

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи

Синицына Дарья Андреевна

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКОГО
ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ У КРЫС**

Специальность 1.5.4. - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор Попова Т.Н.

Москва 2024

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Токсическое поражение печени.....	17
1.1.1. Этиопатогенез токсического поражения печени	18
1.1.1.2. Роль окислительного стресса в развитии токсического поражения печени.....	18
1.1.1.3. Реализация апоптотических процессов при патологиях печени.....	22
1.1.1.4. Роль некроза в развитии токсического гепатита	25
1.1.1.5. Роль воспалительных процессов в развитии токсического поражения печени	25
1.2. Антиоксидантная система защиты организма	30
1.2.1. Регуляция антиоксидантных ферментов на уровне транскрипции	34
1.3. Современные методы фармакологической коррекции токсических поражений печени	38
1.4. Биологическая активность дигидрохинолиновых производных	42
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	47
2.1. Объект исследования	47
2.2. Создание модели экспериментального токсического поражения печени	47
2.3. Подготовка материала для исследования	48
2.4. Анализ биологической активности и токсичности соединений	49
2.5. Измерение ферментативной активности	49
2.5.1. Определение активности аспаратаминотрансферазы.....	50
2.5.2. Определение активности аланинаминотрансферазы	50
2.5.3. Определение активности гамма-глутамилтранспептидазы.....	51
2.5.4. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно- восстановительными превращениями НАД и НАДФ	51

2.5.4.1. Определение активности глутатионредуктазы	52
2.5.4.2. Определение активности глутатионпероксидазы.....	52
2.5.4.3. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы	53
2.5.4.4. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	53
2.5.5. Определение активности каталазы.....	53
2.5.6. Определение активности супероксиддисмутазы.....	54
2.5.7. Определение активности аконитатгидратазы	55
2.5.8. Определение активности глутатионтрансферазы.....	56
2.5.9. Выделение и очистка глутатионпероксидазы	56
2.6. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.....	57
2.6.1. Определение содержания цитрата.....	57
2.6.2. Определение концентрации восстановленного глутатиона	58
2.6.3. Определение содержания α -токоферола.....	59
2.7. Оценка оксидативного статуса	59
2.7.1. Определение содержания диеновых конъюгатов	59
2.7.2. Оценка окислительной модификации белков	60
2.7.3. Определение интенсивности биохемилюминесценции	61
2.8. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции	62
2.9. Определение активности миелопероксидазы.....	62
2.10. Оценка активности каспаз.....	63
2.11. Оценка уровня транскриптов генов	63
2.12. Гистологические исследования	66
2.13. Иммунофлуоресцентное окрашивание	66
2.14. Статистическая обработка экспериментальных данных	67
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ.....	68
3.1. Поиск дигидрохинолиновых производных с целевой биологической активностью	68

3.2. Воздействие дигидрохинолиновых производных на маркерные показатели развития токсического поражения печени у крыс	69
3.3. Анализ морфологических изменений в печени крыс при развитии токсического поражения печени и воздействии дигидрохинолиновых производных	72
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ.....	75
4.1. Влияние дигидрохинолиновых производных на интенсивность биохемилюминесценции в печени и сыворотке крови крыс с токсическим поражением печени.....	75
4.2. Окислительная модификация белков в печени и сыворотке крови крыс при введении 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне индукции тетрахлорметанового повреждения печени.....	77
4.3. Содержание диеновых конъюгатов в печени и сыворотке крови крыс при введении 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне индукции тетрахлорметанового повреждения печени.....	81
4.4. Воздействие 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в печени и сыворотке крови крыс при индукции тетрахлорметанового повреждения печени.....	83
ГЛАВА 5. ИНТЕНСИВНОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ И ВВЕДЕНИИ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА И 1-БЕНЗОИЛ-6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА	90
ГЛАВА 6. ВОЗДЕЙСТВИЕ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА И 1-БЕНЗОИЛ-6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС	97
ГЛАВА 7. ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ	101

7.1. Исследование функционирования супероксиддисмутазы и каталазы у крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин	102
7.2. Функционирование глутатионовой антиоксидантной системы и содержание α -токоферола у крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин	109
7.3. Очистка и исследование некоторых каталитических свойств глутатионпероксидазы из печени крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших дигидрохиолиновое производное.....	118
7.4. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при тетрахлорметановом поражении печени у крыс	124
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	128
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	138
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	164
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	165

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АГ – аконитатгидратаза
- АлАТ – аланинаминотрансфераза
- АМФ – аденозинмонофосфат
- АОС - антиоксидантная система
- АсАТ – аспартатаминотрансфераза
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- БХЛ – биохемилюминисценция
- Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
- ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза
- ГП – глутатионпероксидаза
- ГР – глутатионредуктаза
- ГТ - глутатионтрансфераза
- ДГХ1– 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин
- ДГХ2 – 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин
- ДК – диеновые конъюгаты
- ИДГ – изоцитратдегидрогеназа
- ЛД 50 – летальная доза
- МДА – малоновый диальдегид
- НАД - никотинамидадениндинуклеотид
- НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат
- НАДФ-ИДГ – НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный
- ОМБ – окислительная модификация белков
- ОС – окислительный стресс

ПОЛ – пероксидное окисление липидов
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
СОД – супероксиддисмутаза
ТАЕ-буфер – трис-ацетат-ЭДТА буфер
ТЕ-буфер – трис-ЭДТА буфер
ТМБ – 3,3',5,5'- тетраметилбензидин
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ТПП – токсическое поражение печени
УДХК – урсодезоксихолевая кислота
ФАД – флавинадениндинуклеотид
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
AIF – фактор, индуцирующий апоптоз
ANOVA – Analysis of Variation, дисперсионный анализ
APAF-1 – фактор активации апоптотической протеазы
ARE – antioxidant response element, элементы антиоксидантного ответа
ASC – центральный адаптерный белок инфламмосомы
Bcl 2 – B-Cell Leukemia/Lymphoma 2, семейство белков-медиаторов апоптоза
CD40 – белок надсемейства рецептора факторов некроза опухоли
COX2 – циклооксигеназа-2
Cys – цистеин
CREB – cAMP-response element-binding protein, транскрипционный фактор, связывающийся с CRE-последовательностями ДНК
DAMPs – damage-associated molecular patterns, молекулярные структуры, связанные с повреждением
EEDQ2 – N-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохиолин
FAS – белок надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли
FOXO – forkhead box protein O
GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный
HO₂ · – пероксильный радикал
IC 50 – концентрация полумаксимального ингибирования
IFN-γ – интерферон-гамма
IL – интерлейкины
КС – клетки Купффера
MOMP – главный белок наружной мембраны
NF-κB – ядерный транскрипционный фактор, усилитель каппа-легкой цепи активированных В-клеток
NK – естественные киллеры
NKT – Т-клетки-естественные киллеры
NLRP3 – NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
Nrf2 – ядерный транскрипционный фактор эритроидного происхождения
p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл
PAMPs – pathogen associated molecular patterns, патогенетически ассоциированные молекулярные структуры
PASS – prediction of activity spectra for substances, прогнозирование спектров активности веществ
PROTOX – *in silico* прогноз фармакологической активности, острой токсичности и биодоступности
RIP – receptor interacting protein, киназы рецепторного взаимодействующего белка
RTK – тирозинкиназный рецептор RTK
Tf-LP-EEDQ2 – конъюгированные с трансферрином липосомы, содержащие N-Этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолин
tgα2 – тангенс угла наклона касательной к кривой биохемилюминесценции
TLR4 – Toll-like receptor 4, толл-подобный рецептор 4
TNF-α – фактор некроза опухоли α
TNFR1 – рецептор семейства TNF

S – светосумма биохемилюминесценции

SeP – селенопротеин P

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. За последнее десятилетие были предприняты значительные усилия по борьбе с заболеваниями печени, но, несмотря на это, они остаются одной из острых проблем биомедицины [196], занимая второе место среди причин смерти от желудочно-кишечных заболеваний после колоректального рака [153]. Как известно, печень является центральным органом в метаболизме поступающих в организм лекарств и других химических соединений. Злоупотребление алкоголем, приём наркотических средств, вирусные инфекции и использование ряда лекарственных средств могут вызвать повреждение печени, причем гепатотоксичность является наиболее часто встречающимся побочным эффектом лекарственных препаратов, приводящем к их отмене [125, 159].

Ксенобиотики, в частности, такие промышленные поллютанты, как тетрахлорметан (CCl_4), метаболизируются в печени с образованием чрезмерного количества свободных радикалов, которые окисляют широкий ряд клеточных макромолекул различных классов, вызывая окислительный стресс [64]. Защиту печени от окислительного стресса осуществляет антиоксидантная система (АОС) [53, 144]. Значимую роль в её регуляции играют редокс-чувствительные транскрипционные факторы, одним из важнейших среди которых является Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), способный активировать ARE (antioxidant response element)-содержащие гены антиоксидантов и ферментов метаболизма ксенобиотиков [86].

Активизация свободнорадикального окисления, вызванная CCl_4 , сопровождается синтезом воспалительных цитокинов и развитием воспалительной реакции [120, 84], контроль которой осуществляет ядерный транскрипционный фактор карпа В (NF- κ B) [211]. Регулятором воспалительного ответа выступает также NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin

domain-containing protein 3)-инфламмосома, обеспечивающая созревание каспазы-1 и интерлейкина-1 β , который, в свою очередь, индуцирует синтез остальных провоспалительных интерлейкинов [106]. Кроме этого, образующиеся в печени при трансформации ксенобиотиков активные формы кислорода (АФК) могут вызывать апоптоз митохондриально-зависимыми и внешними путями, который сопровождается активацией каспаз, нуклеаз, расщеплением клеточных белков и конденсацией хроматина [128].

Ключевым вопросом в защите от токсического воздействия ксенобиотиков на клетки печени является поиск наиболее эффективных гепатопротекторных средств. Несмотря на большое количество существующих гепатопротекторов, все они имеют ряд недостатков, включая низкую биодоступность, необходимость длительного приёма, побочные реакции со стороны желудочно-кишечного тракта, прооксидантный эффект и другие [61, 182, 146, 209]. Интерес с точки зрения наличия гепатопротекторной активности вызывают дигидрохинолиновые производные, к которым, в частности, относится этоксихин (6-этокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин), обладающий противоопухолевым [131] и антиоксидантным действием [108]. Тем не менее, вследствие способности этоксихина проявлять ряд негативных эффектов [163, 40], его применение в качестве гепатопротектора для людей оказалось нецелесообразным. В ходе проведённого анализа *in silico* было обнаружено, что среди производных дигидрохинолина существуют более перспективные соединения-кандидаты в предшественники лекарственных средств с наиболее высокой антиоксидантной и гепатопротекторной активностью. Так, нами был отобран и протестирован в качестве гепатопротектора при CCl₄-индуцированном поражении печени 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин (ДГХ1). В ходе настоящей работы мы исследовали также аналог ДГХ1 – 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин (ДГХ2), полученный путём введения бензоильной группы к атому азота гидрохинолинового цикла, что

должно повысить безопасность соединения посредством блокирования его участия в реакциях образования токсичных метаболитов. Таким образом, нами был проведен анализ гепатопротекторного потенциала ДГХ1 и ДГХ2, а также оценено воздействие данных соединений на основные патогенетические механизмы токсического поражения печени (ТПП) у крыс, вызванного введением СС14.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование воздействия ДГХ1 и ДГХ2 на маркерные показатели повреждения гепатоцитов, интенсивность свободнорадикальных, воспалительных и апоптотических процессов, а также регуляцию функционирования АОС при СС14-индуцированном ТПП у крыс.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Прогнозирование биологической активности дигидрохинолиновых производных, оценка их воздействия на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов у крыс с индуцированным ТПП, а также гистологическое исследование морфологии ткани печени у животных при развитии патологии и введении тестируемых соединений.

2. Анализ активности процессов свободнорадикального окисления на фоне введения ДГХ1 и ДГХ2 крысам с экспериментальным ТПП.

3. Анализ интенсивности воспалительных процессов и их NLRP3-опосредованной регуляции при ТПП и введении дигидрохинолиновых производных.

4. Оценка активности апоптотических процессов в печени крыс, получавших тестируемые соединения на фоне ТПП.

5. Исследование активности и некоторых свойств ферментов АОС, концентрации неферментативных антиоксидантов, а также активности основных ферментов-поставщиков НАДФН для восстановления окисленного

глутатиона у крыс при развитии ТПП и введении дигидрохинолиновых производных.

6. Анализ уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов, а также факторов транскрипции Nrf2 и FOXO1 (forkhead box O1) в печени животных с патологией, подвергнутых введению ДГХ1 и ДГХ2.

Научная новизна. Впервые проведено исследование воздействия ДГХ1 и ДГХ2 на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов и морфологию ткани печени, интенсивность процессов свободнорадикального окисления, апоптоза, воспалительного ответа и NLRP3-опосредованную сигнальную трансдукцию, транскрипционную регуляцию функционирования АОС и активность НАДФН-генерирующих ферментов при экспериментальном ТПП у крыс.

Продемонстрировано снижение интенсивности свободнорадикального окисления в печени и сыворотке крови крыс с индуцированным ТПП под действием тестируемых дигидрохинолиновых производных. Было установлено, что уменьшение активности свободнорадикальных процессов под действием протекторов сопровождалось торможением воспалительного ответа, степени активации NLRP3-инфламмосомы, каспазы-1 и интерлейкина 1 β , а также смягчением выраженности апоптоза. Выявлено позитивное воздействие дигидрохинолиновых производных на функционирование АОС при ТПП, выражающееся в изменении показателей активности антиоксидантных ферментов, уровня мРНК их генов и концентрации ферментативных антиоксидантов в направлении контрольных значений. Для ДГХ2 была также показана способность индуцировать транскрипцию ряда генов антиоксидантных ферментов, что могло вносить вклад в снижение уровня окислительного стресса у животных с патологией. Установлено, что ДГХ1 и ДГХ2 проявляют более выраженную по сравнению с использовавшимся в качестве препарата сравнения карсиллом гепатопротекторную, антиокислительную и противовоспалительную

активность, а также способность регулировать антиоксидантный ответ в условиях оксидативного стресса.

Практическая значимость. Результаты исследования способствуют углублению представлений о возможности регуляции механизмов патогенеза поражений печени токсического характера. Полученные данные также вносят вклад в понимание путей коррекции воспалительных, апоптотических процессов и антиоксидантного ответа при окислительном стрессе и действии веществ-протекторов дигидрохинолинового ряда. Полученные данные о гепатопротекторной активности ДГХ1 и ДГХ2 могут служить базой для создания новых терапевтических средств, направленных на лечение и профилактику острых поражений печени. Используемые в ходе выполнения данной работы подходы могут также представлять интерес для клинической лабораторной диагностики в качестве методов мониторинга показателей состояния оксидативного статуса при патологиях печени и проведении их лечения.

Результаты работы применяются в учебном процессе на медико-биологическом и фармацевтическом факультетах Воронежского государственного университета. В частности, материалы работы используются при чтении таких курсов, как «Биологическая химия», «Свободнорадикальные процессы в биосистемах», «Интеграция обменных процессов в организме», «Ферментативная регуляция и контроль генной активности», «Патобиохимия» и других. Материалы работы используются также при проведении спецпрактикумов, выполнении студентами курсовых и выпускных квалификационных работ.

Методология и методы диссертационного исследования. В ходе выполнения работы использовались современные биохимические, молекулярно-биологические методы.

