. - 2005. – С. 75.
134. Тиганова А.С. Руководство по психиатрии / под ред. А.С. Тиганова. Т. 2. М.: Медицина, 1999. С. 57–117; 129-146.
135. Титов В.Н. Фундаментальная медицина. Единение физической химии, методических подходов, общей биологии и медицины в выяснении этиологии и патогенеза заболеваний человека // Клинич. лаб. диагн. - 2005. - №1. - С. 3-8.

136. Фролова А.Д., Чекунова М.П. Гигиена и профессиональные заболевания. Рига. - 1974. - Вып. 1. – С. 68-73.
137. Цорин И.Б., Палка И.П., Чичканова Г.Г. Особенности действия селективного анксиолитика Афобазола на сердечно-сосудистую систему // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2009. - № 1. - С. 41-45.
138. Чумаков Д.В. Клинико-фармакологическая характеристика нового анксиолитика афобазола. Автореф. ... канд. мед. наук., 2004.
139. Яхно Н.Н., Штульмана Д.Р. Болезни нервной системы (4-е издание) / под ред. Н.Н. Яхно, Д.Р. Штульмана. М.: Медицина, 2005.
140. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol.* – 2008. - №636. - P.154–71.
141. Ajmo C.T. Jr., Vernon D.O., Collier L. et al. // *Curr. Neurovasc. Res.* -2006. - №3(2) –P. 89-98.
142. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hogen T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1993. - Vol. 90. - P. 7915-7921.
143. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides // *Lipids.* - 1980. - Vol.15. - P. 137-140.
144. Atmaca M, Kuloglu M, Tezcan E, Ustundag B. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with social phobia. *Psychiatry Res.* – 2008. - №159. - P. 95–100.
145. Atmaca M, Tezcan E, Kuloglu M et al. Antioxidant enzyme and malondialdehyde values in social phobia before and after citalopram treatment. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* – 2004. - № 254. – P.231–235.
146. Ayala-Fierro F., Firriolo J.M., Carter D.E. Disposition, toxicity, and intestinal absorption of cobaltous chloride in male Fischer 344 rats // *Toxicol. Environ. Health.* - 1999. - №56 (8). - P.571-591.
147. Aydar E., Palmer C. P., Klyachko V. A., Jackson M. B. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit // *Neuron.* - 2002. - №34. – P. 399 - 410.

148. Banister S.D. and M. Kassiou, *Cur. Pharm. Des.*, - 2012. - №18(7). – P. 884-901.
149. Behl A, Swami G, Sircar SS et al. Relationship of possible stress-related biochemical markers to oxidative/antioxidative status in obsessive-compulsive disorder // *Neuropsychobiology*. – 2010. №61. – P. 210–214.
150. Berkowitz L. Affect, aggression, and antisocial behavior. In R. Davidson, K. Scherer, & H. Goldsmith (Eds.) // *Handbook of Affective Sciences*. – 2003. - P. 804-823.
151. Bilici M, Efe H, Koroğlu MA et al. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: Alterations by antidepressant treatments // *J Affect Disord*. – 2001. - № 64. P.43–51.
152. Billar N.R. // *Ann. Surg.* – 1995. – Vol. 221, N 4. – P. 339-349.
153. Bishop J.B., K.L. Witt, and R.A. Sloane, *Mutat. Res.* – 1997. - №396 (1-2). P. 9-43.
154. Bitanhirwe BKY, Woo TUW. Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev.* – 2011. -№35. P. 878–93.
155. Boger R.H., Bode-Boger S.M., Thiele W. et al. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. // *Circulation*. – 1997. -№ 95. – P. 2068-2074.
156. Boh M., Opolski G., Poredos P. et al. Equivalent effect of the generic and the reference atorvastatin on the modifiable factors composing the calculated absolute coronary risk. 75th Congress of European Atherosclerosis Society 23–24 April, 2005, Prague.
157. Bonner G., Preis S., Schunck U. et al. Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans. *J Cardiovasc Pharmacol.* – 1990. -№15 (suppl 6). –P. 46-56.
158. Boskovic M, Vovk T, Kores Plesnicar B, Grabnar I. Oxidative Stress in Schizophrenia. // *Curr Neuropharmacol.* – 2011. № 9. P. 301–12.
159. Bouayed J, Rammal H, Soulimani R. Oxidative stress and anxiety: relationship and cellular pathways. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2009. - № 2 (2). –P. 63–7.

