

На правах рукописи

ВИНОГРАДОВА Елена Викторовна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАТИНОВОЙ МИОПАТИИ

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Микашинович Зоя Ивановна.

Официальные оппоненты:

Островский Олег Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра теоретической биохимии с курсом клинической биохимии, заведующий кафедрой;

Бондарь Татьяна Петровна, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра клинической биохимии, заведующая кафедрой.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 22 декабря 2020 года в 10.00 час. на заседании диссертационного совета Д 208.038.02 на базе ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России (350063, Краснодар, ул. Митрофана Седина, 4, тел. (861) 2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

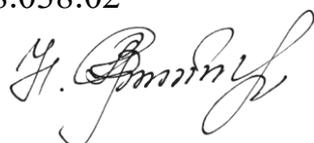
Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета Д 208.038.02

доктор медицинских наук,

доцент



Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. На сегодняшний день наиболее назначаемой группой гиполипидемических препаратов являются статины. Обычно препараты данной фармакологической группы хорошо переносятся, однако, при их приеме возможно развитие различных, иногда достаточно серьезных побочных эффектов (Karahalil B., Nare E., Koç G., Uslu İ. [et al.], 2017; Зыков М.В., 2019).

Наиболее опасным из них является специфическая миопатия, степень выраженности которой, может варьировать от незначительной миалгии до крайней степени миопатии - рабдомиолиза. Согласно данным исследований, на боли в мышцах жалуются около 5-10% пациентов, применяющих статины (Thompson P.D, Panza G., Zaleski A., Taylor B., 2016; Бойцов С.А., Погосова Н.В., Бубнова М.Г., Драпкина О. М. [и др.], 2018).

Несмотря на многочисленные исследования, не существует единого мнения о механизмах, лежащих в основе формирования статиновой миопатии. Можно предположить, что развитие миопатии является отражением нарушения как молекулярных реакций энергообразования, так и гемодинамических процессов, что ведёт к сдвигам электролитного баланса, потере миоглобина, фосфорсодержащих продуктов, нарушению утилизации кислорода, нарушению регуляции свободно-радикальных процессов и накоплению токсических продуктов. В связи с этим, возникает вопрос о роли тканевой гипоксии, которая формирует блоки на уровне «узловых» метаболитов, что может приводить к нарушению структурно-функциональной целостности саркомера.

Исследования, проведенные Зиновьевой О.Е., Самхаевой Н.Д., Вихлянцевым И.М. и соавт. убедительно доказывают, что при развитии миопатии наблюдается снижение содержания гигантских белков саркомера титина и небулина, в результате их повышенного протеолиза, и как следствие, происходит нарушение высокоупорядоченной структуры мышечного волокна, ухудшение его эластических свойств и сократительной способности. (Зиновьева О.Е., Самхаева Н.Д., Вихлянецев И.М. [и др.], 2019).

Исходя из этого, представляет интерес комплексный анализ состояния молекулярной структуры титина и небулина, кислородзависимых ферментативных антиоксидантных процессов и параметров углеводно-энергетического обмена в мышцах и эритроцитах лабораторных животных, что позволит раскрыть метаболическую основу нарушений функционального состояния саркомера при длительном применении статинов.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день, отсутствует диагностический тест и единая классификация симптомов поражения мышц, связанных с приемом статинов (Taylor B.A, Thompson P.D., 2018; Дядык А.И., Куглер Т.Е., Зборовский С.Р., Сулиман Ю.В., 2019).

В современной литературе приводятся весьма противоречивые сведения о частоте возникновения и степени тяжести статиновой миопатии. Поражение мышц при терапии статинами, как правило, связывают с назначением высоких доз препаратов и их длительным применением. Зарубежные авторы приводят анализ исследований, которые убедительно доказывают, что применяемая при ряде патологий (например, острый коронарный синдром) высокодозовая терапия статинами повышает риск развития статин-индуцированного поражения мышц. (Afilalo J., Majdan A.A., Eisenberg M.J., 2007; Lin J., Vanathy A., Winters C., Andersen L. [et al.], 2018).

Кроме того, в большинстве случаев терапия статинами осуществляется длительно, зачастую пожизненно, что также увеличивает риск поражения мышц. По данным исследований симптомы поражения мышц отмечают 7-29% пациентов (Stroes E.S., Thompson P.D., Corsini A. [et al.], 2015; Зыков М.В., 2019), что свидетельствует о значительной распространенности данного побочного эффекта, причины возникновения и механизмы, которого до сих пор окончательно не выяснены.

Учитывая популярность препаратов данной фармакологической группы среди врачей и пациентов возникает вопрос о возможности предотвращения возникновения данного побочного эффекта либо возможности его коррекции, что и послужило стимулом выполнения нашего исследования.

Цель исследования – выяснить роль метаболических сдвигов в формировании статиновой миопатии, на основании комплексного исследования молекулярной структуры титина и небулина, параметров антиоксидантной защиты и углеводно-энергетического обмена в мышцах и эритроцитах животных с гиперхолестеринемией до и после длительного применения симвастатина, определить дополнительные лабораторные критерии для ее диагностики в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Проанализировать характер изменения молекулярной структуры гигантских белков мышечной ткани животных с гиперхолестеринемией до и после длительного приёма статинов.

2. Проанализировать динамику изменения конечных продуктов углеводно-энергетического обмена в скелетной мускулатуре, кислородтранспортной функции эритроцитов интактных животных и животных с гиперхолестеринемией до и после длительного приёма статинов.

3. Выявить особенности изменения активности ферментов антиоксидантной защиты в мышцах и эритроцитах интактных животных и животных с гиперхолестеринемией до и после длительного приёма статинов.

4. Провести корреляционный анализ параметров углеводно-энергетического обмена, антиоксидантной защиты, а также показателей, отражающих структурно-функциональные изменения в мышцах животных с гиперхолестеринемией на фоне длительного применения симвастатина.

Научная новизна исследования. При выполнении диссертационного исследования впервые:

1. Проведено комплексное исследование, включающее в себя анализ изменений кислородтранспортной функции крови, ферментов антиоксидантной защиты в клетках крови и скелетной мускулатуре, а также структуры сократительных белков титина и небулина, у животных с гиперхолестеринемией до и после длительного применения статинов;

2. Полученный фактический материал выявил взаимосвязь обменных процессов и изменения ультраструктуры миоцитов, что позволило детализировать представление о молекулярных механизмах статиновой миопатии в эксперименте;

3. Разработаны и внедрены способ моделирования миопатии (патент на изобретение №2632624) и способ диагностики миопатии в эксперименте (патент на изобретение №2625743);

4. Обнаружена корреляционная зависимость между отдельными показателями углеводно-энергетического обмена, антиоксидантной защиты и сократительными белками, отражающими функциональное состояние миоцита;

5. Определены дополнительные лабораторные критерии для диагностики статиновой миопатии, обеспечивающие экспрессность проводимого исследования.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Теоретическая значимость работы заключается в установлении взаимосвязи структурно-функциональных и метаболических процессов в мышечной ткани и эритроцитах животных на фоне применения статинов в эксперименте. Выявленное снижение титина и небулина в мышцах животных с гиперхолестеринемией при длительном введении симвастатина, свидетельствует о деградации сократительных белков.

Практическая значимость исследования состоит в предложении использовать определение уровня титина в биопсийном материале, как ранний маркер нарушения структурно-функционального состояния миоцитов и развития мышечной дистрофии (патент на изобретение №2625743 от 18.07.2017г.). А выявленные дополнительные биохимические показатели могут быть использованы для совершенствования диагностики статиновой миопатии.

Методология и методы исследования. Диссертационная работа, выполненная в рамках научного направления кафедры общей и клинической биохимии №1 - «Молекулярные механизмы адаптации и повреждения, разработка способов диагностики и оценки эффективности терапии в эксперименте и клинике при социально значимых заболеваниях и критических состояниях», представляет собой экспериментальное исследование. Для достижения цели исследования - выяснения роли метаболических сдвигов в формировании статиновой миопатии, применялась совокупность методов научного познания, таких как наблюдение, сравнение, моделирование, анализ. Для реализации задач диссертационного исследования, был взят препарат из группы «статины» – симвастатин (Zocor®). Исследование проводилось на беспородных крысах-самцах, которые в процессе эксперимента были поделены на группы, в соответствии дизайном, разработанным соискателем. Диссертационная работа была выполнена с использованием актуальных методов исследования: биохимических, инструментальных, электрофоретических, патоморфологических, статистических. Выбранные методологические стратегии, а также научная систематизация и интерпретация полученных результатов позволили сделать экспериментально обоснованные выводы и предложить дополнительные лабораторные критерии диагностики статиновой миопатии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Снижение уровня титина и небулина в мышечной ткани животных с экспериментальной гиперхолестеринемией на фоне длительного применения симвастатина является показателем, который достоверно отражает наличие дистрофических процессов в мышце и свидетельствует о развитии миопатии. На основании полученных результатов разработаны "Способ диагностики миопатии в эксперименте" (патент на изобретение №2625743 18.07.2017г.) и "Способ моделирования миопатии" (патент на изобретение №2632624 от 06.10.2017г.).