Достоверность полученных результатов. Выводы по результатам работы и научные положения, выдвигаемые на защиту, основаны на

экспериментальных данных, полученных с применением адекватных методов физико-химической и молекулярной биологии и математического анализа, а также проанализированных с привлечением теоретической базы, представленной в современной научной литературе. Таким образом, результаты исследования являются статистически значимыми и воспроизводимыми.

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы были представлены на 7-й международной научно-методической конференции «Фармообразование-2018» (Воронеж, 2018); международной научно-практической конференции «Научные исследования в современном мире: опыт, проблемы и перспективы развития» (Уфа, 2019); международной научно-практической конференции «Инновационные научные исследования: теория, методология, тенденции развития» (Уфа, 2019); международной научной конференции «Технические и естественные науки» (Санкт-Петербург, 2020); международной научной конференции «Science. Research. Practice» (Санкт-Петербург, 2020); международной научной конференции «Высокие технологии и инновации в науке» (Санкт-Петербург, 2021).

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах исследования, включая сбор и анализ литературных данных, планирование и проведение экспериментов, интерпретацию полученных результатов и их оформление. Подготовка основных публикаций по теме диссертации проводилась совместно с соавторами и научным руководителем автора.

Публикации

Основные результаты работы изложены в 16 публикациях, из них 5 – в отечественных и зарубежных научных изданиях, входящих в перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Введение ДГХ1 и ДГХ2 крысам с CCl4-индуцированным ТПП приводило к снижению активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов и нормализации морфологии ткани печени, что свидетельствует о наличии у тестируемых соединений гепатопротекторных свойств.

2. Анализ показателей интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов, а также исследование активности воспалительного ответа и его NLRP3-опосредованной регуляции продемонстрировали, что в основе гепатопротекторного эффекта ДГХ1 и ДГХ2 лежат антиокислительные и противовоспалительные свойства данных соединений.

3. Антиокислительный эффект ДГХ1 и ДГХ2 был обусловлен их способностью регулировать функционирование АОС, выражавшейся в изменении активности антиоксидантных ферментов, уровня мРНК их генов и транскрипционных факторов Nrf2 и FOXO1, а также концентрации ферментативных антиоксидантов у крыс с ТПП.

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на 173 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (5 глав), заключения, выводов, списка литературы (216 источника). Иллюстративный материал включает 7 таблиц и 24 рисунка, а также 1 таблицу и 8 рисунков в Приложении.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Токсическое поражение печени

Среди заболеваний, характеризующихся высокой социально-экономической значимостью, одно из ведущих мест занимают болезни печени. В качестве причин патологии данного органа часто отмечают широкое использование продуктов химической промышленности, злоупотребление алкоголем, некорректное применение фармацевтических препаратов [160], профессиональные вредности и др. [80].

Токсическое поражение печени объединяет ряд заболеваний, развитие которых обусловлено воздействием на орган физических или химических факторов. К химическим факторам относят некоторые препараты, такие как противотуберкулезные фармацевтические средства, статины, антикоагулянты из группы производных кумарина, анаболические стероиды, андрогены, эстрогены, антиретровирусные и противоопухолевые средства, а также ряд ненаркотических анальгетиков, в том числе ацетаминофен, нимесулид. Развитие лекарственно-индуцированного токсического поражения в печени опосредовано сдвигами кальциевого гомеостаза, активацией пероксидного окисления липидов (ПОЛ), нарушением работы митохондрий. Данные процессы инициируют повреждение и гибель клеток печени.

В странах Западной Европы число летальных случаев при острых лекарственно-индуцированных гепатитах составляет около 12% от показателя общей смертности, в России – около 5% [8]. Усугубляет ситуацию тот факт, что до сих пор не созданы специфические лабораторно-диагностические тесты для выявления лекарственного поражения печени. Как следствие, медицинские специалисты не имеют общего подхода к лечению подобных патологий.

Поражения печени, вызванные злоупотреблением алкоголя, в России являются основным типом бытового отравления. На их долю приходится

около 14% летальных исходов в структуре общей смертности взрослого населения страны, что существенно выше данных показателей в Европейских странах [161, 213].

Немаловажной является проблема заболеваний печени, выделенных в группу профессиональных токсических гепатитов. До настоящего времени в промышленности используют вещества, обладающие прямым гепатотропным действием. К их числу относят бензол и его производные, тяжелые металлы, пестициды, хлорированные и ароматические галогенированные углеводороды. Отравление промышленным ядом способно индуцировать токсическое поражение печени агрессивного характера. Не смотря на активные исследования, касающиеся патологий гепатоцеллюлярной системы, на мировом фармацевтическом рынке не представлен гепатопротектор, который бы соответствовал всем требованиям, предъявляемым к данному типу препаратов [28].

1.1.1. Этиопатогенез токсического поражения печени

1.1.1.2. Роль окислительного стресса в развитии токсического поражения печени

Токсическое поражение печени, вне зависимости от этиологии вызвавших его факторов, характеризуется такими признаками, как гипертрофические изменения в гепатоцитах, активация мононуклеарной фагоцитарной системы, появление звёздчатых и увеличение количества синусоидальных клеток, а также сбой микроциркуляции и миграция лейкоцитов [170].

Разрушение гепатоцитов сопровождается значительным повышением активности в сыворотке крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ), что является широко используемым параметром для выявления заболеваний печени, а также для оценки

эффективности выбранной терапии. Кроме того, данные маркеры имеют прогностическое значение для пациентов с вирусом гепатита В и С, неалкогольным стеатогепатитом, аутоиммунным гепатитом. Активность АсАТ и АлАТ коррелирует с показателями смертности от заболеваний печени в мировой популяции. В здоровой печени гибель и регенерация клеток находятся в равновесии. При этом приблизительно 0,05% гепатоцитов в норме постоянно погибают апоптотическим путем [141, 127], что не приводит к обнаруживаемому изменению активности АлАТ. На гистологическом уровне острое поражение печени проявляется некрозом, дистрофическими изменениями и апоптозом гепатоцитов, а также развитием холестаза [207, 16].

Основными патогенетическими механизмами при токсическом поражении печени являются воспаление, митохондриальная дисфункция и окислительный стресс, характеризующийся усилением процессов ПОЛ, окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза в гепатоцитах сопряжено также с активизацией системы микросомального окисления, в том числе цитохрома P450. Кроме этого, патогенез токсического поражения печени связан с избыточной выработкой внеклеточного матрикса, что делает вероятным развитие фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы.

Усиление пероксидного окисления липидов (ПОЛ) вызывает деструкцию мембран клеток, повышает их проницаемость и, как следствие, нарушает работу клеточных рецепторов и мембраносвязанных ферментов. В результате подобных изменений возникает сбой в работе митохондрий с последующим разобщением окисления и фосфорилирования, что ведет к снижению образования аденозинтрифосфата (АТФ) [88]. Нарушение работы дыхательной цепи приводит к усилению генерации АФК, и тем самым увеличивает скорость накопления мутаций ДНК, что, в свою очередь, ведёт к ещё большим нарушениям работы дыхательной цепи [188]. Известно, что активные формы кислорода (АФК) окисляют тиоловые группы Cys-56 белка-

антипортера АТФ/АДФ во внутренней митохондриальной мембране, что способствует образованию неспецифического канала, через который могут проникать низкомолекулярные соединения [113]. АФК, помимо прочего, оказывают влияние на концентрацию ионов кальция в цитоплазме клеток и митохондриальном матриксе. В частности, увеличение уровня АФК способствует проникновению ионов кальция в цитоплазму из внутриклеточных депо и внеклеточного пространства, тогда как транспорт кальция из цитоплазмы в матриксы митохондрий осуществляется за счёт кальциевых транспортеров [191].

На сегодняшний день имеются сведения, что АФК являются не только побочными продуктами окислительного метаболизма, но и способны использоваться в качестве сигнальных молекул для регулирования клеточных процессов, включая апоптоз. Подтверждением выступают выводы о том, что клеточные антиоксиданты, такие как глутатион и тиоредоксин, не только служат для поддержания стационарных уровней АФК, но и действуют как обратимые окислительно-восстановительные модуляторы функции ферментов [178, 14]. Важным последствием изменения редокс-статуса клетки и АФК-опосредованной сигнализации является активация транскрипционных факторов. Данные белки находятся в стационарном состоянии до тех пор, пока не произойдёт их высвобождение от молекулы-ингибитора. После этого транскрипционные факторы становятся способны связываться с ДНК и активировать соответствующие гены. Среди белков, гены которых находятся под регуляцией редокс-чувствительных транскрипционных факторов, важными являются ферменты антиоксидантной защиты, белки теплового шока и другие белки быстрого адаптивного ответа, которые могут синтезироваться под воздействием стрессовых условий [68].

Основным механизмом, за счет которого пероксид водорода выполняет сигнальную функцию, является посттрансляционная модификация белков. Окислению подвергаются, как правило, тиоловые группы цистеина. В одних

случаях продукты подобных реакций блокируют важные каталитические аминокислотные остатки, ингибируя функцию белка, в других – модификации в белке-мишени изменяют его конформацию или его взаимодействие с молекулами. При недостаточности систем окислительной защиты возможен запуск механизмов клеточной гибели. Так, например, при обработке фибробластов человека *in vitro* сублетальными дозами пероксида водорода наблюдалась полная и необратимая остановка их пролиферации [152], некоторая часть клеток переходила к апоптозу. Были найдены и идентифицированы несколько специфических мишеней, регулируемых пероксидом водорода, что также типично для вторичных посредников. Одними из наиболее хорошо охарактеризованных мишеней пероксида водорода являются тирозиновые фосфатазы – ферменты, осуществляющие гидролиз связанных с остатками тирозина фосфатных групп у многих белков [192]. Фосфорилирование по остаткам тирозина является основным событием в активации тирозинкиназных рецепторов (РТК) при стимуляции фактором роста [192].

При протекании процессов ПОЛ образуются эндогенные электрофильные соединения, среди которых большое значение в клетке имеют карбонилы, в частности, малоновый диальдегид (МДА). МДА способен взаимодействовать с белками и молекулами ДНК с образованием аддуктов и последующим повреждением клеток и тканей [150]. В реакциях с аминокислотами МДА образует основания Шиффа, которые, накапливаясь, нарушают структуру клеточных мембран. При высокой интенсивности процессов ПОЛ взаимодействие МДА-аддуктов с эукариотическим фактором элонгации 2 способно привести к заметному снижению биосинтеза белка [200]. Известно также, что основным МДА-связывающим белком является фактор комплемента Н. Данный белок выполняет регулируемую функцию альтернативного пути активации комплемента в плазме, блокируя либо поглощение МДА-модифицированных

белков макрофагами, либо МДА-индуцированные провоспалительные эффекты. МДА-модифицированные белки, генерируя новые специфические для окисления эпитопы, которые присутствуют на поверхности апоптотических клеток и выделяемых из них пузырьков, распознаются как сигналы опасности врожденным иммунитетом [183]. Выяснение молекулярных механизмов, за счет которых окислительное повреждение опосредует активацию иммунной системы, способствует поиску новых диагностических и терапевтических подходов при различных патологиях.

1.1.1.3. Реализация апоптотических процессов при патологиях печени

Апоптоз является контролируемой асинхронной клеточной гибелью и состоит из шести этапов. Первым является индукция, или запуск апоптоза, в котором участвуют различные клеточные органеллы. Далее происходит активация проапоптотических белков. Третьим этапом является активация каспаз – цистеиновых протеаз, играющих значительную роль в регуляции выживания или гибели клеток, а также в воспалении, делении и дифференцировке [56]. Следующими друг за другом этапами в реализации программы апоптоза являются распад элементов цитоскелета, фрагментация клетки на апоптотические тельца и подготовка фрагментов к фагоцитозу макрофагами или соседними клетками. При этом не нарушается нормальное функционирование расположенных рядом клеток. Апоптоз является общей особенностью вирусных, холестатических, жировых и алкогольных заболеваний печени. Данный процесс считается невоспалительным или слабовоспалительным из-за быстрого удаления апоптотических телец, что предотвращает утечку деструктированного клеточного содержимого [123].

В зависимости от того, является ли инициирующий фактор внутренним или внешним для клетки, реализация апоптоза может осуществляться по механизмам внутреннего и внешнего пути. В обоих случаях активация

эффекторных каспазы-3 и каспазы-7 приводит к протеолизу, пикнозу и кариорексису, которые являются классическими морфологическими особенностями апоптоза.

Ряд цитокинов, например, фактор некроза опухоли (TNF- α), интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-10 (IL-10), способны запустить апоптоз. Однако, характер действия данных веществ является дозозависимым и определяется также степенью пролиферации и функциональной активностью клеток – мишеней. К настоящему времени механизмы проапоптотического действия цитокинов окончательно не выяснены. Среди факторов, опосредующих воздействие цитокинов на клетку, важное место отводят редокс-статусу клетки-мишени, который определяется, главным образом, интенсивностью внутриклеточного образования АФК и функциональным состоянием митохондрий [175, 21].

Внешний путь апоптоза обычно запускается представителями семейства TNF, включающего TNF- α , а также член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (FAS). TNF секретируются моноцитами, нейтрофилами, Т-клетками, а также клетками эндотелия, нейрочитами. В печени TNF- α , помимо секреции гепатоцитами, выделяется также звёздчатыми клетками Купфера и адипоцитами [105]. Белок FAS, также называемый CD95 или APO-1, является поверхностным белком. FAS содержит одиночную трансмембранную область и индуцирует гибель клеток путем связывания с FAS-лигандом семейства TNF [105]. FAS-лиганд экспрессируется конститутивно, однако его синтез усиливается в случаях холестаза, токсических и вирусных гепатитах, алкогольной болезни печени. При аутоиммунном, вирусном гепатите, алкогольной болезни печени, D-галактозамин- и липополисахарид-индуцированных острых повреждениях печени, а также при синдроме ишемии/реперфузии наблюдается индукция синтеза TNF- α . Гибель гепатоцитов некротическим или апоптотическим путем приводит к неполной регенерации печени и формированию фиброза [79].

Внутренний путь активации апоптоза предполагает участие митохондрий и опосредованного каспазой-8 расщепления белков Bid (агонист смерти взаимодействующего домена BH3), Bcl2 (В-клеточной лимфомы 2). Расщепленные Bid (tBid) и Bim (взаимодействующий с Bcl-2 медиатор клеточной смерти) активируют проапоптотические члены семейства Bcl2, Bax (Bcl-2-ассоциированный X белок) и Bak (антагонист Bcl2/killer 1), приводящие к повышению содержания главного белка наружной мембраны (MOMP) и высвобождению межмембранных белков, таких как цитохром С [31]. Выход цитохрома С активирует апоптосому, высвобождая фактор-1, активирующий апоптотическую пептидазу (APAF-1) [57]. Затем АРАФ-1 образует колесообразную структуру, называемую апоптосомой, которая способствует самоактивации каспазы 9, расщепляющей, в свою очередь, эффекторные прокаспазы и запускающей апоптоз. В печени внешние и внутренние пути связаны, так как оба они ведут к активации каспазы-3. В реализации апоптоза по митохондриальному пути задействован и белок AIF (апоптоз-индуцирующий фактор), вызывающий каспазозависимую фрагментацию ДНК. Белок p53 способен регулировать данный путь апоптоза через влияние на семейство Bcl2 [172].

Активация CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов и цитокинов приводит к иммуноопосредованному уничтожению гепатоцитов. Данные Т-клетки способны распознавать антигены в комплексе с собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) и в значительной степени ответственны за апоптоз клеток печени. Однако другие иммунные клетки, такие как естественные киллеры (NK), Т-клетки-естественные киллеры (NKT) и клетки Купффера (КС), также вносят свой вклад. Когда рецепторы смерти активируются соответствующими лигандами, они олигомеризуются и рекрутируют адаптерные белки, способные рекрутировать предшественников каспаз в свои цитоплазматические домены [186].