160. Broadhurst P.L., *Behav. Genet.* – 1975. - № 5. – P. 299-319.
161. Brune D., Klaerheim A., Paulsen G., Beltesbrekke H. Pulmonary deposition following inhalation of chromium-grinding dust in rats and distribution in other tissues//*Scand. J. Dent. Res.* 1980. - Dec., Vol. 88(6). - P.543-51.
162. Bulut M, Selek S, Bez Y et al. Reduced PON1 enzymatic activity and increased lipid hydroperoxide levels that point out oxidative stress in generalized anxiety disorder. // *J Affect Disord.* – 2013. №150. –P. 829–33.
163. Calvert J.W., Lefter D.J. *Cardiovasc. Res.* – 2009. – №83(2). – pp.195-203.
164. Chakraborty S, Singh OP, Dasgupta A et al. Correlation between lipid peroxidation-induced TBARS level and disease severity in obsessive-compulsive disorder. // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* – 2009. - №33. –P. 363–366.
165. Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, Chiu YW, Chen HC. - 2005.
166. Chin J.H., Azhar S., Hoffman B.B. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized Lipoproteins. // *J.Clin. Invest* - 1982. – 89. - Vol. 10-18.
167. Courville K.A., Lavie C.J., Milani R.V. Lipid-lowering therapy for elderly patients at risk for coronary events and stroke. // *Am Heart Hosp J.* - 2005 Fall. -№ 3(4). - P.256-262.
168. Cuevas J., A.Behensky, W.Deng et al. // *J.Pharmacol. Exp. Ther.* – 2011. – № 339(1). –P. 152-60.
169. Czock.D., Hausler U., Aymanns C., et all. Nephrotoxisce Arzneimittel // *Dtsch. Med. Wochenschr.*- 2005. - 180. - P. 2579-2584.
170. Delattre J, Beaudeau J-L, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques. *Radicaux Libr.* // *Stress oxydant. Asp Biol Pathol.* – 2007. – P. 584.
171. Eaton P., Jones M.E, McGregor M. et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – 14, N 3. – P. S290-S296.
172. Edel J., Pozzi G., Sabbioni E., Pietra R., Devos S. Metabolic and toxicological studies on cobalt // *Sci. Total Environ.* 1994. - Vol. 150(1-3). -P.233-44.

173. Faist E. Consequences of Trauma. // Shock and Sepsis. Munich. - 2000. Ed: E.Faist. – P.243-248.
174. Foster W., P. Myllynen, L.M. Winn, et al., Placenta, 29, Suppl A, - 2008. - P. 105-107.
175. Frohlich E.D. Overview of hemodynamic factors associated with left ventricular hypertrophy. J. Mol. Cell. Cardiol. – 1989. - №21. – P. 3-10.
176. Fuller J.L. and W.R. Thompson, Behavior genetics, New York, Wiley. – 1960. – P. 230-269.
177. Gerhard M., Walsh W., Tawakol A. et al. Estradiol Therapy Combined With Progesterone and Endothelium-Dependent Vasodilation in Postmenopausal Women. // Circulation. – 1998. - №98. – P.1158-1163.
178. Gingrich JA. Oxidative stress is the new stress. // Nat Med. – 2005. - №11. – P. 1281–2.
179. Gul IG, Karlidag R, Cumurcu BE et al. The Effect of Agoraphobia on Oxidative Stress in Panic Disorder. // Psychiatry Investig. – 2013. - №10. – P.317–25.
180. Gutteridge J.M., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future//Ann. Acad Sci. -2000. -Vol.899. -№4. -P. 136-147.
181. Hall C.S..The Genetics of behavior, Steven SS. (ed.), Handbook of experimental psychology, New York, Wiley. – 195. – P. 304-329.
182. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? // J Neurochem. – 2006. № 97. –P. 1634–58.
183. Hanner M., Moebius F.F., Flandorfer A. et al. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma-1-binding site // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – V. 93. – P. 8072-8077.
184. Hayashi T. and Su T., Cur. Neuropharmacol. – 2005. - № 3(4). – P. 267-280.
185. Hovatta I, Juhila J, Donner J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. // Neurosci Res. - 2010. - № 68 (4). P. 261–75.