2. Введение симвастатина интактным животным (группа сравнения) приводило к нарушению равновесия между пируватом и лактатом, за счет выраженного увеличения концентрации лактата, как в мышцах, так и в эритроцитах, на фоне значительного увеличения концентрации 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в эритроцитах, по сравнению с контрольной группой.

3. Введение симвастатина животным с экспериментальной гиперхолестеринемией характеризовалось снижением уровня метаболитов гликолиза – пирувата и лактата в

мышечной ткани, по сравнению с животными, которые не получали симвастатин, тогда как в эритроцитах сохранялся высокий уровень гликолиза.

4. Длительное введение симвастатина животным с экспериментальной гиперхолестеринемией сопровождалось достоверным уменьшением активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГПО) и концентрации GSH в мышцах, а также активности СОД и концентрации восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах, по сравнению с животными, которые не получали симвастатин, что свидетельствует о депрессии механизмов антиоксидантной защиты (АОЗ).

5. На основании корреляционного анализа структурных белков мышечной ткани, ферментов антиоксидантной защиты, метаболитов гликолиза установлена достоверная взаимосвязь между активностью ГП, СОД, концентрацией лактата и содержанием титина в биоптатах мышечной ткани, что является доказательством важной патогенетической роли изменений АОЗ и гликолитических процессов в формировании статиновой миопатии.

Степень достоверности и апробации работы. Достаточный объем выборки в эксперименте, применение современного оборудования и реактивов, актуальных лабораторных и инструментальных методов исследования, применение адекватных методов статистики, а также использование различных методологических подходов, соответствующих поставленным задачам диссертационного исследования, обеспечили достаточно высокую достоверность полученных данных. Сформулированные в диссертационной работе выводы обоснованы проведенными экспериментальными исследованиями.

Для статистической обработки полученного материала использовали программы STATISTICA 10.0 и Exsel Microsoft.

Для определения метода проведения сравнительного анализа на первом этапе статистической обработки данных каждая выборка подвергалась проверке на нормальность.

Так как объемы исследуемых выборок были менее 50, то для проверки на нормальность использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае, когда коэффициент значимости критерия Шапиро-Уилка был равен $p \geq 0,05$, принимали нулевую гипотезу, которая обозначала, что выборка подчиняется нормальному закону распределения (НЗР) и для сравнения использовался параметрический t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В противном случае считалось, что выборка не подчиняется НЗР и для расчёта применялся критерий Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

На втором этапе определяли наличие/отсутствие связей между показателями углеводно-энергетического обмена, антиоксидантной защиты и структурными белками мышечной ткани у животных на фоне длительного применения симвастатина.

Метод проведения корреляционного анализа также зависел от подчинения выборок нормальному закону распределения. Так, в случаях, когда выборки подчинялись НЗР для корреляции использовали параметрический критерий Пирсона, в противном случае, когда выборка не подчинялась НЗР, для расчёта корреляции использовали критерий Спирмена.

Материалы и основные положения диссертации изложены и обсуждены: на XV Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2016); на Международном симпозиуме «Биологическая подвижность»

(Пушино, 2016); на 3 Итоговой научной сессии молодых ученых РостГМУ (Ростов-на-Дону, 2016); на XVI Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2017); на XVIII Российской научно-практической конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении - дни молекулярной медицины на Дону» (Ростов-на-Дону, 2019).

Апробация диссертации состоялась на заседании научно-координационного совета «Медико-биологические проблемы» ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» МЗ РФ (протокол №7 от 14.06.2019г.).

Внедрение результатов исследования. Материалы диссертационного исследования были внедрены в учебный процесс кафедры общей и клинической биохимии №1 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ. Кроме того, основные результаты диссертационной работы могут быть применены при разработке практических рекомендаций по клинической биохимии, клинической фармакологии, кардиологии, эндокринологии.

Публикации. По теме диссертации в печатных изданиях опубликовано 20 научных работ, 5 из них в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы 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, в том числе получено 2 патента на изобретение.

Личный вклад автора в исследование. Соискатель принимал непосредственное участие на всех этапах подготовки и выполнения диссертационной работы. Личный вклад автора состоит в постановке целей и задач, разработке дизайна исследования (85%), анализе отечественной и зарубежной литературы (95%), выборке животных, получении и исследовании биологического материала животных, статистической обработке, анализе, обобщении полученных результатов и формулировке выводов (85%). При непосредственном участии соискателя написаны статьи и тезисы докладов (80%), разработаны (75%) способ моделирования миопатии (патент на изобретение №2632624) и способ диагностики миопатии в эксперименте (патент на изобретение №2625743), подготовлен текст и иллюстративные материалы диссертации (90%).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа представлена введением и шестью главами: обзор литературы, подробное описание материалов и методов исследования, блока с результатами собственных исследований и их обсуждение. Завершается работа заключением и выводами, которые сформулированы, на основании полученных результатов. Также в работе представлены: детальный список сокращений и условных обозначений, список литературы, иллюстративного материала и приложений. Диссертационная работа представлена 138 страницами машинописного текста, проиллюстрирована 15 таблицами и 26 рисунками. В тексте диссертации приводятся ссылки на 210 литературных источников (105 отечественных и 105 зарубежных авторов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование проводилось на беспородных крысах-самцах, масса которых составляла 300-350 г., возраст - 12-14 месяцев.

Животные содержались в соответствии с Приказом Минздрава РФ №708Н от

23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», а также с санитарными правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 29.08.2014».

Для выполнения поставленных задач диссертационного исследования, был взят гиполипидемический препарат - симвастатин, под торговым названием Zocor®. Выбор лекарственного препарата был обусловлен тем, что наибольший риск развития специфического побочного эффекта - «статиновая миопатия» отмечается, чаще всего, при применении статинов первого поколения. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

В процессе эксперимента животные были поделены на следующие группы:

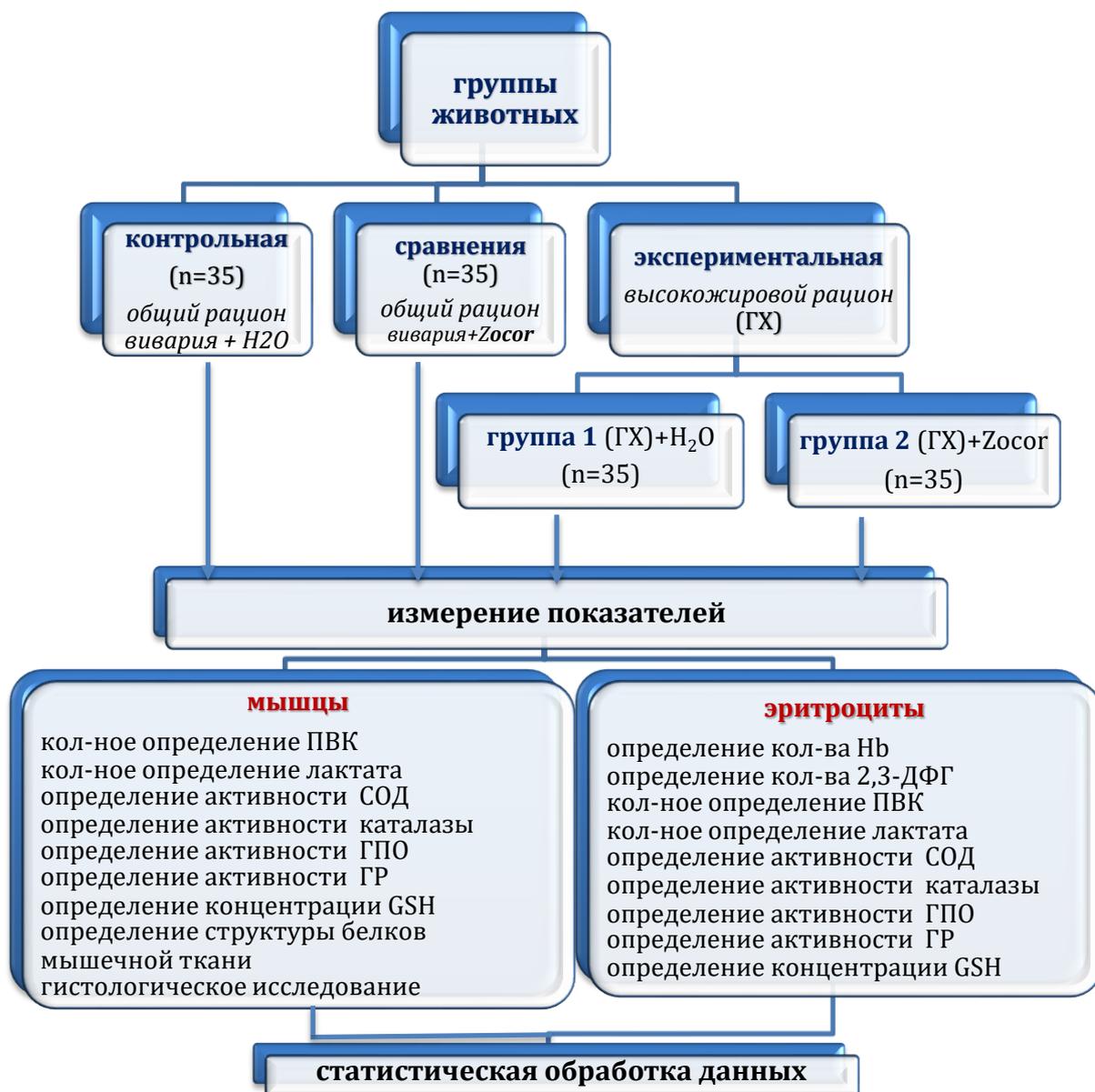


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Контрольная группа состояла из 35 животных, которые находились на обычном рационе вивария, без добавления лекарственных препаратов. Крысам данной группы,

ежедневно, в течение 3 месяцев один раз в сутки вводили 0,5 мл дистиллированной воды через питательный зонд.

Группу сравнения составили 35 крыс, которые в отличие от контрольной группы, получали через питательный зонд лекарственный препарат симвастатин (Zocor, 20 мг) по 0,0012 г/ 100 г массы один раз в сутки в течение 2-х месяцев в виде водной суспензии.

Животные экспериментальных групп (70 крыс) в течение 3 месяцев содержали на рационе с высоким содержанием жиров и углеводов (топленное сливочное масло, тростниковый сахар, манная крупа).

Через три месяца у данных животных по результатам анализа общего холестерина (ХС), который определяли на анализаторе «Вауег» (Германия), диагностировали эссенциальную гиперхолестеринемию. Затем животных снова разделили на 2 группы по 35 особей:

Животные группы 1 – в течение 2 месяцев содержались на рационе с высоким содержанием жиров и углеводов, без добавления лекарственных препаратов, при этом один раз в сутки они получали через питательный зонд 0,5 мл дистиллированной воды.

Животные группы 2 – в отличие от животных группы 1, в течение 2 месяцев получали через питательный зонд симвастатин (Zocor, 20 мг) по 0,0012 г/ 100 г массы один раз в сутки в виде водной суспензии через питательный зонд.

Из эксперимента животных выводили методом декапитации. Проведенная работа одобрена локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО «Ростовского государственного медицинского университета» МЗ РФ (протокол №21/15 от 10.12.2015г.)

Исследования по определению структуры белков мышечной ткани проводились в лаборатории структуры и функций мышечных белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук г. Пущино (зав. лабораторией - д.б.н. Вихлянцев И.М.). Изучение изменений содержания титина (гигантского белка толстых филаментов) и небулина (гигантского белка тонких филаментов) проводили методом ДСН-электрофореза в крупнопористом горизонтальном полиакриламидном геле с добавлением агарозы по Tatsumi R., Hattori A., (1995) в модификации Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A., (2017), которые направлены на улучшение разделения высокомолекулярных форм титина. Содержание титина и небулина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина. Для гистологического подтверждения миопатии проводили окраску микропрепаратов мышечной ткани по стандартной методике гематоксилином и эозином (Волкова О.В., Елецкий Ю.К., 1982).

Для определения концентрации метаболитов гликолитического расщепления глюкозы и активности ферментов антиоксидантной защиты в мышечной ткани, брали 1г скелетной мышцы животного и подвергали гомогенизации в охлажденном растворе 0,9% NaCl (1г:9мл), после чего проводили центрифугирование в течение 30 минут при 3000 об./мин. Для проведения исследования была отобрана надосадочная жидкость.

Для получения эритроцитов кровь подопытных животных стабилизировали гепарином (10 ед./мл), затем красные кровяные тельца отделяли от тромбоцитов и лейкоцитов в 3% желатиновом растворе, после чего проводили центрифугирование, с целью разделения плазмы и верхнего слоя клеток. Выделенные красные клетки крови 2-3 раза промывали 0,9% раствором NaCl. Затем в течение 30 минут проводили цен-

трифугирование при 3000 об./мин, для получения плотного осадка эритроцитов, с целью последующего определения метаболитов гликолиза. Для определения общего уровня холестерина в сыворотке крови использовали анализатор «Bayer» (производство Германия).

Концентрацию гемоглобина (Hb) в гемолизате (в г/мл гемолизата) определяли методом спектрофотометрии в щелочной среде, при $\lambda=540$ нм (Луганова И.С., Блинов М.Н., 1975). Для анализа газотранспортной функции эритроцитов определяли концентрацию 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) колориметрически ($\lambda=670$ нм), по методу Лугановой И.С., Блинова М.Н. (1975), в описании Микашинович З.И. (1989). Результаты выражали в мкмоль/мл плотного осадка эритроцитов. Определение концентрации метаболита гликолиза - пировиноградной кислоты (ПВК) проводили колориметрически, при длине волны $\lambda=440$ нм, по методу Камышников В.С. (2004). Интенсивность окраски пропорциональна содержанию пирувата. Результаты выражали в мкмоль/мл плотного осадка эритроцитов или мг белка в тканях. Концентрацию лактата оценивали спектрофотометрическим методом при $\lambda=590$ нм. Результаты выражали в мкмоль/мл плотного осадка эритроцитов или мг белка в тканях (Данилова Л.А., 2003).

Активность фермента антиоксидантной защиты - супероксиддисмутазы (СОД) определяли по торможению аутоокисления адреналина в щелочной среде и выражали в условных единицах на 1 г гемоглобина или мг белка в минуту (Гуревич В.С., Контрощикова К.Н., Шатилина Л.В., 1990). Определение активности каталазы проводили колориметрически, при $\lambda=400$ нм (Королюк М.А. [и др.], 1988). Активность каталазы выражали в мКат/г гемоглобина или мг белка в минуту (Микашинович З.И. [и др.], 2004). Активность глутатионпероксидазы (ГПО) определяли колориметрическим методом, при $\lambda=412$ нм. Результаты выражали в мкмоль/г гемоглобина или мг белка в мин. (Данилова Л.А., 2003). Активность глутатионредуктазы (ГР) определяли спектрофотометрически по убыли восстановленного НАДФН+Н, при длине волны $\lambda=340$ нм, используя метод Юсуповой (1989), в описании Даниловой Л.А. (2003). Активность ГР выражали в мкмоль превращения НАДФН+Н на 1г гемоглобина или мг белка в минуту. Определение концентрации восстановленного глутатиона (GSH) проводили колориметрически, при $\lambda=412$ нм по методу Ellman G.L., (1959). Концентрацию GSH выражали в мкмоль/г гемоглобина или мг белка. (Микашинович З.И. [и др.], 2004).

Для статистической обработки полученного материала использовали программы STATISTICA 10.0 и Exsel Microsoft. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате выполненных исследований, установлено, что у животных на фоне длительного применения симвастатина в *m.biceps* произошли изменения качественного и количественного состава титина и небулина, по сравнению с животными, которым симвастатин не вводили. На электрофореграмме в *m. biceps* животных с индуцированной гиперхолестеринемией содержание небулина, титина и его изоформ практически не отличалось от показателей контрольной группы. В то время как у животных группы 2 на фоне длительного применения симвастатина наблюдалось увеличение содержания протеолитического фрагмента T2 на 21,24% ($p < 0,001$), в 1,2 раза, относительно контрольной группы (рисунок 2), что, вероятно, связано с повышенным

протеолизом интактного титина. Кроме того, в этой группе отмечалось уменьшение содержания изоформ титина: N₂A-изоформы на 30,88% (p<0,001) и NT-изоформы на 38,46% (p<0,001) относительно контрольной группы, т.е. в 1,44 и 1,6 раза соответственно (рисунок 2).