1.1.1.4. Роль некроза в развитии токсического гепатита

При токсическом гепатите некроз является одной из форм гибели гепатоцитов на фоне воспаления. Некроз представляет собой набухание клеток, образование мембранных пузырьков и, в конечном итоге, разрыв плазматической мембраны. Высвобождение клеточных компонентов из некротических клеток индуцирует воспалительную реакцию. Некроз характеризуется онкотическим лизисом, вызванным потерей ионного гомеостаза в результате тяжелой дисфункции митохондрий и глубокого истощения АТФ. На данный момент уже существуют доказательства, которые показывают, что некроз возможно регулировать [51].

Было установлено, что связывание TNF с одним из своих рецепторов, TNFR1, индуцирует как апоптотический, так и антиапоптотический сигналы. Так, например, возможно ингибирование апоптоза по причине истощения АТФ, что приводит к переходу гибели клеток по некротическому пути. Для классификации данного типа клеточной смерти используется много терминов, таких как некроптоз, запрограммированный некроз, регулируемый некроз. Он включает активацию взаимодействующих с рецепторами протеинкиназ 9, 10, 1 и 3 (RIP1 и RIP3) и участие митохондрий [51]. Этот вариант гибели клеток вовлечён в патофизиологию многих заболеваний, таких как острый панкреатит, черепно-мозговая травма и вирусная инфекция.

1.1.1.5. Роль воспалительных процессов в развитии токсического поражения печени

В развитии патологических изменений печени при интоксикации CCl_4 воспалительные процессы играют решающую роль. Выполняющие роль

макрофагов КС активируются и быстро высвобождают провоспалительные цитокины, такие как TNF- α и IL-1 β . Эти цитокины играют важную роль в сложной сети, участвующей в регуляции воспалительных реакций. Ингибирование высвобождения провоспалительных цитокинов представляет собой целесообразную терапевтическую стратегию для уменьшения воспаления и повреждения печени [185].

Важным механизмом в реализации воспалительного ответа является активация NLRP3 (пириновый домен семейства NLR, содержащий белок 3) инфламмосомы. Инфламмосомы представляют собой мультипротеиновые комплексы, локализованные в цитоплазме клетки. Роль инфламмосом заключается в контроле за созреванием провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β и IL-18, и активацией пироптоза.

Инфламмосомы содержат центральный адаптерный белок ASC, который связан с каспазой-1. ASC включает два домена: пириновый домен (pyrin domain), а также активирующий и усиливающий каспазный домен (caspase activation and recruitment domain – CARD). ASC обеспечивает АТФ-зависимую индукцию в макрофагах каспазы-1, которая, в свою очередь, приводит к созреванию интерлейкина-1 β и интерлейкина-18, регулирующих локальный и системный воспалительный ответ. Большинство известных на настоящее время инфламмосом имеют в своём составе помимо ASC белки NLRP, отвечающие за распознавание антигенов внутри клеток. NLRP3 вместе с адаптерным белком ASC формируют комплекс, активирующий каспазу-1. Сборка данного комплекса происходит под действием определённых стимулов, таких как бактериальные токсины, микрочастицы асбеста, кристаллы кремния, пирофосфата кальция, моноурата натрия и других, а также индуцируется сдвигами pH цитоплазмы. Было продемонстрировано, что активация NLRP3 инфламмосомы играет существенную роль в защите организма против патогенов, включая вирусные инфекции, а также в

реализации противоопухолевого иммунитета, особенно в условиях химиотерапии [93].

Агенты, способные вызывать активацию и сборку инфламмасом, относятся к группе соединений, называемых патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) и молекулярными паттернами, связанными с повреждением (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Среди PAMPs встречаются такие вещества, как липополисахариды бактериального происхождения или РНК вирусов, а к DAMPs относятся внеклеточные белки теплового шока, мочевая кислота, АТФ и др. [45, 96].

Инфламмасы подразделяют на две основные группы: канонические и неканонические. Канонические включают инфламмасому AIM2 и семейство NLR, такие как NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12 и NLRC4. Неканонические, или нестандартные, инфламмасы включают каспазу-11 мыши и человеческие гомологи каспазы-11, то есть каспазы-4 и -5 инфламмасы.

Стимулирует высвобождение IL-1 β макрофагами и нейтрофилами активированный транскрипционный фактор NF- κ B (ядерный фактор, усилитель каппа-легкой цепи активированных В-клеток). NF- κ B в макрофагах регулирует каспазо-1-зависимое созревание IL-1 β посредством увеличения активности антиапоптотических генов, в то время как в нейтрофилах образование зрелого IL-1 β зависит только от активности сериновых протеаз, ингибируемых продуктами NF- κ B-зависимых генов. Было показано, что в условиях экспериментального артрита и перитонита сериновые протеазы, включая протеиназу-3 и эластазу, в нейтрофилах и тучных клетках реализуют каспазо-1-независимую активацию IL-1 β [82].

В регуляции функционирования инфламмасом могут быть задействованы внеклеточные и внутриклеточные механизмы [78]. Внеклеточные активаторы инфламмасом регулируют восприимчивость иммунных клеток к инфламмасомным триггерам и действуют через

цитокиновые рецепторы, связывание которых с лигандами запускает транскрипцию генов NLRP3. Кроме этого, экспрессия генов NLRP3 может быть активирована в результате деубиквитинирования NLRP3 под действием PAMPs-опосредованной стимуляции, сопряжённой с увеличением генерации АФК [82, 97]. Отрицательная регуляция активности инфламмасом реализуется по механизму отрицательной обратной связи и запускается такими факторами, как воздействие лиганда CD40, экспрессированного на несущих CD4+ эффекторных Т-лимфоцитах и клетках памяти. К снижению активности инфламмасом также приводят интерфероны, опосредующие торможение образования IL-1 β и IL-18 [92]. Внутриклеточная регуляция активности инфламмасом зависит, главным образом, от содержания ионов калия и кальция. В частности, низкая внутриклеточная концентрация ионов калия способствует активации NLRP3 инфламмасы [116]. Так, внеклеточный АТФ является агонистом NLRP3 инфламмасы, поскольку он вызывает выход калия из клеток и образование каналов, пропускающих в клетку соединения-индукторы активности инфламмасом. К факторам активации NLRP3 инфламмасы относят также изменение осмотического давления. Снижение внутриклеточной концентрации калия и хлора сопровождается развитием дегидратации, которая приводит к высвобождению ионов кальция из депо, для которых мишенью выступает TGF- β -активируемая киназа-1, индуцирующая NLRP3 посредством деубиквитинирования. Наряду с этим, сдвиги в концентрации внеклеточного кальция могут способствовать снижению уровня циклического АМФ (цАМФ) посредством ингибирования аденилатциклазы, а также приводить к возрастанию содержания внутриклеточного кальция за счёт активации фосфолипазы С и формирования вторичных посредников, приводящих к мобилизации кальция из депо. Однако, к настоящему времени роль цАМФ в регуляции инфламмасы окончательно не выяснена [87].

Важной составляющей жизнеспособности клеток является их окислительно-восстановительное состояние, и многие клеточные сигнальные

пути регулируются редокс-чувствительными факторами. АФК способны активировать NLRP3 инфламмосомы посредством ряда сигнальных путей. Процесс аутофагии, который также находится под регуляцией АФК, выступает в качестве негативного модулятора активности инфламмосом и созревания IL-1 β . На основании этого была выдвинута гипотеза о регуляции активности инфламмосом с помощью аутофагии [73]. Данный процесс обеспечивает расщепление убиквитинилированных инфламмосом или про-IL-1 β . Кроме этого, аутофагия может тормозить активацию NLRP3 инфламмосом посредством лизиса поврежденных митохондрий и блокированием выхода в цитоплазму митохондриальных АФК и мтДНК [109].

Активация NLRP3 инфламмосомы может быть сопряжена с запуском пироптоза – формы провоспалительной запрограммированной гибели клеток в развитии заболеваний печени [208]. Механизм пироптоза существенно отличается от известных форм клеточной гибели по морфологическим и биохимическим особенностям. Инициация пироптоза начинается с распознавания молекул PAMPs и DAMPs. Рецепторы помогают транслировать внеклеточные сигналы в клетки. Последующая активация каспаз является ключевым этапом в реализации пироптоза. Активация каспазы-1 с помощью инфламмосомы NLRP3 приводит к расщеплению про-ИЛ-1 β и про-ИЛ-18 и продукции зрелых биологически активных цитокинов [169].

На сегодняшний день известно, что пироптоз может быть инициирован бактериями (*Shigella*, *Salmonella*, *Francisella*, *Legionella*) и неинфекционными факторами. Набухание клеток, их быстрый лизис, высвобождение цитоплазматического содержимого и воспалительных медиаторов являются отличительными чертами пироптоза [139]. Данная форма клеточной гибели участвует в иммунной защите организма от внутриклеточных бактериальных инфекций. В то же время, чрезмерная активация воспалительных клеток способна вызвать стерильное воспаление, что приводит к развитию таких заболеваний, как острый или хронический гепатит, фиброз печени.

Морфологически сходный с некрозом, пироптоз приводит к разрыву клеточной мембраны [37]. Однако при пироптозе не происходит истощения запасов АТФ, и АТФ-зависимые ионные насосы продолжают работу. Существуют данные, которые подтверждают идею о том, что активация воспаления, которая происходит в начале пироптоза, механически участвует в развитии и прогрессировании таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера [181], системной красной волчанки [129], катаракты [103], заболеваний печени [54], ишемии почек и диабете [124, 15]. Кроме того, развитие онкологических заболеваний связывают с пироптозом [215]. В результате пироптоза высвобождение IL-1 β и IL-18 и изменение врожденного иммунитета обеспечивают провоспалительное микроокружение, необходимое для развития опухоли.

1.2. Антиоксидантная система защиты организма

Избыточное производство АФК приводит к деструкции органелл и биомолекул, запуская воспалительный ответ, который является известным механизмом развития многочисленных заболеваний [135,1]. Для нейтрализации негативных последствий окислительного стресса живые организмы выработали антиоксидантную систему (АОС), включающую ферментативное звено – супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионпероксидазу (ГП) и др., а также неферментативные антиоксиданты, что обеспечивает поддержание интенсивности процессов свободнорадикального окисления на физиологическом уровне.

Главная функция низкомолекулярных антиоксидантов заключается в защите белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и биологических мембран от повреждающего действия свободных радикалов. Особенно важна роль низкомолекулярных антиоксидантов при остром окислительном стрессе, в условиях которого ферментативные антиоксиданты проявляют

недостаточную эффективность в результате быстрой инактивации под действием АФК [44]. Неферментативная антиоксидантная система представлена различными соединениями, среди которых важное значение имеют токоферолы, глутатион, аскорбат, цистеин, эрготионеин, витамин А, каротиноиды, убихиноны, а также витамины группы К [62, 21].

Токоферольные радикалы являются стабильными соединениями и не вступают в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами. Семейство витамина Е состоит из четырех токоферолов и четырех токотриенолов. Альфа-токоферол (α T) является преобладающей формой витамина Е в тканях, его дефицит приводит к атаксии у людей [135]. Результаты недавних исследований показывают, что другие формы витамина Е, такие как γ -токоферол (γ T), δ -токоферол и γ -токотриенол, обладают уникальными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, которые превосходят свойства α T в профилактике и лечении хронических заболеваний [47]. В отличие от α T, другие представители токоферолов и токотриенолов метаболизируются в карбоксихроманолы иницированным цитохромом P450 ω -окислением боковой цепи [50].

Немаловажной составляющей неферментативной части АОС является также аскорбиновая кислота [143]. Витамин С выступает в качестве донора при восстановлении окисленных форм токоферолов. Помимо этого, витамин С способен к самостоятельному взаимодействию с синглетным кислородом, гидроксильным радикалом и супероксид анион-радикалом, окисляясь до монодегидроаскорбиновой кислоты или дегидроаскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота способна дополнительно восстанавливать сосудистую чувствительность к вазоконстрикторам, сохранять эндотелиальный барьер, предотвращая апоптоз [143]. Витамин А, в частности, β -каротин, относится к гидрофобным антиоксидантам. Каротиноиды способны инактивировать $O_2^{\cdot-}$ и нейтрализовать продукты ПОЛ [44]. Имеются сведения, что витамин А благодаря наличию двойных связей в молекуле может вступать в

окислительно-восстановительные реакции с образованием пероксидов, которые индуцируют активность антиоксидантных ферментов. Считается также, что витамин А играет большую роль в регуляции работы островков Лангерганса поджелудочной железы. У мышей с ожирением прием витамина А приводил к снижению гипергликемии и гиперлипидемии [94].

Редокс-статус клетки обеспечивается группой тиоловых соединений, среди которых выделяют глутатион и тиоредоксин [112]. Глутатион (GSH), относящийся к серосодержащим трипептидным соединениям, способен нейтрализовать H_2O_2 . GSH используется в качестве субстрата фермента для глутатионпероксидазы (ГП), где он является восстановителем гидропероксидов, и глутатион-S-трансферазы (ГТ), которые конъюгируют GSH с электрофилами. GSH является важнейшим компонентом в составе антиоксидантной системы [180]. Антиоксидантные способности тиоредоксиновой системы заключены в восстановлении дисульфидных связей в белках, а также в предоставлении электронов для тиоредоксин-пероксидазы.

Супероксиддисмутаза (СОД) является важным ферментом защиты клеток от деструктивного действия супероксидного анион-радикала [151]. Данное семейство металлоферментов катализируют реакцию дисмутации $O_2^{\cdot-}$. СОД способна к взаимодействию с пероксидом водорода. В этом случае рассматриваемый фермент выступает в роли прооксиданта, инициируя генерацию супероксидного и гидроксильного радикалов [204,76]. Данный фермент отличается широкой распространенностью: изоформы СОД присутствуют во всех клеточных компартментах, в которых возможна генерация супероксидного радикала. У млекопитающих известно три изоформы фермента: цитозольная (Cu/Zn-СОД или СОД1), митохондриальная (Mn-СОД, или СОД2) и внеклеточная (СОД3). Изоферменты выполняют схожие функции, однако отличаются друг от друга по входящим в их состав металлам-кофакторам.

Значительную роль в блокировании разрушающего действия АФК играет разложение H_2O_2 до нетоксичных продуктов и H_2O , которое осуществляется при участии ферментов каталазы и ряда ГП [55].

Каталаза, наряду с СОД, является важнейшим деструктором АФК, представляет собой тетрамерный белок и является распространенным гемсодержащим энзимом, присутствующим, главным образом, в пероксисомах, микросомах и в меньшей степени – в цитозоле [58]. В качестве кофакторов выступают ионы Fe^{+2} или Mn^{+2} . Каталаза осуществляет разложение или восстановление перекиси водорода (H_2O_2) в два этапа. Первый этап включает восстановление H_2O_2 до воды за счёт гемовой группы фермента с образованием в активном центре каталазы Fe^{+5} . На втором этапе происходит окисление ещё одной молекулы H_2O_2 Fe^{+5} – каталазой с образованием O_2 и H_2O [91]. В случае, когда концентрация H_2O_2 понижается, каталаза начинает проявлять пероксидазную активность в реакциях окисления нитратов, спиртов, формальдегидов. Важно отметить, что активность ферментов каталазы и СОД взаимосвязана вследствие их сопряженного функционирования в процессе нейтрализации $\text{O}_2^{\cdot-}$, в ходе которой в качестве промежуточного продукта образуется H_2O_2 , являющийся субстратом для каталазы. Вследствие этого, данные два фермента, имеющие различную локализацию в клетке, являются компонентами одного метаболического пути элиминации $\text{O}_2^{\cdot-}$ [83].