186. Insull W., Black D., Dujovne C. et al. Efficacy and safety of once-daily vs twice-daily dosing with fluvastatin, a synthetic reductase inhibitor, in primary hypercholesterolemia. // Arch. Intern. Med. – 1994. -№154. – P. 2449-2455.
187. Jay M.T., Chirico S., Siow R.C. et al. Modulation of vascular tone by low-density lipoproteins: effect on L-arginine transport and nitric oxide synthesis. // Exp Physiol. – 1997. №82. – P. 349-360.
188. Jorhem L., Sundstrom B., Astrand C., Haegglund G. The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt, and aluminium in the meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle//Lebensm. Unters. Forch. -1989.- №188(1). - P.39-44.
189. Kagiya S., Tsuchihashi T., Abe I., Fujishima M. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats// Brain Res. – 1997. – 757. – P.155-158.
190. Kaya MC, Bez Y, Karababa IF et al. Decreased Serum Sulphydryl Levels as a Sign of Increased Oxidative Stress in Generalized Anxiety Disorder. // Psychiatry Investig. – 2013. - №10. – P. 281–5.
191. Khanna RS, Negi R, Pande D et al. Markers of Oxidative Stress in Generalized Anxiety Psychiatric Disorder: Therapeutic Implications. // J Stress Physiol Biochem. – 2012. - №8 (2). – P. 32–38.
192. Ko J.W., N. Sukova, D. Thacker, et al., Drug Metab.Dispos. – 1997. –№ 25. – P. 853-862.
193. Kolotilinskaya NV, Badyshtov BA, Makhnycheva AL et al. Phase-I investigation of selective anxiolytic afobazole. // European Neuropsychopharmacology. – 2005. P.161.
194. Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E et al. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. // Neuropsychobiology. – 2002. - №46. – P. 186–9.
195. Lankin V. Free radicals, nitric oxide, and inflammation: molecular, biochemical, and clinical aspects //Amsterdam. - 2003. - Vol. 344. - P. 8-23.

196. Leonard B, Maes M. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2012. №36. – P.764–85.
197. Lerman A., Burnett J.C., Higano S.T. et al. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. // *Circulation.* - 1998. - №97. – P. 2123-2128.
198. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* - 1951. - Vol. 193. No1. - P. 265-275.
199. Malard V., Berenguer F., Pratt O. et al. Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt // *BMS Genomics.* -2007. - Vol.8. - P. 147-164.
200. Merritt K.; Crowe T.D.; Brown S.A. Elimination of nickel, cobalt and chromium following repeated injections of high dose metal salts // *Biomed. Mater. Res.* -1989. Vol. 23(8). - P.845-62.
201. Morin-Surun M.P., Collin T., Denavit-Saubie M et al., Intracellular signal receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1999. - №96. - 8196 - 8199.
202. Nation J.R., Bourgeois A.E., Clare D.E., Hare M.F. The effects of chronic cobalt exposure on behavior and metallothionein levels in the adult rat // *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1983. - Vol. 5(1). - P.9-15.
203. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. // *Int J Neuropsychopharmacol.* – 2008. - №11. – P. 851–76.
204. O'Banion M.K., Miller J.C., Chang J.W., Kaplan M.D. & Coleman P. D. J. *Neurochem.* – 1996. - №66. – P. 2532-2540.
205. Ochoa J.B., Udekwu A.O., Billiar T.R. et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. // *Ann. Surg.* - 1991- №214(5). – P. 621-626.
206. Oemar B.S., Tschudi M.R., Godoy N. et al. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. // *Circulation.* – 1998. - №97(25). – P. 2494-2498.

207. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi Kunio, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. // *Anal Biochem.* – 1979. - №95. – P. 351-8.
208. Ornoy A., *Reprod Toxicol.* - 2007. - №24 (1). – P. 31-41.
209. Pitt B., Pepine C., o'Neill B., Haber H., Pressler M., Mancini GBJ. Modulation of ACE inhibitor efficacy on coronary endothelial dysfunction by low density lipoprotein cholesterol. // *J Am Coll Cardiol.* – 1997. - №29 (2, suppl A):70A. Abstract. – P. 714-715.
210. Plane F., Bruckdorber KR., Kerr P. et al. Inhibition of NO-reliase by lowdensity lipoproteins in vascular endothelium. // *Br.J. Pharmacol.* - 1992. - 105 - P 216-222.
211. Rector T.S., Bane A.J., Mullen K.A. et al. Randomized, double-blind placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. // *Circulation* – 1996. - №93. – P. 2135-2141.
212. Roshchin A.V.; Kazimov M.A.; Ordzhonikidze E.K. Toxicokinetics of cobalt and the problems of biological monitoring. // *Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* - 1989. -Vol. 33(4). - P.369-77.
213. Sapirstein A., Bonventre J.V. *Neurochem Res* 2000 . - № 25(5). – P. 745-53.
214. Shapira Y.J. *Neurosurg. Anesthesiol.* –1992. - №4.-P.231-240.
215. Somers J. R., Beck P. L., Lees-Miller J. P., Roach D., Li Y., Guo J., Loken S., Zhan S., Semeniuk L., Duf H.J. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. - №295(3). – P.1122-1131.
216. Southern L.L., Baker D.H. *Eimeria acervulina* infection in chicks fed cobalt in the presence or absence of excess dietary methionine//. *Nutr.* - 1982. - Vol. 112(6). - P.1220-3.
217. Stocchi F, Nordera G, Jokinen R et al. Efficacy and tolerability of paroxetine for the longterm treatment of general ized anxiety disorder. // *J Clin Psychiat.* – 2003. - №64. – P. 250–8.
218. Sutherland M.K., Somerville M.J., Yoong L.K., Bergeron C., Haussler M.R. and McLachlan D.R. *Brain Res. Mol. Brain Res.* - 1992. - №13. – P. 239-250.

219. Syunyakov SA, Chumakov DV, Mametova LE. New selective anxiolytic afobazole: profile and efficiency for treatment of different structures of anxiety disorders. // *European Neuropsychopharmacology*. Moscow. -2005. – P.167.
220. Szakmary E., Ungvary G., Hudak A., Tatrai E., Naray M., Morvai V. Effects of cobalt sulfate on prenatal development of mice, rats, and rabbits, and on early postnatal development of rats//*J. Toxicol. Environ. Health A (England)*. -2001. - 62(5) - P. 367-86.
221. Takizawa T., Tada T., Kitazawa K., Tanaka Y., Hongo K., Kameko M., Uemura K.I. *Neurol Res.* – 2001. -№ 23(7). – P. 724-730.
222. Tchedre K.T., Huang R.Q., Dibas A. et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2008. - №49(11). – pp. 4993-5002.
223. Tchedre, K.T., Huang, R.Q., Dibas, A., Krishnamoorthy, R.R., Dillon, G.H., Yorio, T. Sigma-1 receptor regulation of voltage gated calcium channels involves a direct interaction. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2008. - № 49. – P. 4993-5002.
224. Testa B., S.D.Kramer, *The Biochemistry of drug metabolism: Principles, Redox Reactions, Hydrolyses*, WILEY-VCH, Wein-Heim (2008).
225. Tsai S.Y., Hayashi T., Mori T., et al., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* – 2009. - № 9(3). – P. 184-189.
226. Vagnerova K., Hurn P.D., Bhardwaj A., Kirsch J.R. *Anesth. Analg.*, - 2006. - №103(2). – P. 430-434.
227. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. - №39. – P. 44–84.
228. Wagner AH, Kohler T, Ru.ckschloss U et al. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* - 2000. - Vol. 20. - P.61-69.
229. Yager S, Forlenza MJ, Miller GE. Depression and oxidative damage to lipids. // *Psychoneuroendocrinology.* – 2010. - №35. – P. 1356–62.