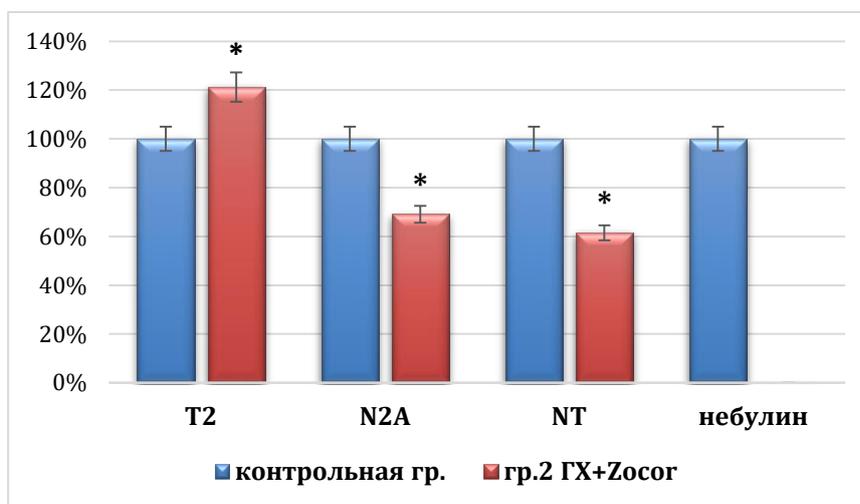


Рисунок 2 – Изменение содержания титина и небулина в м. biceps животных с гиперхолестеринемией на фоне длительного применения симвастатина.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

Важно отметить, что у животных на фоне длительного применения симвастатина небулин в мышечной ткани полностью отсутствует и, соответственно, данный белок не выполняет своих функций: стабилизации тонких нитей и регуляции взаимодействия актина и миозина. Поскольку известно, что нарушение структуры титина развивается при ряде патологий мышечной ткани, то можно полагать, что снижение его уровня является показателем, информативно отражающим наличие дистрофических процессов в мышце. Полученные нами результаты свидетельствуют, что определение уровня титина в биопсийном материале может быть использовано, как ранний маркер мышечной дистрофии. На основании полученных нами результатов были разработаны "Способ моделирования миопатии" (патент на изобретение №2632624 от 06.10.2017г.) и "Способ диагностики миопатии в эксперименте" (патент на изобретение №2625743 18.07.2017г.).

Однако, исследование сократительных белков достаточно трудоемкий процесс, так как титин и небулин чрезвычайно чувствительны к протеолизу во время препаративных процедур (Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., 2012; Wang K., 1982), поэтому для уточнения представления о молекулярных механизмах формирования и диагностики статиновой миопатии был проведен анализ динамики показателей, отражающих состояние энергетического обмена клетки, активности основных ферментативных антиоксидантов в скелетной мускулатуре и эритроцитах животных до и после приема статинов.

Мышцы

Интakтные животные после длительного приема симвастатина

Введение в течение 2-х месяцев симвастатина (Zocor, 20 мг) интактным животным (группа сравнения) приводит к резкому увеличению в мышечной ткани лактата

на 153,03% ($p < 0,001$), на фоне статистически значимого снижения концентрации ПВК на 82,2% ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (рисунок 3).

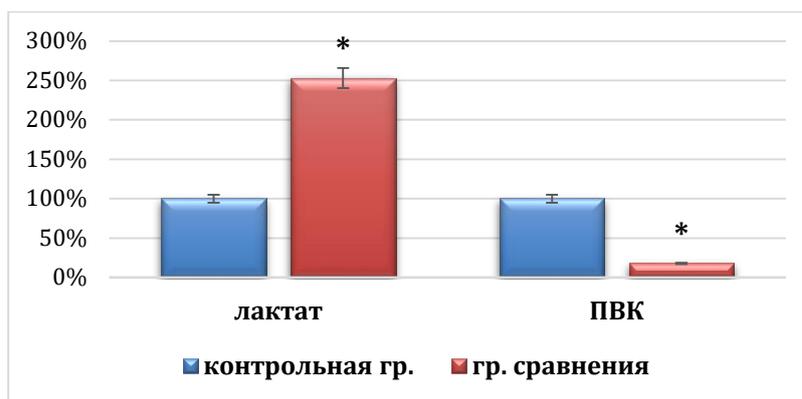


Рисунок 3 – Изменение концентрации метаболитов гликолиза в мышечной ткани интактных животных, на фоне длительного приема симвастатина.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

Важно подчеркнуть, что накопление лактата сопровождается формированием лактоацидоза и снижением активности большинства регуляторных ферментов, а, следовательно, может приводить к нарушению двигательной активности животных (Минигалин А.Д., Шумаков А.Р., Баранова Т.И. [и др.], 2011; Huang J., Du J., Lin W., Long Z. [et al.], 2019).

Исследование работы ферментов антиоксидантной защиты показало, что активность СОД и каталазы животных группы сравнения были снижены на 61,88% ($p < 0,001$) и на 24,10% ($p > 0,05$) соответственно относительно контрольной группы (рисунок 4). Исходя из этого можно сделать вывод, что снижение активности СОД и каталазы у интактных животных на фоне длительного применения симвастатина является показателем снижения антиоксидантного потенциала миоцитов, что способствует нарушению равновесия в системе проксиданты-антиоксиданты и накоплению потенциально опасных активных форм кислорода. Кроме того, снижение активности СОД может быть обусловлено ингибирующим влиянием высокой концентрации лактата.

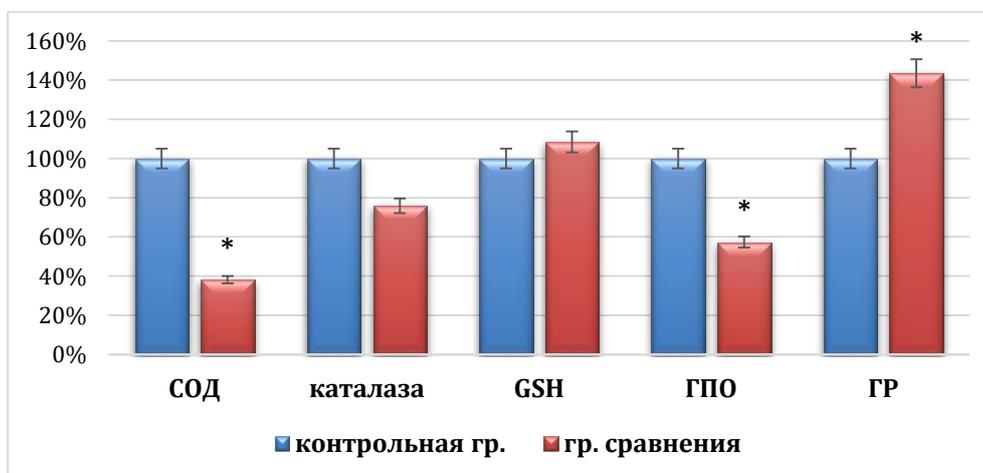


Рисунок 4 – Изменение активности ферментов АОЗ в мышечной ткани интактных животных, на фоне длительного приема симвастатина.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

При определении активности глутатионзависимых ферментов в мышечной ткани интактных животных, длительное время принимавших симвастатин (группа сравнения) было выявлено незначительное повышение концентрации GSH на 8,44% ($p>0,05$), статистически значимое увеличение активности ГР на 43,47% ($p<0,05$), а также снижение активности ГПО на 42,64 % ($p<0,001$) (рисунок 4).

Снижение активности ГПО в мышечной ткани интактных животных, длительное время получавших симвастатин, на фоне снижения активности каталазы может привести к накоплению пероксидов и развитию пероксидного стресса, вызываемого, в том числе, и ксенобиотиками (Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 2009).

Итак, представленный фактический материал свидетельствует, что в мышечной ткани интактных животных, длительное время принимавших симвастатин, происходят метаболические сдвиги, которые говорят об изменении направленности углеводно-энергетического обмена в сторону превалирования анаэробных процессов и разбалансировке системы антиоксидантной защиты с угрозой накопления прооксидантов.