GSH, ГП, ГТ и глутатионредуктаза (ГР) входят в состав глутатионовой антиоксидантной системы, в которой поддержание пула восстановленного глутатиона обеспечивает ГР за счёт окисления НАДФН.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) является ферментом, катализирующим начальную реакцию пентозофосфатного пути. Г6ФДГ важна для внутриклеточных физиологических процессов, поскольку данный фермент является основным источником НАДФН [36]. НАДФН необходим для синтеза оксида азота, функционирования НАДФН-оксидазы, а также для

функционирования системы цитохрома р450. Также стало очевидным, что Г6ФДГ регулируется сигналами, которые влияют на транскрипцию, посттрансляционную модификацию белков и различные межбелковые взаимодействия [177]. Генерация восстановительного эквивалента НАДФН при участии Г6ФДГ играет важнейшую роль для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза и восстановительного биосинтеза в клетках. Недостаточная активность Г6ФДГ может обуславливать задержку роста и гибель клеток. Существенный недостаток Г6ФДГ ухудшает эмбриональное развитие и задерживает рост организма. Изменение активности Г6ФДГ связано с патологическими процессами, такими как нарушение регуляции аутофагии, резистентность к инсулину, инфекция, воспаление, а также гипергликемия и гипертоническое состояние [89].

НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ) – фермент, поставляющий восстановленный НАДФН, который является важным кофактором для генерации GSH, наиболее распространенного и важного антиоксиданта в клетках млекопитающих [18]. Вероятно, контроль клеточного окислительно-восстановительного баланса и защита от окислительного повреждения является одной из основных функций фермента НАДФ-ИДГ, локализованного, по большей части, в цитозоле клеток. На данный момент проводятся исследования о возможной роли НАДФ-ИДГ в регуляции апоптоза, индуцированного тепловым шоком [174, 137]. Так, например, установлено, что трансфекция клеток HeLa малой интерферирующей РНК (siRNA) заметно снижала активность НАДФ-ИДГ, что приводило к индукции апоптоза .

1.2.1. Регуляция антиоксидантных ферментов на уровне транскрипции

Эффективная защита клеток организма от агрессивного воздействия АФК подразумевает наличие способности регуляции активности компонентов

АОС. В высокоорганизованных организмах гормоны и ионы металлов в качестве кофакторов обеспечивают пре- и посттрансляционный контроль над экспрессией антиоксидантных ферментов.

АФК могут оказывать влияние на активность генов посредством окисления тиоловых групп в ДНК-связывающих доменах транскрипционных факторов, инактивации цистеин-содержащих каталитических центров протеинфосфатаз, а также путём изменения активности киназ. Гены, экспрессия которых регулируется в зависимости окислительно-восстановительного состояния клетки, называют редокс-чувствительными генами [135,111]. Совокупность продуктов таких генов формирует сеть редокс-регуляции.

На сегодняшний день в клетках млекопитающих выявлено более 20 редокс-чувствительных факторов транскрипции. Активация таких элементов, как транскрипционные факторы NF-κB, p53, Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), FOXO (forkhead box O) и других, способна повлечь за собой изменение экспрессии нескольких сотен генов и, как следствие, активности разнообразных биохимических процессов. Исходя из этого сделан вывод о ключевой роли регуляторных элементов в клеточной пролиферации и дифференцировке, индукции апоптоза и явлении множественной лекарственной устойчивости [126]. Несмотря на то, что NF-κB и AP-1 представляют собой редокс-чувствительные транскрипционные факторы, основными их активаторами служат внешние стимулы, например, гормоны, цитокины, факторы роста, а также физические воздействия.

Результаты компьютерного анализа определили множество транскрипционных регуляторных элементов в проксимальных промоторных областях генов СОД, которые служат сайтами связывания для нескольких распространенных факторов транскрипции. Было показано, что транскрипционные факторы, включая NF-κB, AP-1, AP-2 и Sp1 играют значительную роль в регуляции уровней конститутивной или индуктивной

экспрессии всех изоформ СОД [184]. Редокс-чувствительный транскрипционный фактор NF-κB регулирует экспрессию генов, участвующих в воспалительных и иммунных реакциях организма. Различные стимулы, которые активируют NF-κB, как, например, цитокины, липосахариды, некоторые микроорганизмы, увеличивают уровень внутриклеточных активных форм кислорода. Чувствительные к NF-κB элементы были обнаружены в промоторной и в интронной областях всех трех генов СОД [63, 90]. Несмотря на то, что сайт связывания NF-κB в промоторе *Sod1* мало чувствителен к внешним стимулам, сигнальный путь PI3K / АКТ, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), киназы АКТ, способен активировать NF-κB и усиливать экспрессию Cu/Zn СОД [164]. Индукция *Sod2* в ответ на окислительный стресс хорошо известна в организмах, тканях и клетках, находящихся в стрессовых условиях. Стимулы, такие, как ионизирующее излучение, 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат, интерферон-гамма (IFN-γ) и провоспалительные цитокины могут быстро модулировать транскрипцию гена *Sod2*. Из источников литературы известно, что зависимое от стимула повышение уровня мРНК MnСОД контролируется на уровне транскрипции [176]. Предполагается, что мотив NF-κB в области промотора *Sod3* выступает как функциональный сайт транскрипционного связывания, который способствует индукции и корегуляции синтазы оксида азота (iNOS) и СОД3 [164].

Транскрипционные факторы семейства FOXO долгое время считались ключевым регулятором старения. Семейство FOXO млекопитающих включает четыре белка: FOXO1, FOXO3 (или FOXO3a), FOXO4 и FOXO6 [134]. На сегодняшний день установлено, что данные транскрипционные факторы выступают в качестве важнейших регуляторов клеточного ответа на стресс и активируют антиоксидантную защиту. В ответ на изменение окружающей среды или внутренние стимулы FOXO связываются с промотором многих

целевых генов, которые участвуют в различных важнейших биологических процессах, таких как стрессоустойчивость, метаболизм, пролиферация, остановка клеточного цикла и аутофагия. Было доказано, что FOXO играют ключевую роль в реагировании на рецепторы смерти [156]. Также сообщалось, что антиоксидантная активность, опосредованная FOXO1, и аутофагия необходимы для защитного эффекта при повреждении печени [142].

Семейство белков FOXO активируют гены антиоксидантной системы, белки которой локализуются в различных субклеточных компартментах, таких как митохондрии и пероксисомы, а также включают внеклеточные антиоксиданты, присутствующие в плазме крови (в частности, селенопротеин Р и церулоплазмин) [122]. В свою очередь, АФК и стрессовые эффекты, которые приводят к образованию АФК, способны изменять активность факторов FOXO на нескольких регуляторных уровнях, включая посттрансляционную модификацию белков и изменение их субклеточной локализации. Более того, механизмы транскрипционной и посттранскрипционной регуляции генов, кодирующих FOXO, чувствительны к уровню АФК.

У человека к FOXO-регулируемым ферментативным антиоксидантам относят СОД2, каталазу. Более того, имеются данные о воздействии FOXO на регуляцию цитоплазматической СОД1 в мышечных эритроблестах, что также подтверждает участие этих транскрипционных факторов в защите клеток от супероксидного радикала [132]. Было показано, что FOXO может регулировать биосинтез ГП1 [176].

Хелатирование ионов металлов Fe^{2+} или Cu^{2+} способно предотвращать образование гидроксильных радикалов и запуск ПОЛ, а также окисление других биомолекул. В клетках ионы меди хелатируются с помощью металлотионеинов, а единственным клеточным депо железа является ферритин. Установлено также, что экспрессия медьсодержащего белка церулоплазмينا у млекопитающих контролируется FOXO [114].

Другой аспект действия белков FOXO, регулирующих антиоксидантную систему, был установлен, когда стал известен тот факт, что экспрессия гена *Sepp1*, кодирующего селенопротеин Р (SelP) – основной селенопротеин в плазме крови, находится под контролем FOXO1a. Для SelP характерно наличие гидропероксидазной активности, благодаря чему он защищает ЛПНП от окисления. Тем не менее, его главная физиологическая роль заключается в транспортировке селена из печени во внепеченочные ткани через кровь, что обеспечивает поставку селена для биосинтеза в клетках антиоксидантных селеноферментов, в частности, ГП-1, ГП-4, и ГР, необходимых для реализации защиты от окислительного стресса [102].

1.3. Современные методы фармакологической коррекции токсических поражений печени

Согласно современным представлениям о терапевтической коррекции токсического поражения печени, существует два подхода к разрешению данной проблемы. Первый из них предполагает исключение поражающего фактора и проведение комплекса профилактических мероприятий. Второй подход базируется на использовании гепатопротекторных средств с целью воздействия на универсальные мультифакторные звенья патогенеза. В данном случае зачастую используются гепатопротекторы.

Гепатопротекторы представляют собой препараты, способствующие повышению устойчивости печени к патогенным факторам, ускоренному процессу ее регенерации и возвращению к нормальному функционированию. По происхождению и механизму действия гепатопротекторы весьма разнообразны.

Так, например, имеет место использование фосфолипидных препаратов в качестве гепатопротекторных средств. Фосфолипиды имеют естественное происхождение и являются основными компонентами клеточных мембран.

Помимо их функциональной роли в важнейших цитологических структурах, фосфолипиды выполняют метаболические функции в желчи, например, участие в обеспечении солюбилизации холестерина и жирных компонентов пищевых продуктов и липофильных лекарственных веществ [189]. Кроме того, фосфолипиды действуют как компоненты липопротеинов для транспорта жира между кишечником и печенью, как источник ацетилхолина и незаменимых жирных кислот и энергии [193]. Фосфолипиды могут быть использованы как универсальные агенты для доставки лекарственных препаратов благодаря своей низкой токсичности. Препараты, содержащие эссенциальные фосфолипиды, в большинстве стран не используются в медицинской практике и выпускаются исключительно в качестве биологически активной добавки к пище [81]. В случаях вирусных гепатитов острой и хронической формы они противопоказаны [149]. На территории Российской Федерации, а также в странах СНГ подобные препараты применяют достаточно часто [110].

Среди предполагаемых эффектов препаратов, содержащих незаменимые фосфолипиды, называют опосредованное антифибротическое действие, снижение выраженности процесса цитолиза при алкогольной болезни печени, а также лекарственных и токсических поражений данного органа. Однако, известен и ряд принципиальных недостатков эссенциальных фосфолипидов. Например, низкая биодоступность, отсутствие экспериментального подтверждения предположений о встраивании фосфолипидов растительного происхождения в мембрану животной клетки. Кроме того, при воспалительном процессе в печени недостаточно одного только укрепления мембран гепатоцитов. Необходимо также устранить вызывающий повреждение фактор, однако, препараты на основе эссенциальных фосфолипидов с подобной задачей не способны справиться [138].

Препараты преимущественно прямого детоксицирующего действия способны к непосредственному взаимодействию с эндогенными

токсикантами. К данной группе относят L-арнитин-L-аспартат, глутамин-аргинин, которые способны снизить симптомы интоксикации организма [201]. Однако, на данный момент нет экспериментального подтверждения их терапевтического эффекта.

К препаратам, активирующим образование эндогенных детоксицирующих веществ, относят такие, как адеметионин, ремаксол. Адеметионин, как предполагается, оказывает гепатопротекторный эффект за счёт участия в синтезе глутатиона, структурных белков и фосфолипидов, а также в сульфуровании токсичных желчных кислот [29]. Для данного гепатопротекторного средства проведено ограниченное количество клинических исследований, в большей части которых участвовали пациенты с алкогольной болезнью печени. Помимо этого, среди недостатков адеметионина можно отметить низкую биодоступность таблетизированной формы, а также малый срок хранения и несовместимость в использовании с рядом других лекарственных средств [212].

В группе гепатопротекторных препаратов растительного происхождения наиболее известным является силимарин. Силимарин представляет смесь алколоидов расторопши пятнистой, главным действующим веществом в которой выступает силибинин. Экстракт расторопши широко используется для лечения хронических заболеваний печени и может быть использован для лечения неалкогольного стеатогепатита и фиброза печени ввиду оказываемого антиоксидантного эффекта. На данный момент точно не установлен гепатопротекторный механизм действия препарата, однако считается, что он связан с ингибированием процессов ПОЛ. Антиоксидантная активность флавоноидов зависит от способности ингибировать активность циклооксигеназы и липоксигеназы и способности хелатировать металлы переходной валентности. Клинические исследования показали, что регулярный прием силимарина стабилизирует проницаемость мембраны клеток печени.

Существенным недостатком данного препарата является необходимость длительного курса применения. Так, например, при циррозе печени терапевтический эффект силимарина замечен спустя 4 года ежедневного приема препарата [35]. У части пациентов с холестатическим синдромом применение силимарина вызывало холестаза, что следует рассматривать как ограничение приёма препарата для некоторых групп больных [136]. Кроме того, рассматриваемое лекарственное средство дает заметный эффект исключительно в качестве дополнительной восстанавливающей терапии. Экстракт расторопши пятнистой используется в комбинированных препаратах, таких как гепабене, биеносилим, и других. Однако подобные гепатопротекторные средства применимы только при хроническом поражении печени ввиду пролонгированного действия.

Среди препаратов желчных кислот наиболее часто применяют урсодезоксихолевую кислоту (УДХК) [107]. К механизмам действия УДХК относят стабилизацию мембран гепатоцитов путём встраивания в билипидный слой, предотвращение выхода цитохрома С из митохондрий, а также снижение синтеза холестерина в печени и его экскреции в желчь [145]. К неудобствам использования УДХК относят отсутствие формы для парентерального введения, а также расстройства желудочно-кишечного тракта и нарушения со стороны скелетно-мышечной и нервной системы.

Таким образом, несмотря на большое внимание исследователей к проблеме заболеваний печени, на сегодняшний день не найдено гепатопротектора, который бы удовлетворял большинству требований, а именно, имел бы достаточную абсорбцию, связывал или предупреждал образование токсических соединений, а также обладал пресистемной элиминацией.

1.4. Биологическая активность дигидрохинолиновых производных

Механизмам биологической активности хинолина и его производных посвящено немалое количество публикаций. Подобный интерес исследователей обозначен широкими возможностями использования данного класса соединений. Так, например, многие из хинолиновых производных сегодня используются в качестве кормовых добавок для животных сельскохозяйственного значения. Данные соединения применяются также для производства противомаларийных (хинин, хинидин, хлорохин, мефлохин), противовирусных (саквинавир), антибактериальных (ципрофлоксацин, спарфлоксацин), противогрибковых-антипротозойных (клиохинол), противоглистных (оксамнихин), местных анестетиков (дибукаин), противоастматических (монтелукаст), противоопухолевых (камптотецин, иринотекан, топотекан, gefитиниб), антипсихотических (арипипразол, брекспипразол), антиглаукомных (картиолол) и кардиотонических (веснарион) препаратов. Хинолиновые производные способны проявлять различную биологическую активность [7, 147].

Синтезирован фармакологический препарат с торговым названием VitaPQQ, являющийся аналогом метоксатина, и выпускающийся в качестве пищевой добавки и терапевтического средства. VitaPQQ замедляет процессы старения, обладает нейрозащитным эффектом, благоприятствует синтезу фактора роста, развитию и восстановлению функций нейронов. Из литературных данных известно, что антиокислительная и противоопухолевая активность практически одинакова в группе гетероциклических хинонов (хинолинхинонов, изохинолинхинонов, индолхинона) и препарата сравнения – стрептонигрина. Однако, цитотоксичность хинонов была значительно ниже, чем у стрептонигрина.