230. Yarkova MA. Anxiolytic properties of afobazol in comparizin with diazepam. – 2005. – P. 145.
231. Yusuf S., Collins R., MacMahon S., Peto R. Effect of intravenous nitrates on mortality in acute myocardial infarction: an overview of randomised trials // *Lancet* 1988. - №1. – P. 1088-1092.
232. Zenina T.A., I.V. Gawrish, D.S. Melkumyan, and T.S. Seredinina, Abstracts8th European College of Neurupsychopharmacol. – 2005. P. 246.
233. Zhang H, Cuevas J. Sigma receptors inhibit high-voltage activated calcium channels in ratsympathetic and parasympathetic neurons. // *J. Neurophysiol.* – 2002. - №87 (6). – P. 2867–2879.
234. Zhang Y., Marrilat O., Giulivi C. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. // *J. Biolog. Chemistry.* - 1990. - Vol. 265(27). - P.16330-36.
235. Zinbarg RG, Barlow DN, Leibovitz M et al. The DSM-3 field criteria for mixed anxiety-depression. // *Am J Psychiat.* – 1994. - № 151. – P. 1153–62.
236. Zulli A., Widdop B., Hare D.L. et al. High methionine and cholesterol diet abolishes endothelial relaxation. *Arterioscler. // Thromb. vasc. Biol.* - 2003. – P. 1358-63.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Влияние афобазола и его комбинации с L-аргинином

Каталаза, мкат/л						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	224,7	220,72	359,3	347,3	253,05	232,5
m	5,16	1,89	4,24	3,08	2,28	2,27
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,05		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
МДА, нмоль/мл						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	4,414	4,12	5,65	5,01	4,52	4,212
m	0,0541	0,10677	0,045	0,040	0,03	0,025
P1 N относ. N+аргинин		0,02				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,001		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
СОД, ед.акт.						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	87,18	88,98	62,76	66,013	79,15	87,130

m	0,98	1,27	0,99	1,50	1,3	1,12
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				-		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,001
NO, мкмоль						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
M	50,9	52,95	39,036	42,54	46,04	49,150
m	0,9695	0,74	0,438	0,232	0,5	0,68
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,001		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,01
ЦП, мг/л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
M	343,8	334,3	377,19	357,51	347,05	341,3
m	7,8447	4,39	4,24	4,58	4,02	3,703
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,01			
P3 Co+арг. относ. Co				0,01		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,01

P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						-
ГГТН, нмоль/с*л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
M	545,68	537,2	1100	989,1	600,1	568,0
m	26,52	21,67	25,68	22,59	15,01	12,95
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,01		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						-
Холестерин, ммоль/л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
M	1,79	1,81	3,67	3,37	2,41	2,012
m	0,042	0,028	0,043	0,048	0,034	0,037
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,001		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,001
ТАГ, ммоль/л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
M	0,254	0,248	0,473	0,414	0,301	0,269
m	0,041	0,0218	0,021	0,019	0,02	0,026

P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,05		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						-
АсАТ, мкмоль/с*л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
М	1,16	1,03	1,650	1,52	1,29	1,095
m	0,026	0,012	0,024	0,062	0,058	0,047
P1 N относ. N+аргинин		0,001				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				-		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,01
АлАТ, мкмоль/с*л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
М	1,162	1,110	1,51	1,41	1,28	1,150
m	0,021	0,067	0,022	0,019	0,03	0,006
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,01		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	

P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,001
ЩФ, нмоль/с*л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
М	351	346,4	845,5	595,0	395	350
м	9,7	7,08	10,52	10,852	7,03	6,375
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,001		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,001
ХС ВП, ммоль/л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
М	0,683	0,667	0,52	0,529	0,604	0,674
м	0,021	0,029	0,022	0,017	0,021	0,020
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				-		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,01
ХС НП, ммоль/л						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
М	1,120	1,081	3,09	2,92	1,99	1,501
м	0,029	0,029	0,012	0,031	0,05	0,071
P1 N относ. N+аргинин		-				

P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,001		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
Na,K,ATФ-аза сердце, мкмоль Рн/мг белка/час						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	1,388	1,4	0,96	1,09	1,25	1,367
м	0,0383	0,024698	0,015	0,016	0,012	0,011
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,001		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
МДА сердце, нмоль/мг белка						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	2,51	2,341	3,64	2,826	2,71	2,514
м	0,0507	0,06483	0,015	0,01568	0,013	0,0120
P1 N относ. N+аргинин		0,05				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со						0,001
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со				0,001		
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.				0,001		
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001