Животные с экспериментальной гиперхолестеринемией до и после длительного введения симвастатина

В мышечной ткани животных с индуцированной гиперхолестеринемией наблюдалось увеличение концентрации лактата на 73,23% ($p<0,001$), а также значительное увеличение ПВК на 247,11% ($p<0,001$) относительно контрольной группы. Накопление недоокисленных продуктов гликолиза в клетке, особенно выраженное увеличение уровня ПВК, может быть обусловлено избытком легкоусваиваемых углеводов и жиров, составляющих основу рациона данной группы. Подавление биосинтеза эндогенного холестерина у животных с индуцированной гиперхолестеринемией, на фоне длительного приема симвастатина способствовало снижению уровня ХС в сыворотке крови до $1,637\pm 0,136$ ммоль/л, что достоверно отличалось от показателей группы 1 (уровень ХС, которых составлял $2,785\pm 0,342$ ммоль/л).

Вместе с тем, у животных данной группы в мышечной ткани наблюдалось статистически значимое снижение концентрации метаболитов гликолиза – лактата на 32,36% ($p_1<0,01$) и ПВК на 58,0% ($p_1<0,001$), относительно группы животных с индуцированной гиперхолестеринемией, не получавших симвастатин (рисунок 5). Вероятно, подавление биосинтеза эндогенного холестерина, вследствие ингибирования активности 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермента А (ГМГ-КоА редуктазы), несмотря на сохраняющийся характер питания, способствовало нивелированию гиперметаболизма глюкозы.

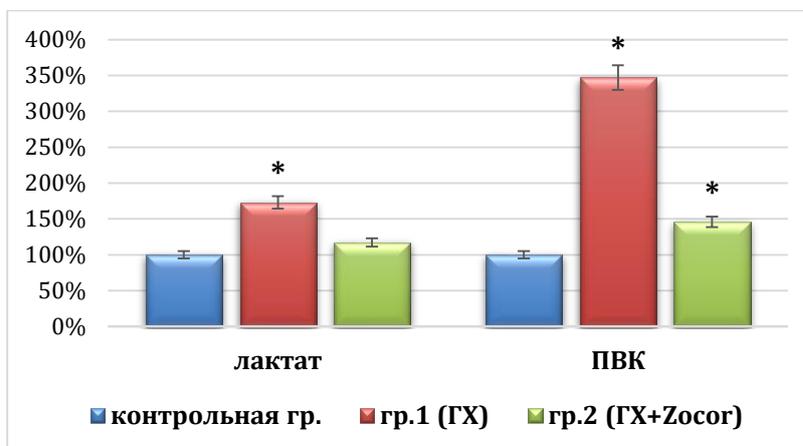


Рисунок 5 – Изменение концентрации метаболитов гликолиза в мышечной ткани животных исследуемых групп.

Примечание: * - при $p\leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

Относительно контрольной группы оставалась увеличенной концентрация ПВК на 45,77% ($p < 0,001$) и сохранилась тенденция к увеличению уровня лактата на 17,17% ($p > 0,05$) (рисунок 5). Полученные данные позволяют высказать предположение, что применение симвастатина у животных с экспериментальной гиперхолестеринемией способствует снижению тяжести гипоксии, что вероятно связано с ослаблением негативного влияния высоких концентраций лактата и ПВК, по сравнению с животными, которые не получали симвастатин.

У животных с экспериментальной гиперхолестеринемией в мышечной ткани была выявлена тенденция к повышению активности СОД на 12,11 % ($p > 0,05$), на фоне значительного увеличения активности каталазы на 82,66% ($p < 0,001$) (рисунок 6).

Значительное увеличение каталазы на фоне незначительного увеличения активности СОД, позволяют сделать заключение о том, что именно каталаза берет на себя основную функцию нейтрализации перекисных соединений.

Введение симвастатина животным с экспериментальной гиперхолестеринемией способствовало снижению активности СОД на 56,2% ($p_1 < 0,001$), активность каталазы осталась практически без изменений относительно показателей животных группы 1. В тоже время относительно показателей животных контрольной группы было выявлено значительное снижение активности СОД на 50,89% ($p < 0,001$), тогда как активность каталазы была увеличена на 86,47% ($p < 0,001$) (рисунок 6).

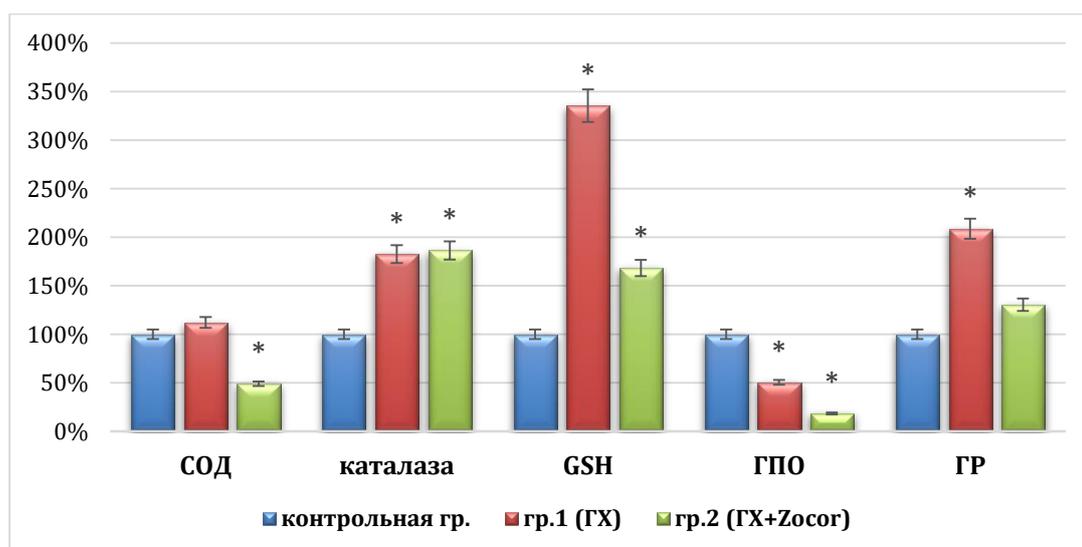


Рисунок 6 – Изменение активности ферментов системы ферментов АОЗ в мышечной ткани животных исследуемых групп.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

Длительное применение симвастатина приводит к разбалансировке в работе антиоксидантной пары - супероксиддисмутазы и каталазы. И, несмотря на увеличенную активность каталазы, которую можно рассматривать, как адаптационный механизм, значительное уменьшение активности СОД приведет к образованию свободных радикалов, провоцируя развитие окислительного стресса.

При исследовании активности ферментов системы глутатиона у животных с экспериментальной гиперхолестеринемией были получены следующие результаты: выраженное повышение содержания GSH на 235,36% ($p < 0,001$), при этом активность ГПО снизились на 49,46% ($p < 0,001$), активность ГР статистически значимо повысилась на 108,69% ($p < 0,001$) относительно контрольной группы (рисунок 6).

Резкое повышение содержания восстановленного GSH можно рассматривать как важный адаптационный механизм, направленный на сохранение устойчивости к окислительному стрессу, который формируется в условиях резкого снижения ГПО, что приводит к накоплению окисленных дериватов. В тоже время, можно полагать, что такие изменения параметров антиоксидантной системы в мышцах в условиях гиперхолестеринемии носят приспособительный характер, направленный на сохранение антиокислительного потенциала миоцитов.

В группе животных с индуцированной гиперхолестеринемией длительное время принимавших симвастатин выявлены значительные изменения активности глутатион-зависимых ферментов: снижение активности ГПО на 63,13 % ($p_1 < 0,001$), ГР на 37,5 % ($p_1 < 0,001$) и концентрации GSH на 49,83 % ($p_1 < 0,001$) относительно показателей группы 1. Снижение уровня GSH может быть обусловлено влиянием гипоксии. Обращает на себя внимание, что относительно показателей контрольной группы активность ГПО была снижена на 81,37 % ($p < 0,001$), повышена активность ГР на 30,43 % ($p > 0,05$) и концентрация GSH на 68,25 % ($p < 0,001$), что указывает на снижение адаптивного потенциала глутатионовой системы миоцитов, и нарушение сбалансированной работы ферментов системы глутатиона (рисунок 6).

Резюмируя полученные данные можно отметить, что метаболические изменения в мышечной ткани животных после длительного приема симвастатина при разном функциональном состоянии организма имеют свои особенности. В мышечной ткани интактных животных после введения симвастатина наблюдали накопление лактата (дисбаланс в I и II звеньях ферментативной антиоксидантной защиты), что характерно для гипоксического повреждения клеток.