В ходе недавних экспериментов идентифицирован аналог N-(3-аминофенил)-1-циклопропил-6-фтор-8-метокси-7-(3-метилпиперазин-1-ил)-4-

оксо-1,4-дигидрохиолин-3-карбоксамиды как противовоспалительное средство, которое проявляет сильнодействующие эффекты на окислительную активность фагоцитов цельной крови, нейтрофилов и фагоцитов макрофагов, а также сильное ингибирующее действие на пролиферацию Т-клеток, в то же время обладая достаточно высокой антибактериальной активностью [66].

В поисках новых активных молекул против *Mycobacterium tuberculosis* ряд 1,2,3-триазолил-дигидрохиолин производных был синтезирован и подвергнут рентгенокристаллографическому исследованию, в ходе которого тестируемые соединения показали многообещающую активность по сравнению с препаратом этамбутол [34].

На сегодняшний день синтезировано в общей сложности шестнадцать 2-замещенных производных 3-арилхиолина и оценен их противовоспалительный эффект в клетках линии клеток J774A.1 мышинных макрофагов, активированных эндотоксином липополисахаридом. Среди представителей 2-замещенных производных 3-арилхиолина обнаружено, что соединения 2-(4-метоксибензоил)-3-(3,4,5-триметоксифенил) хиолин и 2-(4-фторбензоил)-3-(3,4,5-триметоксифенил) хиолин обладают значительными противовоспалительными эффектами благодаря ингибированию продукции NO, TNF- α и IL-6 и ослаблению активности NF- κ B. Соединения 2-(4-метоксибензоил)-3-(3,4,5-триметоксифенил) хиолин и 2-(4-фторбензоил)-3-(3,4,5-триметоксифенил) хиолин могут быть потенциальными отправными точками для разработки противовоспалительных и иммунодепрессивных препаратов при лечении сепсиса и септического шока [206].

Немаловажную роль в изучении биологической активности производных хиолина занимает фармакологическая оценка производных 2-оксохиолина, содержащих α -аминофосфонаты, в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Результаты колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (МТТ-теста) показали, что некоторые соединения проявляют ингибирующую активность от умеренной

до высокой против линий опухолевых клеток HepG2, SK-OV-3 и NCI-H460. Большинство соединений показали гораздо более низкую цитотоксичность в отношении нормальных клеток HL-7702, чем комбинированные химиопрепараты 5-FU и цисплатин [34].

Ряд производных 1,2-дигидрохинолина (EEDQ2, LP-EEDQ2 или Tf-LP-EEDQ2) синтезирован и оценен на цитотоксичность в клеточных линиях HeLa, Hep G2 и HEK-293T. EEDQ2 идентифицирован как перспективный противораковый агент с низким IC₅₀ в клетках HeLa (18,55 мкг / мл) и Hep G2 (14,53 мкг / мл). Для улучшения противоопухолевой активности и опухолевой избирательности EEDQ2 в экспериментах использовали липосомы, модифицированные трансферрином (Tf), для доставки дигидрохинолинового производного. Для эксперимента клетки HeLa и Hep G2 обрабатывали EEDQ2 и транспортировали с помощью модифицированных наночастиц, уровень АФК при этом значительно повышался, и потенциал митохондриальной мембраны изменялся. При трансферрин-опосредованной липосомальной доставке увеличивалось поглощение EEDQ2 клетками примерно в 3,7 раза. Опубликованные данные предполагают, что трансферрин-модифицированные липосомы, доставляющие EEDQ2, являются многообещающей стратегией лечения рака [194].

Рутекарпин, алкалоид индолохиназолина, выделенный из *Evodia rutaecarpa*, проявляет противоопухолевую, противовоспалительную активность. Однако, результаты анализа биодоступности и эффективности рутекарпина как антиоксиданта не выявили значительных изменений антиоксидантного статуса среди добровольцев, применявших данное вещество в качестве добавки на протяжении 6 недель [42].

Производные хинолина рассматриваются также как возможное терапевтическое средство в лечении болезни Альцгеймера [216]. Растущее количество исследований показывает, что активация сигнального пути оксида азота, ведущего к фосфорилированию белка, связывающего чувствительный

элемент, реагирующий на цАМФ-зависимый транскрипционный фактор (CREB), улучшает нейропластичность и препятствует расстройству памяти в моделях болезни Альцгеймера на животных [74].

На сегодняшний день актуальными остаются исследования соединений дигидрохинолиновых производных, обладающих антиоксидантным эффектом. К таким соединениям относят применявшийся нами в ходе исследований 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин (ДГХ1, рис. 1), являющийся производным антиоксиданта этоксихина. ДГХ1 первоначально успешно использовался в экспериментах, посвященных изучению нейродегенеративных процессов у мышей (Койле и Патфарекен, 1993; Рейтер, 1995). Также была выявлена его активность против *Trypanosoma brucei* — одноклеточного паразита, вызывающего заболевание трипаносомоз и переносимого мухой цеце [206]. Кроме того, была показана его относительно высокая антиокислительная активность по сравнению с известным фенольным антиоксидантом ионолом — 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенолом, являющимся азотсодержащим гетероциклическим соединением.

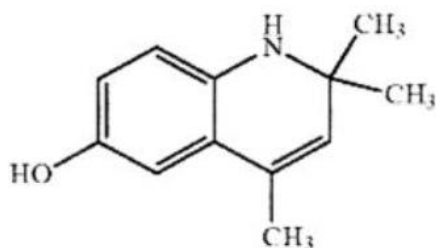


Рис. 1. Структурная формула 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина

Брутто-формула исследуемого вещества $C_{12}H_{15}NO$, молекулярная масса равна 189,258 г/моль. Антиоксидантное действие ДГХ1 выражено, подобно большинству ароматических аминов, фенолов, нафтолов, в способности к разрыву химических связей в цепной реакции: ДГХ1 взаимодействует с пероксидными радикалами с образованием малоактивных радикалов, ингибируя тем самым скорость образования свободных радикалов.

Наряду с этим, было показано, что один из путей метаболизма этоксихина **1** в живых организмах проходит через образование гидрокси-производного **2** и далее продукта его окисления – 2,2,4-триметил-6(2*H*)-хинолинона (хинонимина) **3** (рис. 2) [41]. Для соединения **3** в литературе имеются сведения о наличии у него мутагенной активности, канцерогенности и способности связываться с ДНК [179].

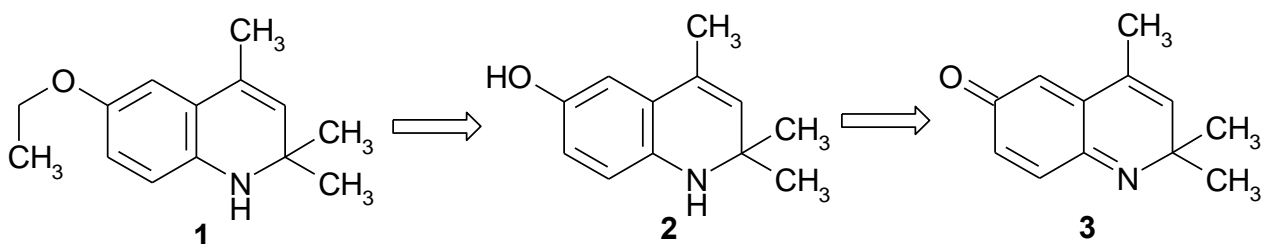


Рисунок 2. Схема метаболизма этоксихина **1**.

Было предположено, что введение защитной бензоильной группы к атому азота гидрохинолинового цикла 6-гидрокси-2,3-дигидрохинолина **2** (соединение **4**) должно препятствовать образованию токсичной хиноидной структуры **3**. Таким образом, для настоящей работы нашей задачей также стал анализ нового производного дигидрохинолина – 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ2) **4**, которое не может трансформироваться в структуру хинонимина **3'** (рис. 3).

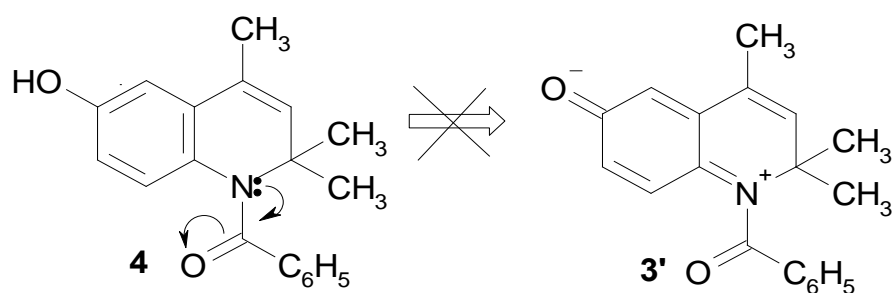


Рисунок 3. Структура 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина **4**.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Исследование проводили на 4-6 месячных самцах белых лабораторных крыс Wistar массой 200-250 г, которых содержали в условиях комнатной температуры, 12-часового светового дня и свободного доступа к воде и пище. Состав корма для животных приведён в Приложении 1. Работа выполнялась с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

2.2. Создание модели экспериментального токсического поражения печени

Для моделирования экспериментального ТПП был использован CCl_4 в качестве органоспецифического токсина с гепатотропным эффектом. После суточной пищевой депривации крысы внутрижелудочно получали дозу четыреххлористого углерода [115], растворенную в вазелиновом масле. Воздействие осуществлялось однократно в дозировке 0,064 мл на 100 г веса животного.

В ходе эксперимента животных разделили на 9 групп: контрольные животные (n=12), получавшие внутрижелудочно вазелиновое масло; контрольные животные, подвергнутые введению ДГХ1 (n=10) и ДГХ2 (n=10) в дозе 50 мг/кг веса; крысы с повреждением печени, индуцированным однократным введением per os с помощью зонда четыреххлористого углерода в дозировке 0,064 мл на 100 г веса животного (n=12); крысы с ТПП, получавшие в качестве гепатопротектора ДГХ1 в дозе 25 мг/кг (n=12) и 50 мг/кг (n=12) веса; животные, которым на фоне патологии вводили ДГХ2 в дозе 25 мг/кг (n=12) и 50 мг/кг (n=12) веса; животные с ТПП, получавшие внутрижелудочно карсил в дозе 50 мг/кг веса (n=12).

ДГХ1, ДГХ2 и карсил животным вводили внутрижелудочно один раз в сутки в течение трёх дней, начиная через 3 часа после администрации CCl_4 или вазелинового масла. На 4 день после индукции патологии животных наркотизировали, забирали кровь и извлекали печень для проведения исследования.

ДГХ1 и ДГХ2 были синтезированы на кафедре органической химии Воронежского государственного университета и любезно предоставлены заведующим кафедрой – Шихалиевым Хидмедом Сафаровичем. В таблице 1 приведены характеристики ДГХ1 и ДГХ2.

Таблица 1. Характеристика исследуемых соединений

Соединение	Спектры ЯМР (химический сдвиг, δ)	Брутто- формула	Вычислено/найдено				$T_{пл}$, $^{\circ}C$	Выход, %
			М	С, %	Н, %	Н, %		
ДГХ1	1,12 (2- CH_3); 1,82 (4- CH_3); 5,25 (H^{3a}); 6,33 (H^5); 6,34 (H^7); 6,24 (H^8); 4,48 (NH); 8,32 (OH)	$C_{12}H_{15}NO$	189/ 189	76,20/ 76,07	7,94/ 8,14	7,40/ 7,29	173 - 5	45
ДГХ2	1,48 (6H,с, CMe_2); 1,92 (3H,с, 6Me); 5,56 (1H,с, 4-CH); 6,10 - 7,90 (8H,м,аром.); 9,56 (1H, с, OH)	$C_{19}H_{19}NO_2$	293,36/ 293	77.79/ 77.89	6.53/ 6.63	4.77/ 4.87	182 - 3	94

2.3. Подготовка материала для исследования

Печень перфузировали *in situ* ледяным физиологическим раствором через портальную вену, затем орган извлекали из брюшной полости. Ткань печени осушали, взвешивали и гомогенизировали в четырехкратном объеме охлажденной среды выделения с помощью гомогенизатора Daihan HG-15A. В состав среды выделения входил 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,6, 10 мМ ЭДТА и 2 мМ β -меркаптоэтанол. Полученный гомогенат центрифугировали при

10000 об/мин в течение 12 минут, для проведения исследований использовали супернатант.

Венозную кровь отбирали в стеклянные пробирки без антикоагулянта, ополоснутые физиологическим раствором, инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. Затем кровь центрифугировали при 3 тыс. об/мин в течение 10 мин для получения сыворотки.

2.4. Анализ биологической активности и токсичности соединений

Оценку биологической активности дигидрохинолиновых производных осуществляли с помощью программы анализа биологической активности Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) [20, 165]. Анализ токсичности соединения осуществляли с помощью анализа *in silico* с использованием программы PROTOX [3, 49]. Данная программа позволяет предсказать уровень летальной дозы (ЛД50) тестируемого соединения. В соответствии с анализом, все вещества классифицируются по шести категориям Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), в зависимости от токсичности соединения: Category I: $LD50 \leq 5 \text{ mg/kg}$; Category II: $5 < LD50 \leq 50 \text{ mg/kg}$; Category III: $50 < LD50 \leq 300 \text{ mg/kg}$; Category IV: $300 < LD50 \leq 2000 \text{ mg/kg}$; Category V: $2000 < LD50 \leq 5000 \text{ mg/kg}$; Category VI: $LD50 > 5000 \text{ mg/kg}$.

2.5. Измерение ферментативной активности

За единицу активности (Е) принимали такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре 25°C. Ферментативную активность выражали в виде удельной активности, Е/г массы ткани и Е/мл сыворотки. Активность ферментов

измеряли с использованием спектрофотометра Hitachi U-1900 с программным обеспечением.

2.5.1. Определение активности аспартаминотрансферазы

АсАТ катализирует обратимую реакцию L-аспартата с 2-оксоглутаратом, в результате которой реагирующие вещества превращаются в оксалоацетат и L-глутамат. Активности АсАТ определяли спектрофотометрически при длине волны 537 нм, используя комплект реагентов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург, Россия) согласно инструкции. Метод основан на измерении оптической плотности окрашенного соединения – гидразона пировиноградной кислоты, который образуется в щелочной среде при самопроизвольном декарбоксилировании оксалоацетата [162].

Активность АсАТ рассчитывали в мкмоль/(с·л) по формуле:

$$\text{мкмоль/(с·л) или} = (E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}) \cdot k, \quad (1)$$

где k – коэффициент экстинции, рассчитанный по калибровочному графику: $k = C/E$, $E_{\text{пр}}$ – поглощение пробы, $E_{\text{к}}$ – поглощение контроля.

2.5.2. Определение активности аланинаминотрансферазы

АлАТ катализирует перенос аминокетильной группы от аланина на α -кетоглутарат с образованием пирувата и глутамата. Активность АлАТ оценивали с применением набора реагентов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург, Россия) согласно протоколу. Активность АлАТ пропорциональна количеству образовавшихся динитрофенилгидразонов пирувата в щелочной среде, которое определяется фотометрически при длине волны 537 нм [162].

Расчет активности АлАТ проводили по формуле, выражая в мкмоль/(с·л):

$$\text{мкмоль/(с·л) или ммоль/(ч·л)} = (E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}) \cdot k, \quad (2)$$

где k – коэффициент экстинции, рассчитанный по калибровочному графику:
 $k = C/E$, $E_{\text{пр}}$ – поглощение пробы, $E_{\text{к}}$ – поглощение контроля

2.5.3. Определение активности гамма-глутамилтранспептидазы

Метод основан на способности фермента к переносу γ -глутаминовой группы синтетического субстрата L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида на акцептор глицилглицин. Процесс сопровождается высвобождением в инкубационную среду 5-амино-2-нитробензоата, количество которого пропорционально активности ГТП [9]. Ферментативную активность спектрофотометрически определяли при длине волны 405 нм. Для определения активности фермента использовали набор реагентов фирмы «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург.