Na,K,ATФ-аза печень, мкмоль Pн/мг белка/час						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	1,17	1,37	0,84	0,876	0,97	1,066
m	0,051	0,014	0,015	0,009	0,011	0,014
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,05		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
МДА печень, нмоль/мг белка						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	1,84	1,752	2,713	2,41	2,01	1,790
m	0,0412	0,058	0,019	0,015	0,028	0,039
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,001		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
Na,K,ATФ-аза почки корковый слой, мкмоль Pн/мг белка/час						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	2,29	2,47	1,405	1,5	1,91	2,3
m	0,013	0,0171	0,014	0,012	0,038	0,060

P1 N относ. N+аргинин		0,001				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,001		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
Na,K,ATФ-аза почки мозговой слой, мкмоль Pн/мг белка/час						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	6,47	6,52	3,9	4,97	5,32	6,4
m	0,185	0,213	0,277	0,082	0,011	0,121
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,01		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+арг.+афоб. относ. Со+афоб.						0,001
МДА почки корковый слой, нмоль/мг белка						
	норма	норма+аргинин	Со	Со+арг.	Со+афоб.	Со+арг+афоб.
М	2,162	1,96	2,87	2,57	1,75	1,46
m	0,042	0,016	0,027	0,041	0,037	0,028
P1 N относ. N+аргинин		0,001				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+арг. относ. Со				0,001		
P4 Со+арг.+афоб. относ. Со						0,001
P5 Со+арг.+афоб. относ. Со+арг.						0,001

P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,001
МДА почки мозговой слой, нмоль/мг белка						
	норма	норма+аргинин	Co	Co+арг.	Co+афоб.	Co+арг+афоб.
М	2,698	2,61	5,410	4,71	3,12	2,820
m	0,056	0,0665	0,019	0,10648	0,066	0,059
P1 N относ. N+аргинин		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+арг. относ. Co				0,001		
P4 Co+арг.+афоб. относ. Co						0,001
P5 Co+арг.+афоб. относ. Co+арг.						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+арг.+афоб. относ. Co+афоб.						0,01

Влияние афобазола и его комбинации с L-NAME

Каталаза, мкат/л						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	224,70	274,52	359,3	369,14	253,05	264,61
m	5,16	3,74	4,24	5,9	2,28	6,11
P1 N относ. N+L-name		0,001				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+L-name относ. Со				-		
P4 Со+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Со+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						-
МДА, нмоль/мл						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	4,414	4,72	5,65	6,01	4,52	4,65
m	0,054	0,04	0,045	0,042	0,03	0,052
P1 N относ. N+L-name		0,001				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+L-name относ. Со				-		0,02
P4 Со+L-name +афоб относ. Со						
P5 Со+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,05
СОД, ед. акт.						

	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	87,18	80,82	62,76	59,46	79,15	74,32
m	0,98	1,59	0,99	0,54	1,3	0,77
P1 N относ. N+L-name		0,01				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+L-name относ. Со				0,01		
P4 Со+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Со+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,01
NO, мкмоль						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	50,9	48,13	39,036	37,46	46,04	47,31
m	0,9695	0,5769	0,438	0,29	0,5	0,516
P1 N относ. N+L-name		0,02				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+L-name относ. Со				0,01		
P4 Со+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Со+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						-
ЦП, мг/л						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	343,8	358,12	377,19	380,3	347,05	354,05
m	7,8447	1,25	4,24	3,16	4,02	2,04

P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,01			
P3 Co+L-name относ. Co				-		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-
ГГТП, нмоль/с*л						
	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	545,68	549,52	1100	1300	600,1	834,1
m	26,52	10,04	25,68	15,25	15,01	8,34
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,001		0,001
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						0,001
Холестерин, ммоль/л						
	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	1,79	2,12	3,67	3,97	2,41	2,99
m	0,042	0,020	0,043	0,023	0,034	0,032
P1 N относ. N+L-name		0,001				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,001		