В условиях моделируемой гиперхолестеринемии введение симвастатина, напротив, способствовало снижению тяжести гипоксии, хотя уровень узловых метаболитов гликолиза оставался повышенным. Динамика активности антиоксидантных ферментов после введения симвастатина животным с экспериментальной гиперхолестеринемией свидетельствует о прогрессирующем разобщении основных звеньев антиоксидантной защиты.

Эритроциты

Интактные животные после длительного приема симвастатина

Применение симвастатина у интактных животных вызвало в эритроцитах статистически значимое увеличение концентрации 2,3-ДФГ на 97,66% ($p < 0,001$) и лактата на 92,87% ($p < 0,001$), а также снижение концентрации ПВК на 42,81% ($p > 0,05$) относительно контрольной группы (рисунок 7).

Выраженное увеличение концентрации 2,3-ДФГ указывает на снижение сродства гемоглобина к кислороду и формировании гипоксии. Также о развитии гипоксии свидетельствует накопление продукта гликолиза - лактата, которое происходит на фоне снижения концентрации пирувата.

Исследование работы ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах интактных животных после длительного применения симвастатина, показало следующие: снижение активности СОД и каталазы, на 22,95% ($p > 0,05$) и на 13,57% ($p > 0,05$) соответственно, относительно контрольной группы (рисунок 8).

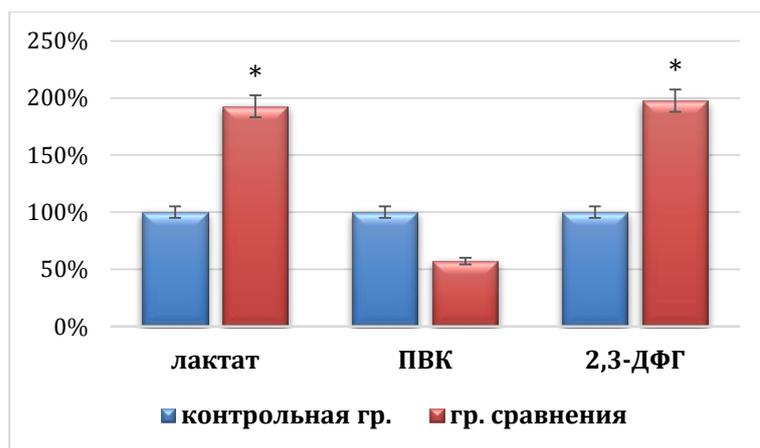


Рисунок 7 – Изменение концентрации метаболитов гликолиза в эритроцитах интактных животных, на фоне длительного приема симвастатина.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

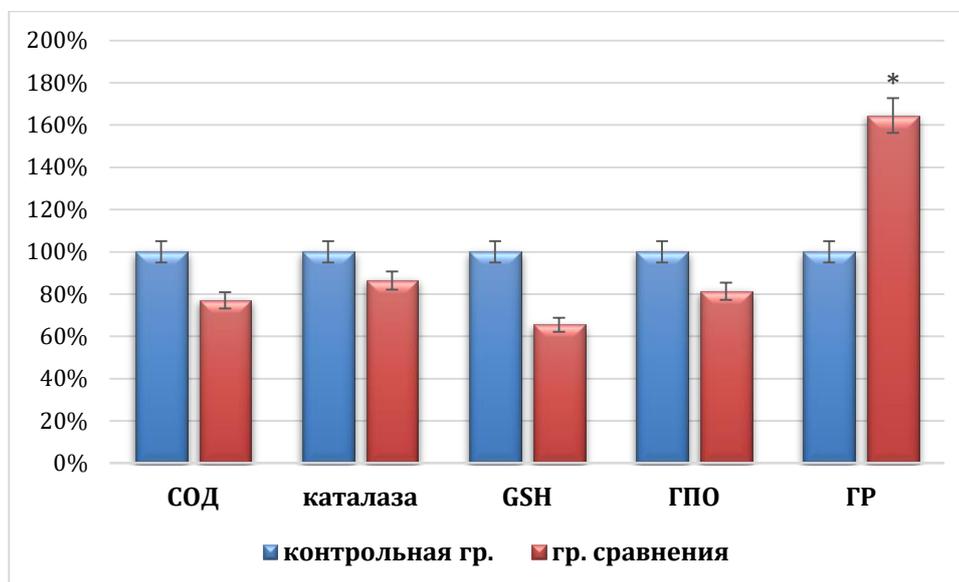


Рисунок 8 – Изменение активности ферментов системы АОЗ в эритроцитах интактных животных на фоне длительного приема симвастатина.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что снижение активности СОД, и тенденция к снижению активности каталазы вызывает ослабление активности антиоксидантной защиты в эритроцитах животных исследуемой группы, что может являться показателем окислительного стресса (Менабде К.О., Бурджанадзе Г.М., Чачуа М.В. [и др.], 2011). При исследовании активности ферментов глутатиона в эритроцитах интактных животных на фоне длительного приема симвастатина было выявлено снижение концентрации GSH на 34,54% ($p > 0,05$) и активности ГПО на 18,69% ($p > 0,05$), в то время как активность ГР статистически значимо увеличилась на 64,54% ($p < 0,005$) относительно контрольной группы (рис.8). Недостаток GSH подвергает клетку риску окислительного повреждения, поскольку сохранение баланса в системе GSH/GSSG является важным показателем ее жизнеспособности (Larsson E., 1983; Кулинский В.И., Колесниченко Л.С., 1990). А выявленное увеличение активно-

сти ГР, очевидно, играет важную роль в развитии адаптивного антиоксидантного ответа, направленного на поддержание уровня GSH.

Животные с экспериментальной гиперхолестеринемией до и после длительного введения симвастатина

В эритроцитах животных с индуцированной гиперхолестеринемией (группа 1) было отмечено увеличение концентрации лактата на 42,77% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой, а также статистически значимое увеличение на 385,28% ($p < 0,001$) концентрации 2,3-ДФГ - аллостерического регулятора сродства гемоглобина к кислороду, в то время как концентрация ПВК снизилась на 15,84% ($p > 0,05$) (рисунок 9).

Такое значительное увеличение концентрации 2,3-ДФГ на фоне увеличения концентрации лактата, свидетельствуют об усилении отдачи кислорода тканям и формировании тканевой гипоксии. Важно подчеркнуть, что разнонаправленные изменения концентрации ПВК и лактата в эритроцитах животных, получавших симвастатин, могут свидетельствовать о нарушении равновесия между этими метаболитами, что наблюдается при различных патологических состояниях.

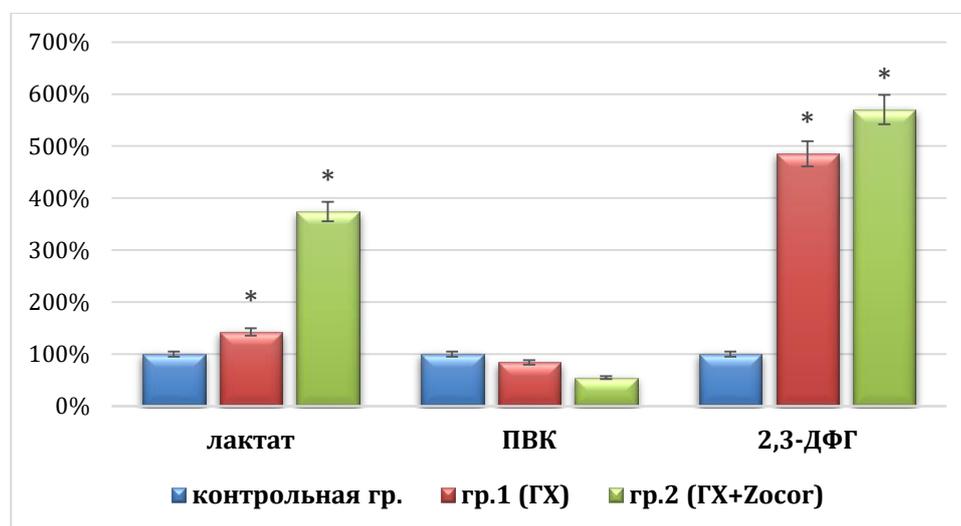


Рисунок 9 – Изменение концентрации метаболитов гликолиза в эритроцитах животных исследуемых групп, на фоне длительного приема симвастатина.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

После длительного введения животным с экспериментальной гиперхолестеринемией симвастатина, в эритроцитах наблюдалось достоверное увеличение концентрации лактата на 161,89% ($p_1 < 0,001$) и 2,3-ДФГ на 17,51% ($p_1 < 0,001$), а также уменьшение концентрации ПВК на 34,68% ($p_1 < 0,001$), относительно группы 1. А относительно контрольной группы в группе 2, было отмечено увеличение концентрации лактата на 273,91% ($p < 0,001$), в тоже время снизилась концентрация ПВК 45,02% ($p > 0,05$). Особенно следует отметить, значительное увеличение концентрации 2,3-ДФГ на 470,25% ($p < 0,001$) (рисунок 9). Резкое увеличение содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах происходит в условиях выраженной гипоксемии, и направлено на улучшение перехода кислорода в ткани. Существенное увеличение концентрации лактата, на фоне снижения ПВК свидетельствует о развитии метаболического ацидоза.