Активность фермента рассчитывали согласно формуле:

$$\text{мкмоль/(с·л) или ммоль/(ч·л)} = (E_{\text{пр}} - E_{\text{к}}) \cdot k, \quad (3)$$

где k – коэффициент экстинции, определенный по калибровочному графику:
 $k = C/E$, $E_{\text{пр}}$ – поглощение пробы, $E_{\text{к}}$ – поглощение контроля.

2.5.4. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАД и НАДФ

Активность ферментов, которые катализируют реакции, взаимосвязанные с окислительно-восстановительными превращениями НАДН и НАДФН, оценивали путём анализа экстинкции при 340 нм. Расчёт

активности ГП, ГР, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ осуществляли по следующей формуле:

$$E = \frac{D_{1,0} \cdot V}{\Delta V \cdot t \cdot 6,22} \quad (4)$$

где D – изменение оптической плотности при 340 нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл; ΔV – объем внесенной для измерения пробы, мл; t – время измерения, мин; 6,22 – коэффициент поглощения для дегидрогеназ, который соответствует уровню поглощения 1 мл анализируемой смеси, содержащей 1 мкмоль кофермента, при толщине измеряемого слоя 1 см.

2.5.4.1. Определение активности глутатионредуктазы

Принцип анализа активности ГР заключается в измерении оптической плотности раствора при 340 нм, которая снижается вследствие окисления НАДФН, происходящего в ходе восстановления GSSG.

Среда для измерения активности ГР включала 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ НАДФН и 0,8 мМ GSH [9].

2.5.4.2. Определение активности глутатионпероксидазы

Анализ активности ГП основан на измерении оптической плотности при 340 нм, которая снижается в результате окисления НАДФН в ходе протекания сопряжённых ферментативных реакций: под действием ГП GSH окисляется до GSSH, который затем восстанавливается в ГР-реакции с окислением НАДФН. Оценку активности ГП осуществляли в среде спектрофотометрирования, включающей 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ НАДФН, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H_2O_2 , 1 ед/мл ГР. Контрольная проба не содержала GSH [24].

2.5.4.3. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Определение скорости НАДФ-ИДГ-реакции основано на увеличении поглощения при 340 нм в процессе восстановления НАДФ в реакции окислительного декарбоксилирования изоцитрата. Среда для измерения активности НАДФ-ИДГ состояла из 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,8), содержащего 1,5 мМ изоцитрата, 2 мМ $MnCl_2$, 0,4 мМ НАДФ.

2.5.4.4. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Активность Г6ФДГ оценивали при 340 нм по реакции превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон, в ходе которой происходит восстановление НАДФ. Среда спектрофотометрирования состояла из 50 мМ трис-НСl – буфера (рН 7,8), содержащего 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ НАДФ, 1,0 мМ $MnCl_2$. Реакцию запускали внесением в кювету опытного образца [12].

2.5.5. Определение активности каталазы

Принцип метода измерения скорости каталазной реакции основан на анализе поглощения опытных и контрольных проб при 410 нм. Данная длина волны соответствует максимуму поглощения комплекса, образующегося между H_2O_2 и молибдатом аммония [12].

Используемые реагенты:

- 1) 0,08% раствор H_2O_2
- 2) 4,5% раствор молибдата аммония
- 3) 0,1 М трис-НСl- буфер, рН=7.4

4) Буферно-субстратная смесь: 10 мл трис-НСl-буфер + 30 мл 0,08% H₂O₂.

Таблица 2. Ход определения активности каталазы

	Контроль	Опыт	Инкубация
Буферно-субстратная смесь	2 мл	2 мл	10 мин при температуре 37°C
Анализируемая проба	-	0,1 мл	3 мин при температуре 37°C
Молибдат аммония	2 мл	2 мл	-
Анализируемая проба	0,1 мл	-	-

Расчёт активности каталазы производили по формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_0) \cdot 12 \cdot 10^3 \cdot 4,6 \cdot 10^6}{22,2 \cdot 10^6 \cdot 3}, \quad (5)$$

где 4,1 – конечный объем пробы; 12·10³ - фактор разведения; 10⁶ - коэффициент пересчета на мкм; 22,2·10⁶ - коэффициент молярной экстинкции H₂O₂; 3 – время инкубации в минутах.

2.5.6. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД анализировали по Матюшину Б.Н. [11] на спектрофотометре Hitachi U-1900 при длине волны 540 нм. Принцип метода состоит в оценке степени ингибирования восстановления тетразолия нитросинего в неэнзиматической среде феназинметасульфата и НАДН. Раствор для измерения активности СОД включал: 0,1 М фосфатный буфер, рН

7,8, 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ НСТ, 0,01 мМ ФМС, 0,8 мМ НАДН. В контрольную кювету добавляли 1 мл среды спектрофотометрирования и 10 мкл матричного раствора ФМС, а в опытную кювету добавляли 1 мл среды выделения, 10 мл матричного раствора ФМС и 30 мкл образца. Затем в обе кюветы добавляли по 10 мкл матричного раствора НАДН и оценивали поглощение при 540 нм в течение 5 мин. За единицу активности СОД принимали такое количество фермента, которое необходимо для 50% ингибирования восстановления тетразолия нитросинего.

Расчёт активности СОД производили по формуле:

$$\left(100 - \frac{E_0 \cdot 100}{E_k}\right) / 50 \text{ мг белка} = \text{усл. ед. на 1 мг белка}, \quad (6)$$

где E_0 - поглощение опытной пробы; E_k - поглощение контрольной пробы.

2.5.7. Определение активности аконитатгидратазы

Принцип определения активности АГ основан на измерении оптической плотности при 235 нм, которая возрастает в ходе превращения цитрата в цис-аконитат. Среду спектрофотометрирования для АГ составлял 50 мМ трис-НСI-буфер, рН 7,8, содержащий 0,15 мМ цитрат. Реакцию запускали добавлением исследуемой пробы в кювету [13]. Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{\Delta D \cdot V \cdot V_1}{\varepsilon \cdot t \cdot V_2}, \quad (7)$$

где ΔD – изменение поглощения пробы за время измерения t ; V - общий объём ферментного раствора, мл; V_1 – объём реакционной среды, используемой для измерения активности фермента, мл; V_2 – объём образца, добавленный для анализа, мл; ε - коэффициент молярной экстинкции для хромофорной группы субстрата, соответствующий изменению поглощения в ходе превращения 1

мкМ субстрата в 1 мл среды (составляет 3,08 для цис-аконитата); t - время измерения активности фермента, мин.

2.5.8. Определение активности глутатионтрансферазы

Активность ГТ анализировали на основании изменения поглощения опытных образцов при 340 нм в ходе взаимодействия 1-хлор-2,4-динитробензола с GSH. Реакционная смесь для измерения скорости ГТ-реакции включала 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1мМ 1-Cl-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH.

Расчет активности ГТ осуществляли по формуле:

$$E = \frac{D \cdot 1,0 \cdot V}{\Delta V \cdot t \cdot 9,6}, \quad (8)$$

где D – прирост поглощения при 340 нм за определенное время;
1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл; ΔV – объем добавленного для измерения образца, мл; t – время измерения, мин; 9,6 – коэффициент экстинкции для глутатион-1хлор-2,4-динитробензола, соответствующий величине поглощения 1 мл реакционной смеси, содержащей 1 мкмоль данного соединения, при длине оптического пути 1 см.

2.5.9. Выделение и очистка глутатионпероксидазы

Препараты ГП получали с помощью следующих стадий очистки. Гомогенат печени фильтровали и центрифугировали при 7000 g в течение 10 мин. Из полученного супернатанта высаливали ГП сульфатом аммония, осадок ресуспензировали в среде выделения и наносили на колонку с сефадексом G-25 (Fine, Sigma-Aldrich, США) (1,7x20 см) для очистки от низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли 0,01 М калий-фосфатным буфером (рН 7,4) со скоростью 25-30 мл/ч. Производили забор фракций объемом 2 мл и анализировали их на наличие ГП-активности.

Несколько фракций, для которых была характерна наибольшая активность, объединяли и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (Whatman, Sigma-Aldrich, США) (1,2x13 см) для проведения ионно-обменной хроматографии. Десорбцию ГП с колонки осуществляли с помощью градиента концентрации KCl в среде элюции со скоростью 20-25 мл/час. Собирали фракции объёмом 2 мл, оценивали в них активность ГП и содержание общего белка. Фракции, обладающие наибольшей активностью фермента, объединяли. Все стадии выделения и очистки ГП производили при температуре 0-4 °С.

2.6. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы

2.6.1. Определение содержания цитрата

Концентрацию цитрата анализировали в образцах с помощью метода Нательсона. Данный метод основан на образовании из цитрата в присутствии бромного реагента и перманганата калия окрашенного комплекса тиомочевины и пентабромацетона, который в последующем экстрагируют петролейным эфиром [148]. Концентрацию цитрата рассчитывали по калибровочной кривой.

К анализируемому образцу добавляли 17%-ную ТХУ в соотношении 1:1, перемешивали и центрифугировали при 4000g 10 минут. Отбирали 0,5 мл супернатанта, вносили 0,25 мл 50%-ной H_2SO_4 , 0,1 мл 1М бромистого калия и 0,05 мл насыщенного раствора перманганата калия. Перемешивали и охлаждали в течение 20 минут при +4°C. Избыток перманганата калия устраняли внесением 3%-ного раствора H_2O_2 . Образовавшийся пентабромацетат экстрагировали с помощью поэтапного добавления петролейного эфира с периодическим перемешиванием на протяжении 5 минут: вносили 0,5 мл, снова 0,5 мл и затем 0,3 мл эфира. Полученный эфирный экстракт в объёме 1 мл отливали в пробирку с 2,5 мл 2%-ного раствора тиомочевины в боратном буфере и перемешивали. После разделения

фаз водный (нижний) слой отбирали пипеткой Пастера с оттянутым концом. Поглощение раствора оценивали с помощью спектрофотометра Hitachi U-1900 при длине волны 430 нм. В качестве контроля использовали 10%-ный раствор ТХУ, обработанный тем же способом.

2.6.2. Определение концентрации восстановленного глутатиона

Концентрацию GSH определяли с помощью метода, принцип которого заключался в реакции между 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана) и тиоловой группой GSH с образованием тионитрофенильного аниона в эквимольных количествах, обладающего способностью поглощать свет при 412 нм.

Ход определения:

1. 0,5 мл пробы доводили до 4 мл 0,1 М фосфатным буфером pH 7,4;
2. Разведённый образец смешивали с 20% ТХУ в соотношении 2:1, перемешивали и охлаждали при 4 °С 15-20 минут.
3. Пробирки центрифугировали при 3000g и 4 °С 15 минут;
4. Супернатант из каждой пробирки переносили по 1 мл в контрольную и опытную пробирки, содержащие 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 7,4;
5. В опытную пробирку вносили 0,05 мл реактива Элмана, а в контрольную пробирку – 0,05 мл этанола. Пробирки перемешивали;
6. Поглощение опытных и контрольных проб измеряли против фосфатного буфера при длине волны 412 нм и длине оптического пути 1 см.

Содержание GSH рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_{оп} - E_{к}}{13,1 \cdot 10^3} \cdot 72,6 \cdot 10^3, \text{ ммоль/л} \quad (9)$$

где C – содержание GSH, ммоль/л; $E_{оп}$ – поглощение опытной пробы; $E_{к}$ – поглощение контрольной пробы; $13,1 \cdot 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции реактива Элмана при 412 нм; 72,6 – фактор разведения.

2.6.3. Определение содержания α -токоферола

Метод оценки содержания α -токоферола заключался в измерении оптической плотности хромогенного комплексного соединения, образующегося при взаимодействии α -токоферола, FeCl_3 и ортофенантролина [59]. Исследуемый образец разбавляли 96% этанолом, перемешивали и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. После разделения фаз отбирали верхний слой в новые пробирки и выпаривали жидкость на водяной бане при 50°C. Сухой остаток разводили в 1 мл бензола, вносили 1 мл 0,025% спиртового раствора FeCl_3 , перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мл 0,05% спиртового раствора ортофенантролина, перемешивали, инкубировали ещё 2 минуты и считывали поглощение раствора при 510 нм. Контрольный образец содержал бензол, FeCl_3 и ортофенантролин. Концентрацию α -токоферола определяли по калибровочной кривой.

2.7. Оценка оксидативного статуса

2.7.1. Определение содержания диеновых конъюгатов

Концентрацию ДК оценивали на основании поглощения раствора при 233 нм, которое обусловлено образованием в процессе ПОЛ в молекулах полиненасыщенных жирных кислот сопряжённых двойных связей [23]. 0,25 мл анализируемого образца в течение 15 мин перемешивали в смеси с гептаном и изопропанолом в соотношении 1:1. После перемешивания смесь центрифугировали при 4000 g 10 мин. Супернатант переливали в чистые пробирки и добавляли 1/10 объёма дистиллированной воды, встряхивали. После расслоения фаз отбирали верхний слой, добавляли этиловый спирт в соотношении 1:5 и измеряли оптическую плотность при 233 нм. В

контрольный образец вместо пробы добавляли 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,6).

Концентрацию ДК рассчитывали по формуле:

$$[\text{ДК}] = \frac{V_{\text{общ}} \cdot D \cdot 10^6}{L \cdot E \cdot m \cdot V_{\text{внес}}}, \quad (10)$$

где [ДК] - концентрация диеновых конъюгатов, мкмоль/г; $V_{\text{общ}}$ - объем полученного образца, мл; D - величина поглощения, ед.; L - длина оптического пути, см; коэффициент молярной экстинкции, равный $2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $V_{\text{внес}}$ - объем вносимой пробы, мл.

2.7.2. Оценка окислительной модификации белков

Степень окислительной модификации белков (ОМБ) анализировали с помощью измерения поглощения 2,4-динитрофенилгидразонов, образующихся в ходе реакции карбонильных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) [2]. 0,1 мл исследуемой сыворотки крови (0,3 мл гомогената) довели 100 мМ фосфатным буфером, рН 7,4, до объема 1 мл и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 15 мин. После этого вносили в контрольную пробу 4 мл 2,5 М соляной кислоты, а в опытную – такой же объём 10 мМ 2,4-ДНФГ, растворенного в 2,5 М НСl. Пробирки перемешивали, инкубировали при 25 °С в течение часа с периодическим перемешиванием. После инкубации добавляли 5 мл холодной 20% ТХУ, инкубировали при 4 °С 15 минут. Пробирки затем центрифугировали при 3000g в течение 15 мин, белковый осадок оставляли, отбрасывали супернатант. Осадок белка промывали 4 мл 10% ТХУ и повторяли процедуру осаждения. Далее осадок механически разрушали, трижды промывали 4 мл смеси этанола и этилацетата в соотношении 1:1, затем осадок ресуспензировали в 2 мл 8 М мочевины и инкубировали в течение часа при

37 °С. Поглощение опытных проб измеряли против контрольных при 370 нм. Расчёт концентрации карбонильных аминокислотных групп в белках (нМ) производили с помощью коэффициента молярной экстинкции $\xi = 22,000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$. Полученные значения переводили в нмоль карбонильных групп на мг белка.