P4 Co+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,001
ТАГ, ммоль/л						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	0,254	0,259	0,473	0,491	0,301	0,351
m	0,041	0,014	0,021	0,029	0,02	0,019
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Со				-		0,001
P4 Co+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Со+L-name						
P6 Co+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						-
АсАТ, нмоль/с*л						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	1,16	1,19	1,650	1,75	1,29	1,35
m	0,026	0,021	0,024	0,035	0,058	0,021
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Со				0,02		
P4 Co+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001

P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-
АЛАТ, нмоль/с*л						
	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	1,162	1,181	1,51	1,65	1,28	1,38
м	0,021	0,022	0,022	0,041	0,03	0,019
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,01		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-
ЩФ, нмоль/с*л						
	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	351	361	845,5	855,2	395	409,1
м	9,70	5,5	10,52	11,71	7,03	5,34
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				-		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-

ХС ВП, ммоль/л						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	0,683	0,700	0,520	0,506	0,604	0,570
m	0,021	0,029	0,022	0,021	0,021	0,021
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+L-name относ. Со				-		
P4 Со+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Со+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,05
ХС НП, ммоль/л						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	1,120	1,141	3,09	3,19	1,99	2,32
m	0,029	0,019	0,012	0,015	0,05	0,015
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Со+L-name относ. Со				0,001		
P4 Со+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Со+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,001
Na,K,АТФ-аза сердца,						
мкмоль Рн/мг белка/час	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	1,388	1,33	0,96	0,900	1,25	1,10

m	0,0382	0,0178	0,015	0,019	0,012	0,013
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,02		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-
МДА сердце, нмоль/мг белка						
	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	2,51	2,632	3,64	3,74	2,71	2,84
m	0,050	0,021	0,015	0,018	0,013	0,019
P1 N относ. N+L-name		0,05				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,001		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						0,001
Na,K,АТФ-аза печень						
мкмоль Pн/мг белка/час	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	1,17	1,286	0,84	0,790	0,97	0,81
m	0,051	0,0128	0,015	0,014	0,011	0,019
P1 N относ. N+L-name		0,05				
P2 Co относ. N			0,001			

P3 Co+L-name относ. Со				0,02		
P4 Co+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,001
МДА печень, нмоль/мг белка						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	1,84	2,01	2,713	2,814	2,01	2,22
m	0,0412	0,015	0,019	0,041	0,028	0,021
P1 N относ. N+L-name		0,01				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Со				0,05		
P4 Co+L-name +афоб относ. Со						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Со+L-name						0,001
P6 Со+афоб. относ. Со					0,001	
P7 Со+ L-name +афоб. относ. Со+афоб.						0,001
Na,K,ATФ-аза почки корковый слой, мкмоль Pн/мг белка/час						
	норма	норма+L-name	Со	Со+L-name	Со+афоб.	Со+L-name+афоб.
М	2,29	2,27	1,405	1,370	1,91	1,67
m	0,0130	0,01816	0,014	0,024	0,038	0,023
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Со относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Со				-		
P4 Co+L-name +афоб относ. Со						0,001

P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						0,001
Na,K,ATФ-аза почки мозговой слой, мкмоль Pн/мг белка/час						
	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
M	6,47	6,6	3,9	3,06	5,32	5,15
m	0,185	0,209	0,2774	0,14096	0,011	0,1122
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,01		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-
МДА почки корковый слой						
нмоль/мг белка	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
M	2,162	2,24	2,87	2,97	1,75	2,19
m	0,042	0,0178	0,0277	0,019	0,037	0,013
P1 N относ. N+L-name		-				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,01		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	

P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						0,001
МДА почки мозговой слой						
нмоль/мг белка	норма	норма+L-name	Co	Co+L-name	Co+афоб.	Co+L-name+афоб.
М	2,698	2,9	5,410	5,505	3,12	3,33
m	0,056	0,0202	0,019	0,016	0,066	0,015
P1 N относ. N+L-name		0,01				
P2 Co относ. N			0,001			
P3 Co+L-name относ. Co				0,001		
P4 Co+L-name +афоб относ. Co						0,001
P5 Co+L-name +афоб относ. Co+L-name						0,001
P6 Co+афоб. относ. Co					0,001	
P7 Co+ L-name +афоб. относ. Co+афоб.						-