В эритроцитах животных с гиперхолестеринемией (группа 1) было выявлено статистически значимое снижение активности СОД на 60,46% ($p < 0,001$), в то время как активность каталазы значительно повысилась на 143,33% ($p < 0,001$) (рисунок 10). Полученные нами разнонаправленные изменения активностей ферментов этой пары, могут рассматриваться, как неблагоприятный фактор, способствующий накоплению потенциально опасных активных форм кислорода.

В эритроцитах животных с гиперхолестеринемией, длительное время получавших симвастатин было отмечено, снижение активности СОД на 23,98% ($p_1 < 0,001$) и каталазы на 39,76% ($p_1 < 0,001$), относительно группы 1. А относительно контрольной группы в эритроцитах животных с гиперхолестеринемией, длительное время получавших симвастатин активность СОД была снижена на 69,94% ($p < 0,001$), а активность каталазы, напротив увеличена 46,58% ($p > 0,05$) (рисунок 10).

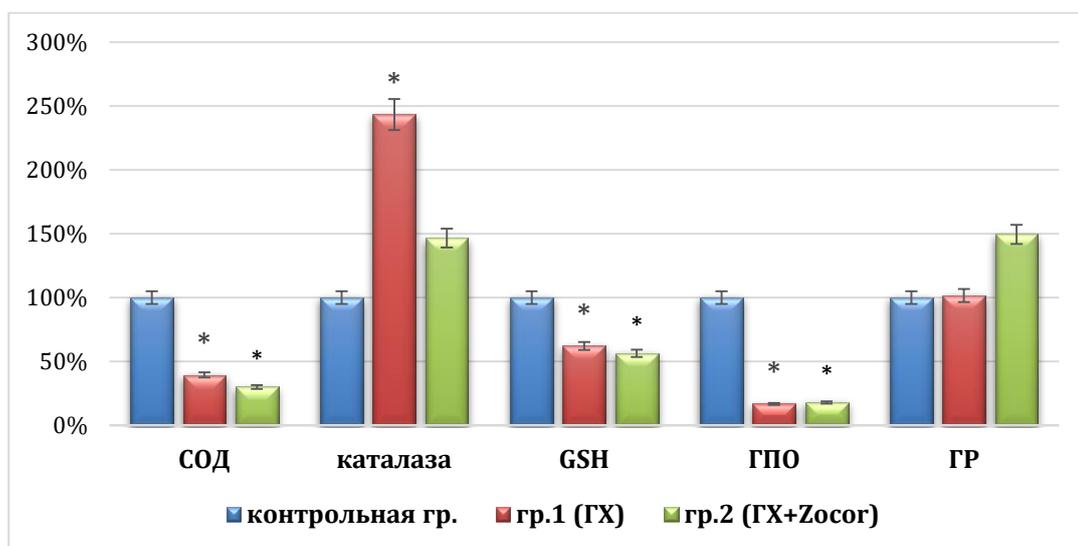


Рисунок 10 – Изменение активности ферментов системы АОЗ в эритроцитах животных исследуемых групп.

Примечание: * - при $p \leq 0,05$ различия относительно контрольной группы статистически значимы

Введение симвастатина способствует усугублению разбалансировки работы антиоксидантной пары - супероксиддисмутаза и каталаза, что, в итоге может привести к развитию окислительного стресса.

В эритроцитах крыс с эссенциальной гиперхолестеринемией (группа 1) было выявлено статистически значимое снижение концентрации GSH на 37,8% ($p < 0,001$), активности ГПО на 83,12% ($p < 0,001$), в то время как активность ГР практически не изменилась относительно контрольной группы (рисунок 10). В данном случае можно предположить, что при снижении активности ферментов глутатион зависимого звена основная защитная роль принадлежит каталазе.

У животных с экспериментальной гиперхолестеринемией на фоне применения симвастатина были получены следующие результаты: тенденция к снижению концентрации GSH на 9,23% ($p_1 > 0,05$), увеличение активности ГПО на 7,10% ($p_1 > 0,05$) и активности ГР на 47,01% ($p_1 < 0,001$) относительно группы 1, похожие изменения активности ферментов системы глутатиона наблюдались относительно контрольной группы: снижение концентрации GSH на 43,54% ($p < 0,02$), статистически значимое сниже-

ние активности ГПО на 81,93% ($p < 0,001$) и повышение активности ГР на 49,56% ($p > 0,05$) (рисунок 10).

Сохранение низкой активности СОД и ГПО, а также низкого уровня GSH свидетельствует о снижении мощности антиоксидантной защиты эритроцитов в целом. Повышенная активность ГР, с одной стороны, может быть обусловлена высокой «метаболической» устойчивостью данного фермента, с другой стороны это может привести к постепенному истощению пула восстановленных коферментов и развитию перекисного гемолиза эритроцитов.

Выявленные сдвиги в системе белков, обеспечивающих функциональную состоятельность мышечных тканей в сочетании с изменениями в метаболическом обеспечении этих процессов ставят вопрос об их взаимосвязях и взаимозависимости, что важно для понимания как теоретических, так и практических аспектов разрабатываемой темы.

Для выяснения закономерностей между показателями углеводно-энергетического обмена, антиоксидантной защиты и структурными белками мышечной ткани у животных на фоне длительного применения симвастатина был проведен корреляционный анализ. В результате были выявлены положительные корреляционные зависимости между следующими показателями: содержанием NT – изоформы титина и активностью ГР; содержанием NT – изоформы титина и активностью СОД. Также были отмечены отрицательные корреляционные зависимости между показателями: содержанием N2A-изоформы титина и уровнем лактата; содержанием T2-протеолитического фрагмента титина и уровнем лактата.

Анализ изменения исследуемых параметров позволяет определить информативные показатели (активность ГР, СОД и концентрация лактата), которые коррелируют с уровнем титина, что обосновывает возможность использования метаболических параметров для выявления миопатии без исследования белков титина и небулина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что в основе миотоксичности статинов лежит сложный комплекс структурно-функциональных изменений в мышечной ткани и крови, которые характерны при истощении клеточных защитных реакций. В результате запускается каскад метаболических сдвигов, приводящих к деградации мышечных белков и в конечном итоге к функциональной неполноценности саркомера.

ВЫВОДЫ

1. Выявленное в эксперименте снижение уровня титина и небулина в мышечной ткани животных после длительного применения симвастатина является информативным показателем, который отражает наличие дистрофических изменений в мышцах и указывает на развитие миопатии. На основании полученных результатов исследования разработаны "Способ диагностики миопатии в эксперименте" (патент на изобретение №2625743 18.07.2017г.) и "Способ моделирования миопатии" (патент на изобретение №2632624 от 06.10.2017г.).

2. Введение симвастатина интактным животным способствовало накоплению лактата и снижению уровня ПВК в эритроцитах и мышцах, что в сочетании с повышением уровня 2,3-ДФГ в эритроцитах, свидетельствует об активации гликолитических процессов и изменении кислородного потенциала клеток.

3. В условиях моделируемой гиперхолестеринемии введение симвастатина способствовало уменьшению гипоксических сдвигов в мышцах, на что указывает снижение уровня лактата и ПВК.

4. Введение симвастатина животным с экспериментальной гиперхолестеринемией, сопровождается снижением мощности антиоксидантной системы, как в мышцах, так и в эритроцитах, за счет выраженного уменьшения активности СОД, ГПО и концентрации GSH.