2.7.3. Определение интенсивности биохемилюминесценции

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления анализировали методом железоиндуцированной хемилюминесценции. Данный метод основан на реакции разложения H_2O_2 в присутствии ионов металлов переменной валентности по реакции Фентона: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet + \text{Fe}^{3+}$. Образующиеся при этом свободные радикалы (R^\bullet , OH^\bullet , RO^\bullet , RO_2^\bullet , O_2^\bullet) вступают в реакции с биомолекулами в тестируемом образце. В ходе рекомбинации образующихся при данном процессе радикалов формируется тетроксид, который в дальнейшем распадается с выделением квантов света. Для данного метода использовали биохемилюминометр БХЛ-07М с программным обеспечением. Кинетическую кривую биохемилюминесценции считывали на протяжении 30 секунд, что соответствует наиболее показательному периоду протекания реакции, и оценивали следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), характеризующих интенсивность СО, и величину тангенса угла наклона касательной к кривой ($\text{tg}\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность [13]. Для метода железоиндуцированной хемилюминесценции использовали следующие реактивы: 0,4 мл 0,1М калий-фосфатный буфер (рН 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ FeSO_4 , 0,2 мл 2%-ного раствора H_2O_2 (вносимого непосредственно перед измерением). Анализируемую пробу добавляли в объеме 0,1 мл перед внесением 2%-ного раствора H_2O_2 .

2.8. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции

Концентрацию общего белка в пробах определяли с помощью диагностического набора компании «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург, Россия) в соответствии с инструкцией. Принцип метода заключался в формировании комплексного соединения между белком и сульфатом меди в щелочной среде [12]. Расчёт концентрации белка производили по калибровочной кривой, построенной в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3. Приготовление рабочих калибровочных растворов белка

№ раствора	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Изотонический раствор NaCl, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1,0	-	100

2.9. Определение активности миелопероксидазы

Активность миелопероксидазы (МПО) измеряли с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Образец в объеме 10 мкл объединяли с 80 мкл 0,75 мМ H₂O₂ и 110 мкл раствора ТМБ (2,9 мМ ТМБ в 14,5% растворе диметилсульфоксида (ДМСО) и 150 мМ калий-фосфатном буфере, рН 5,4), и планшет инкубировали при 37° С в течение 5 мин. Реакцию останавливали путем добавления 50 мкл 2 М H₂SO₄ и измеряли поглощение при 450 нм для оценки активности МПО [9].

2.10. Оценка активности каспаз

Активность каспазы-3 и каспазы-8 измеряли с использованием наборов реактивов Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric и Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric («BioVision», США) согласно прилагаемым протоколам. В основе метода анализа активности каспазы 3 лежит процесс гидролиза пептидного субстрата ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-п-нитроанилида, с образованием п-нитроанилина, характеризующегося максимумом поглощения при 405 нм (молярный коэффициент экстинкции = 10,5). Для оценки активности каспазы 8 использовали субстрат ацетил-Ile-Glu-Thr-Asp-п-нитроанилид. Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мг белка.

2.11. Оценка уровня транскриптов генов

Экстракцию тотальной клеточной РНК осуществляли с помощью реагента «ExtractRNA» (Евроген, Россия) в соответствии с прилагаемым протоколом. Качество выделенной РНК анализировали путем электрофореза образцов в 1,5% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Визуализацию результатов проводили на трансиллюминаторе при длине волны 365 нм. Измерение концентрации РНК производили спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом. Использовали смесь праймеров олиго-(4T)15 и Random (dN)10 в соотношении 1:1, что обеспечивало образование ДНК только на матрице участков РНК, представляющих из себя транскрипты экспрессируемых генов. Для предотвращения разрушения РНК в реакционную смесь добавляли ингибиторы

РНКаз. Отжиг праймеров на РНК происходил при 70 °С в течение 10 мин, после чего температуру реакционной смеси снижали до 0 °С. Обратную транскрипцию проводили при температуре 40 °С на протяжении 40 минут, после чего прогревали пробирки 10 минут при 80 °С для инактивации M-MuLV ревертазы. Образовавшиеся продукты использовали в качестве матрицы для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). В качестве контроля реакции использовали реакционную смесь, не содержащую ревертазу [133].

Количество мРНК каждого гена было нормировано на количество мРНК генов глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и бета-актина (*Gapdh* и *Actb*), используемых в качестве хаус-кипинг генов (таблица 4). ПЦР в реальном времени проводили с помощью смеси qPCRmix-HSSYBR (Евроген, Россия) на приборе CFX Connect (BioRad, США).

Таблица 4. Список праймеров, используемых в работе

Праймеры	Последовательности
Nfkb2 F Nfkb2 R	5'- GAATTCAGCCCCCTCCATTG-3' 5'- CTGAAGCCTCGCTGTTTAGG-3'
IL1b F IL1b R	5'-TGTGATGAAAGACGGCACAC -3' 5'-CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG-3'
IL6 F IL6 R	5'-CCTGGAGTTTGTGAAGAACAААCT-3' 5'-GGAAGTTGGGGTAGGAAGGA-3'
Tnf F Tnf R	5'-TCTGTGCCTCAGCCTCTTCT-3' 5'-GGCCATGGAACTGATGAGA-3'
Ptgs2 F Ptgs2 R	5'-TACACCAGGGCCCTTCCT-3' 5'-TCCAGAACTTCTTTTGAATCAGG-3'
Aifm1 F Aifm1 R	5'- AGTCCTTATTGTGGGCTTATCAAC-3' 5'- TTGGTCTTCTTTAATAGTCTTGTAGGC-3'
Sod1 F Sod1 R	5'-CCAGCGGATGAAGAGAGG-3' 5'-GGACACATTGGCCACACC-3'
Cat F Cat R	5'-CAGCGACCAGATGAAGCA-3' 5'-GGTCAGGACATCGGGTTTC-3'
Nfe2l2 F Nfe2l2 R	5'-GCCTTGTACTTTGAAGACTGTATGC-3' 5'-GCAAGCGACTGAAATGTAGGT-3'

Праймеры	Последовательности
Foxo1 F	5'-AGATCTACGAGTGGATGGTGAAGAG-3'
Foxo1 R	5'-GGACAGATTGTGGCGAATTGAAT-3'
Gsta2 F	5'-CGGGAATTTGATGTTTGACC-3'
Gsta2 R	5'-AGAATGGCTCTGGTCTGTGC-3'
Gpx1 F	5'-TTCCCGTGC AATCAGTTC-3'
Gpx1 R	5'-GGACATACTTGAGGGAATTCAGA-3'
Gsr F	5'-TTCCTCATGAGAACCAGATCC-3'
Gsr R	5'-CTGAAAGAACCATCACTGGT-3'
Gapdh F	5'-CCCTCAAGATTGTCAGCAATG-3'
Gapdh R	5'-AGTTGTCATGGATGACCTTGG-3'
Actβ F	5'-CCCGCGAGTACAACCTTCT-3'
Actβ R	5'-CGTCATCCATGGCGAACT-3'

Последовательности праймеров были подобраны и проверены на специфичность с использованием ресурсов «NCBI Primer Blast». Синтез олигонуклеотидов по предоставленным последовательностям был произведён ЗАО «Евроген» (Россия). Температурный режим ПЦР-РВ устанавливали следующий: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, включающих стадию денатурации (95°C - 15 с), отжига праймеров (60°C - 15 с) и элонгации цепи (72°C - 30 с). По завершении ПЦР-РВ оценивали показатели пороговых циклов. Для исключения ложноположительных результатов параллельно с анализируемыми пробами ставили реакцию амплификации с отрицательно-контрольными образцами: а) на контаминацию компонентов наборов посторонней ДНК; б) на соблюдение условий чистоты при подготовке образцов для амплификации. Реакционная смесь первого отрицательного контроля (а) имела аналогичный опытным образцам состав, но в качестве исследуемого образца использовали контроль реакции обратной транскрипции. В реакционной смеси второго отрицательного контроля (б) вместо исследуемого образца добавляли воду. Специфичность амплификации оценивали по кривым плавления. Расчет относительного уровня мРНК исследуемых генов проводили с помощью $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода [210].

2.12. Гистологические исследования

Окрашивание печени гематоксилин-эозином оценивали у трех крыс из каждой группы. Крыс анестезировали, быстро извлекали печень и погружали в 10% формалин на 24 ч, затем промывали водой. После обезживания с использованием спиртов восходящей концентрации и петролейного эфира. ткань заливали парафином и помещали на ночь в холодильник на +4°C. После этого получали срезы толщиной 6 мкм с помощью ротационного микротомы HM-325 (Thermo Fisher Scientific, США). Срезы депарафинировали с помощью ксилола, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Изображения получали с помощью светового микроскопа AxioLab A1 (Zeiss, Германия). Оценивалось не менее пяти полей зрения на каждом стекле.

2.13. Иммунофлуоресцентное окрашивание

Печень была извлечена и фиксирована в 4% забуференном формалине в течение ночи при 4 °C, а затем в 30% сахарозе в течение 12 ч. Печень затем была разрезана на части толщиной 16 мкм. Срезы блокировали с помощью Serum-Free Protein Block (X0909, DAKO), после чего инкубировали с первичными антителами против NLRP3, расщепленной каспазы-1 (Adipogen life sciences, США) и расщепленного IL-1 β (Cell signaling technology, США) в течение ночи при 4 °C во влажной камере. После промывки предметные стекла инкубировали с флуоресцентными антимышиными вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре, монтировали с помощью ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Invitrogen) и просматривали с помощью лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS SP5 (Leica, Германия). Отрицательные контроли готовились путем исключения первичных антител.

2.14. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты повторяли в 10-12-кратных биологических повторностях. Аналитические повторы проводили дважды для каждой пробы. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению использовали критерий Колмогорова-Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с применением показателей описательной статистики: выборочного среднего (\bar{X}), выборочного стандартного отклонения (S), стандартной ошибки среднего ($S_{\bar{X}}$) по следующим формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}; s = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{X})^2}{n-1}}; s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (11)$$

где X – значение параметра; n – объем выборки; s – выборочное стандартное отклонение.

Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. В таблицах и на рисунках представлены данные как среднее значение \pm стандартное отклонение. Данные в группах были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Достоверно различающимися считали значения, для которых $p < 0,05$ [5].

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

3.1. Поиск дигидрохинолиновых производных с целевой биологической активностью

На начальном этапе работы была проведена оценка биологической активности широкого ряда дигидрохинолиновых производных с помощью программы анализа биологической активности PASS. Среди анализируемых соединений для настоящего исследования был отобран ДГХ1, для которого был предсказан высокий гепатопротекторный и антиокислительный потенциал. Спектр основных видов биологической активности тестируемого соединения приведен в Таблице 5.

Анализ токсичности *in silico* показал, что ДГХ1 относится к 4 классу токсичности с предсказанной ЛД50 1450 мг/кг. Вместе с тем, известно, что этоксихин, антиоксидант из этого же ряда, может проявлять прооксидантные и канцерогенные эффекты [41], что определяется особенностями метаболизма данного соединения. Так, один из метаболитов этоксихина, 2,2,4-триметил-6(2*H*)-хинолинон, привлекает особое внимание из-за его сходства с промежуточными соединениями хинонимина, которые считаются токсичными веществами, получаемыми из ацетаминофена, пара-аминофенола и родственных соединений [43,33]. Для исследования был также выбран структурный аналог ДГХ1 – ДГХ2, у которого методом введения бензоильной группы к атому азота была заблокирована способность превращаться в 2,2,4-триметил-6(2*H*)-хинолинон, что снизило вероятность токсических эффектов. Был проведен анализ токсичности ДГХ2 *in silico* с помощью сервиса ProTox-II. Для тестируемого соединения был предсказан 4 класс токсичности с ЛД50 800 мг/кг. Исходя из этого, применяемые дозировки 25 и 50 мг/кг для ДГХ1

были в 58 и 29 раз меньше, чем ЛД50, а для ДГХ2 – в 32 и 16 раз, соответственно.

Таблица 5. Прогноз основных видов биологической активности 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина

Биологическая активность соединения	Вероятность проявления биологической активности
Восстановитель	0,888
Агент для лечения аутоиммунных заболеваний	0,737
Стимулятор функции почек	0,707
Ингибитор пероксидного окисления липидов	0,697
Агонист целостности мембран	0,736
Агонист глюкокортикоидов	0,593
Агент для лечения климактерических расстройств	0,575
Скавенджер свободных радикалов	0,567
Агент для лечения офтальмологических патологий	0,565
Противовоспалительный агент	0,583

3.2. Воздействие дигидрохинолиновых производных на маркерные показатели развития токсического поражения печени у крыс

Цитолитический синдром является одним из основных маркеров интенсивности протекания патологических процессов в печени и обусловлен нарушением целостности мембран гепатоцитов, выходом в плазму крови большого количества внутриклеточных ферментов. К маркерным показателям цитолиза относится активность в сыворотке крови таких ферментов, как АлАТ, АсАТ и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП).

Результаты проведенных биохимических тестов показали, что активность маркерных ферментов резко возросла при развитии ТПП (рис. 4).

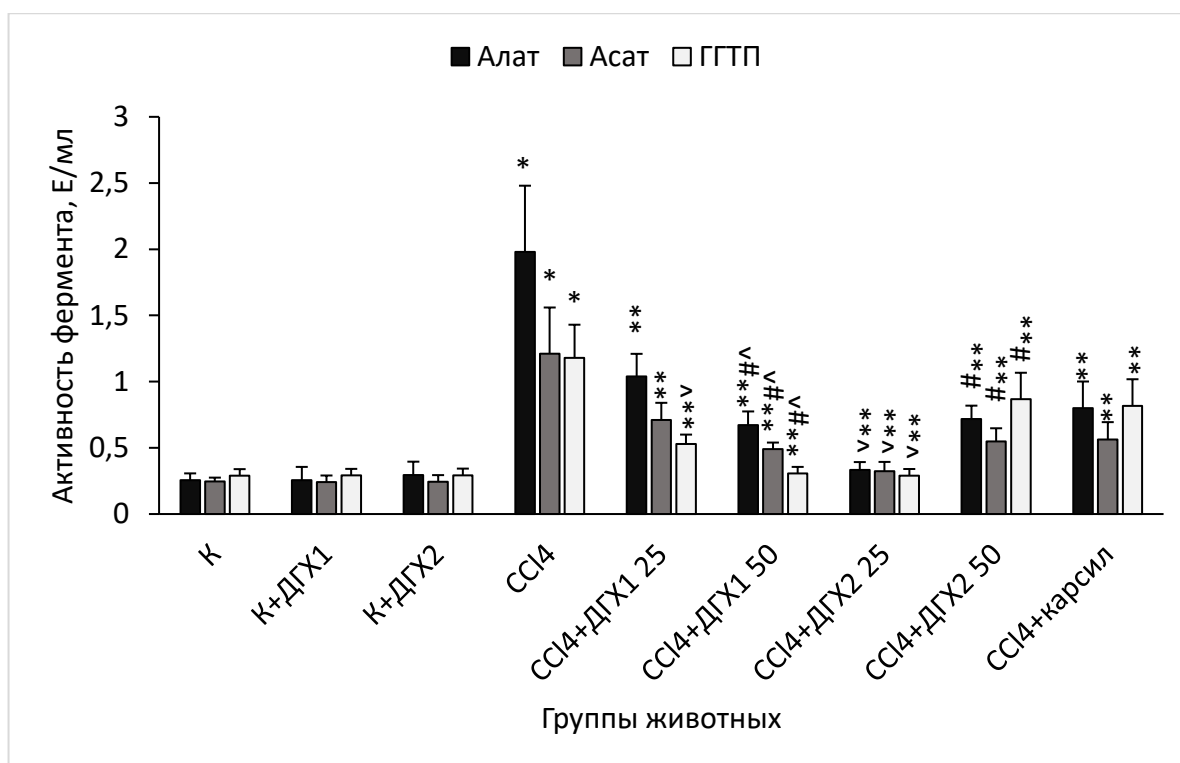


Рисунок 4. Активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке крови крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с

тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

У крыс, получавших при ТПП в качестве гепатопротектора препарат сравнения – карсил, активность АлАТ, АсАТ и ГГТП уменьшалась в 2,5, 2,1 и 1,4 раза соответственно, по сравнению с группой животных с патологией. Схожая тенденция наблюдалась при введении ДГХ1. Так, у животных, получавших в качестве протектора ДГХ1 в дозе 25 мг/кг веса, активность данных ферментов в сыворотке крови снижалась в 1,9, 1,7 и 2,2 раза относительно значений при ТПП. При этом, активность ГГТП уменьшалась более выражено, чем у крыс, которым вводили карсил. Введение ДГХ1 в более высокой дозировке, 50 мг/кг веса, приводило к достоверно более выраженным изменениям активности ферментов, в том числе относительно соответствующих параметров у крыс, которым вводили на фоне ТПП карсил. Так, активность АлАТ и АсАТ уменьшалась в 2,9 и 2,5 раз по сравнению с животными с патологией, а значения ГГТП приближались к контрольным показателям.