5. Достоверные корреляции между отдельными показателями углеводно-энергетического обмена, антиоксидантной защиты и показателями, отражающих функциональное состояние сократительного белка титина, позволили выделить наиболее информативные показатели, такие как, активность ГР, СОД и концентрация лактата в биоптатах мышечной ткани у пациентов со статиновой миопатией, что дает новое направление в оценке функционального состояния саркомера при длительном применении статинов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Снижение уровня титина в скелетной мускулатуре является маркером развития миопатии, что может быть использовано для ранней диагностики дистрофических процессов в мышцах (патент на изобретение №2625743).

2. Достоверные корреляции между уровнем титина и активностью ГР, СОД, концентрацией лактата обосновывают возможность их использования, с целью повышения экспрессивности и упрощения диагностики, наряду с определением активности креатинфосфокиназы, в качестве дополнительных лабораторных критериев статин-индуцированной миопатии.

3. Отображенные информативные метаболические показатели могут быть использованы для оценки эффективности проводимой терапии и прогноза развития статиновой миопатии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные в результате диссертационного исследования данные позволяют полагать, что для повышения эффективности и безопасности терапии с применением агрессивных доз статинов целесообразным является включение в схемы терапии препаратов, обладающих антигипоксическими и антиоксидантными эффектами.

Особое практическое значение на сегодняшний день имеет создание системы мониторинга, с целью своевременного выявления статин-индуцированных побочных эффектов. В связи с чем, открытым остается вопрос поиска надежных и информативных методов ранней диагностики статиновой миопатии, с дальнейшей разработкой тест-систем.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Некоторые особенности структурно-функциональных изменений в скелетной мускулатуре экспериментальных животных, обусловленные длительным приёмом симвастатина (зокора) / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова** [и др.] // Международ. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы современной медицины» (Екатеринбург, 12 марта 2015г.) : сб. науч. тр. – Екатеринбург: ИЦРОН, 2015. – С. 32-33.

2. Микашинович, З.И. Метаболическое обеспечение клеток крови и миоцитов экспериментальных животных при длительном приёме статинов / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова** // XIV всерос. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д, 15-16 мая 2015г.) : матер. конф. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2015. – С. 85-88.

3. Микашинович, З.И. Нарушение биоэнергетических процессов в мышечной ткани животных как один из патогенетических механизмов статиновой миопатии / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова** // Международ. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы современной медицины» (СПб, 11 января 2016 г.) : сб. науч. тр. – СПб: ИЦРОН, 2016. – С. 52-54.

4. Уровень тайтина как показатель мышечной дистрофии в эксперименте / Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова**, О.Г. Саркисян [и др.] // Международ. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы современной медицины» (Екатеринбург, 10 марта 2016г.) : сб. науч. тр. – Екатеринбург: ИЦРОН, 2016. – С. 59-61.

5. Dynamics of bioenergetic processes in muscle tissue of rats after prolonged injection of simvastatin / Z.I. Mikashinovich, E.S. Belousova, **E.V. Vinogradova**, I.A. Semenets // International Symposium «Biological motility (Pushchino, 11-14 may 2016) : Materials of International Symposium.- Pushchino: Synchronobook, 2016. – P. 152-155.

6. Динамика активности антиоксидантных ферментов в мышцах крыс при длительном введении симвастатина / Е.С. Белоусова, З.И. Микашинович, **Е.В. Виноградова**, И.А. Семенец // Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Scientific bases of development and realization of modern technologies of health protection» (Прага, 28-29 октября 2016) : матер. конф. – Prague: Sociosféra-CZ, 2016. – С. 359-362.

7. **Виноградова, Е.В.** Гипоксия как молекулярная основа биохимических изменений в мышцах животных при длительном приёме симвастатина (зокора) / **Е.В. Виноградова**, О.Д. Могильная // XXI международ. науч.-практ. конф. «Современные тенденции развития науки и технологии» (Белгород, 30 декабря 2016г.) : матер. конф. – Белгород, 2016. – С. 65-68.

8. Некоторые особенности изменения биоэнергетических процессов в мышечной ткани крыс, после длительного введения симвастатина (зокора) / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова**, И.А. Семенец // XV росс. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д, 13 мая 2016г.) : матер. конф. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2016. – С. 137-139.

9. Динамика активности ферментов цикла Кребса в мышечной ткани крыс после длительного введения симвастатина / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова**, И.А. Семенец // XV росс. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д, 13 мая 2016г.) : матер. конф. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2016. – С. 124-126.

10. **Виноградова, Е.В.** Изменение кислородтранспортной функции и антиоксидантных процессов в эритроцитах животных после длительного введения симвастатина (зокора) / **Е.В. Виноградова**, Е.С. Белоусова // 3 итоговая сессия молодых ученых РостГМУ (Ростов н/Д, 1 июня 2016г.) : сборник матер. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2016. – С. 50-52.

11. Нарушение энергетического обмена в мышечной ткани как один из молекулярных механизмов статиновой миопатии / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, **Е.В. Виноградова** [и др.] // XI Международ. науч.-практ. конф. «Fundamental and

applied sciences today XI» (North Charleston, USA, 10-11 апреля 2017) : матер. конф. – North Charleston, USA, 2017. – С. 40-43.

12. *Пат. № 2625743 Российская Федерация, МПКG01N 33/48. Способ диагностики миопатии в эксперименте/ Белоусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г., Виноградова Е.В. ; заявитель и патентообладатель. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России (ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России), Белоусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г., Виноградова Е.В. – № 2016122002; заявл. 02.06.2016; опубл. 18.07.2017; Бюл. № 20.

13. *Ферментативная антиоксидантная защита в мышцах крыс при длительном введении симвастатина / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, Е.В. Виноградова, И.А. Семенец // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т.12. – №1(67). – С. 54-57.

14. Виноградова, Е.В. Структурно-функциональные изменения в мышечной ткани при длительном приёме статинов / Е.В. Виноградова, И.А. Семенец // XVI росс. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д, 12-13 мая 2017г.) : матер. конф. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2017. – С. 90-94.

15. *Пат. № 2632624 Российская Федерация, МПКG09B 23/28. Способ моделирования миопатии/ Белоусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г., Вихлянцев И.М., Виноградова Е.В. ; заявитель и патентообладатель. – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России (ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России), Белоусова Е.С., Микашинович З.И., Саркисян О.Г., Вихлянцев И.М., Виноградова Е.В. – № 2016122000; заявл. 02.06.2016; опубл. 06.10.2017; Бюл. № 28.

16. *Виноградова, Е.В. Биохимические изменения в мышечной ткани крыс при длительном приеме симвастатина / Е.В. Виноградова // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99. – №2. – С. 240-244.

17. Виноградова, Е.В. Особенности метаболического ответа мышечной ткани на длительное введение высокой дозы симвастатина (зокора) / Е.В. Виноградова, Е.С. Белоусова, И.А. Семенец // 5 итоговая сессия молодых ученых РостГМУ (Ростов н/Д, 11 апреля 2018г.) : сборник матер. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2018. – С. 60-62.

18. Некоторые особенности морфо-молекулярной перестройки мышечной ткани крыс после длительного введения симвастатина / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, Е.В. Виноградова [и др.] // XVII росс. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д, 17 мая 2018г.) : матер. конф. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2018. – С. 126-129.

19. Микашинович, З.И. Структурно-метаболические изменения в мышцах лабораторных животных с эссенциальной гиперхолестеринемией после длительного приема симвастатина / З.И. Микашинович, Е.С. Белоусова, Е.В. Виноградова // XVIII росс. науч.-практ. конф. с международ. участ. «Обмен веществ при адаптации и повреждении» (Ростов н/Д, 25 мая 2019г.) : матер. конф. – Ростов н/Д: Изд-во РостГМУ, 2019. – С. 156-159.

20. *Микашинович, З.И. Влияние статинов (зокора) на кислородзависимые процессы в мышечной ткани и эритроцитах животных с гиперхолестеринемией / З.И. Микашинович, Е.В. Виноградова, Е.С. Белоусова // АСТА BIOMEDICA SCIENTIFICA. – 2019. – Т.4. – №3. – С.110-116.

* – работа опубликована в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2,3-ДФГ	- 2,3-дифосфоглицерат
АОЗ	- антиоксидантная защита
ГМГ-КоА	- 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент А
ГПО	- глутатионпероксидаза
ГХ	- гиперхолестеринемия
НЗР	- нормальный закон распределения
ПВК	- пировиноградная кислота
СОД	- супероксиддисмутаза
ХС	- холестерин
GSH	- восстановленный глутатион
Нб	- гемоглобин