ДГХ2, используемый в дозе 50 мг/кг, по эффективности воздействия на маркерные ферменты поражения печени достоверно не отличался от карсила. В то же время, применение данного соединения в дозе 25 мг/кг на фоне ТПП приводило к снижению активности АлАТ, АсАТ и ГГТП в 6,0, 3,7 и 4,1 раза соответственно, что было более существенно, чем при введении на фоне патологии карсила. Таким образом, оба исследуемых производных дигирохинолина оказывали более выраженное воздействие на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов, чем препарат сравнения. При этом, ДГХ2 проявлял наибольший эффект в меньшей дозировке – 25 мг/кг.

3.3. Анализ морфологических изменений в печени крыс при развитии токсического поражения печени и воздействии дигидрохинолиновых производных

Как известно, за счет цитотоксического действия на гепатоциты CCl_4 вызывает гистопатологические изменения в паренхиме. Данный гепатотоксин вызывает резко выраженные нарушения клеток печени вокруг центральных вен, дистрофические изменения различной степени, включая явления некробиоза и некроза обширных областей паренхимы [100]. Выявляются признаки набухания митохондрий и цистерн эндоплазматической сети, а также полный распад органелл, вызывающий изменения балочной структуры паренхиматозной ткани печени [205].

В ходе проведённых нами исследований срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, было показано отсутствие каких-либо признаков повреждения у животных контрольной группы (рис. 5А). У группы животных с ТПП наблюдалось тяжёлое гепатоцеллюлярное повреждение, характеризующееся обширными участками некроза и значительной потерей архитектуры ткани (рис. 5Б). В свою очередь, введение ДГХ1 в дозе 50 мг/кг крысам с ТПП способствовало снижению выраженности некроза ткани печени и нарушения её архитектуры (рис. 5В). Ткань печени контрольных животных, получавших ДГХ1, соответствовала гистологической картине крыс первой группы, где большинство гепатоцитов были нормальными с ацидофильной цитоплазмой и везикулярными ядрами (рис. 5Г).

Позитивный эффект на морфологию ткани печени при ТПП оказывал также ДГХ2. Так, на фоне введения данного соединения визуализировалось менее тяжелое повреждение печени с менее существенной, очаговой гепатоцеллюлярной дегенерацией (рис. 6В), по сравнению с гистопатологическими изменениями у животных с ТПП (рис. 6Б). Введение

карсила животным с поражением печени также оказывало протекторный эффект на морфологию ткани печени (рис. 6Г), который был несколько менее выражен по сравнению с действием тестируемых хинолиновых производных.

В контрольной группе животных, получавших ДГХ2, патологические изменения отсутствовали (рис. 6Д), а гистологическая картина была схожа с таковой у крыс, получавших только крахмал (рис.6А).

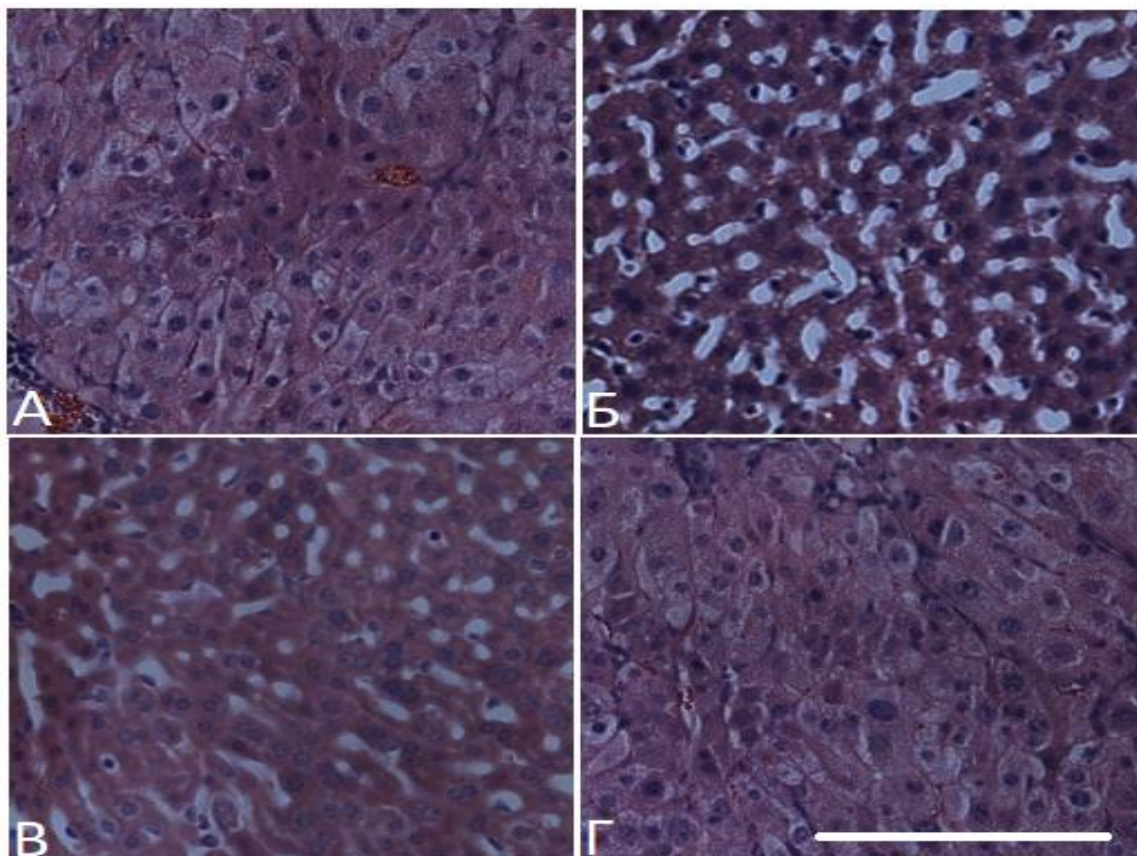


Рисунок 5. Срезы тканей печени, окрашенные гематоксилином и эозином, крыс контрольной группы (А), животных с тетрахлорметановым поражением печени (Б), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (В), а также контрольных животных, подверженных введению 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина в дозе 50 мг/кг (Г). Шкала на рисунке соответствует 100 мкм.

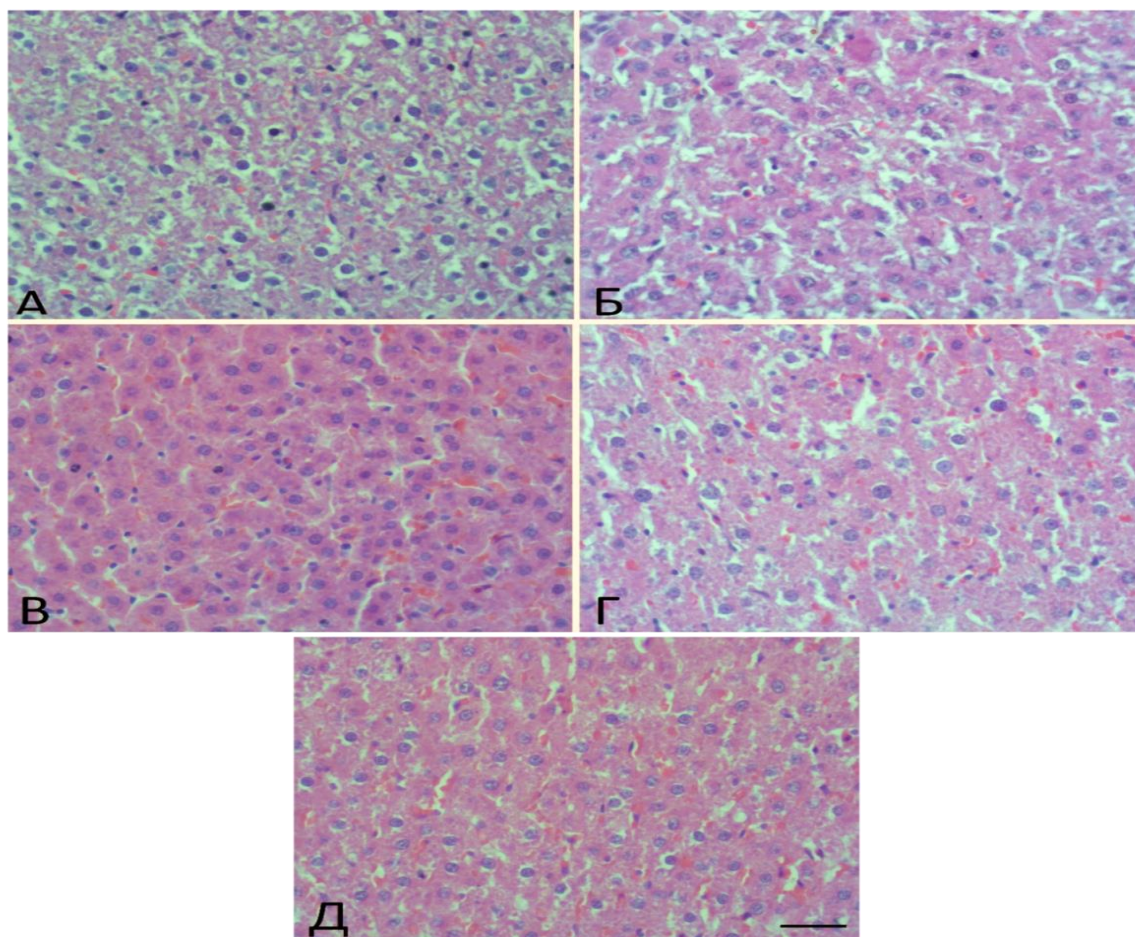


Рисунок 6. Срезы тканей печени, окрашенные гематоксилином и эозином, крыс контрольной группы (А), животных с тетрачлорметановым поражением печени (Б), крыс с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (В), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (Г), а также контрольных животных, подверженных введению 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина в дозе 50 мг/кг (Д). Шкала на рисунке соответствует 200 мкм.

Таким образом, гистологические исследования подтверждают предположение о наличии гепатопротекторной активности у ДГХ1 и ДГХ2, реализующейся при ТПП и превосходящей по эффективности действие карсила.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

4.1. Влияние дигидрохинолиновых производных на интенсивность биофлуоресценции в печени и сыворотке крови крыс с токсическим поражением печени

С целью выяснения механизмов проявления дигидрохинолиновыми производными гепатопротекторной и антиокислительной активности был проведен анализ состояния оксидативного статуса в печени и сыворотке крови животных экспериментальных групп.

Окислительный стресс, как известно, является центральным фактором, способствующим инициации и прогрессированию поражения печени [121, 16]. Паренхиматозные клетки печени наиболее подвержены повреждениям, вызванным АФК [60]. В CCl_4 -индуцированном цитолизе гепатоцитов ПОЛ компонентов мембран под действием свободных радикалов, образованных из метаболитов CCl_4 , имеет ключевое значение. Патогенез ТПП в основном связан с реактивным образованием свободных радикалов в результате дегалогенирования CCl_4 с помощью CYP2E1. Эти реактивные свободные радикалы, в том числе трихлорметильный радикал ($CCl_3\bullet$) и трихлорметилпероксирадикал ($CCl_3OO\bullet$), вызывают нарушение антиоксидантного статуса печени и усиление ПОЛ [158]. Разрушение мембран гепатоцитов приводит к выделению печеночных ферментов, таких как АлАТ, АсАТ, и ГГТП, в кровеносное русло. Экспериментальные и клинические данные указывают на то, что окислительный стресс также играет критическую роль в развитии лекарственного повреждения печени [180, 155].

Кроме прочего, окислительный стресс, вызванный CCl_4 , приводит к нарушениям в клетках паренхимы, внеклеточного матрикса печени, активации иммунной системы. При этом наблюдается значительное повышение уровня

гормона роста, цитокинов и хемокинов, что приводит к фиброзу и хроническим заболеваниям печени [64].

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления, а также общую антиоксидантную активность у экспериментальных животных оценивали с помощью метода биофлюоресценции. Как показали проведенные исследования, при развитии ТПП наблюдалось возрастание относительно контроля значений I_{\max} , S и $tg\alpha_2$ (табл. 6).

Результаты анализа воздействия дигидрохинолиновых производных показали, что введение обоих тестируемых соединений в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к значимому снижению показателей БХЛ (см. табл. 6). При этом, ДГХ1 был более эффективен в дозе 50 мг/кг. Так, у животных, получавших данное соединение в большей дозировке на фоне ТПП, показатели I_{\max} , S и $tg\alpha_2$ снижались соответственно в 1,6, 2,3 и 1,3 раза в печени, и в 2,0, 2,4 и 1,9 раза в сыворотке крови. В то же время, для ДГХ2 не было показано дозозависимого воздействия на показатели БХЛ, за исключением I_{\max} в сыворотке крови. Введение данного соединения в дозе 50 мг/кг способствовало снижению I_{\max} , S и $tg\alpha_2$ в сыворотке крови в 2,4, 2,3 и 2,2 раза, а в печени животных – в 2,2, 2,4 и 1,9 раза, относительно показателей при ТПП. Использование в качестве гепатопротектора карсила при поражении печени также приводило к уменьшению показателей БХЛ. Однако, ДГХ2 по сравнению с карсилом более эффективно уменьшал показатели I_{\max} и $tg\alpha_2$ в печени, а при использовании в дозе 50 мг/кг – ещё и I_{\max} и $tg\alpha_2$ в сыворотке крови животных. В свою очередь, ДГХ1 при использовании в дозе 50 мг/кг оказался эффективнее карсила только по отношению к I_{\max} в печени лабораторных животных.

Таблица 6. Параметры биофлюоресценции в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (CCl_4), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (CCl_4 +ДГХ1 25) и 50 мг/кг

(CCl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (CCl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (CCl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (CCl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

Группы животных	Показатель					
	I _{max} , мВ		S, мВ*с		tgα ₂	
	а	б	а	б	а	б
К	25,2±6,3	42,1±8,4	307,7±76,9	92,3±4,6	13,3±2,7	8,1±1,6
К+ДГХ1	23,5±4,9	45,0±6,8	278,2±69,1	90,2±16,2	11,7±2,2	9,1±1,8
К+ДГХ2	23,6±5,933	41,6±6,7*	292,3±73,1	91,4±18,3	11,3±2,3	6,5±1,3
CCl ₄	51,2±12,8*	86,7±17,3*	739,8±184,9*	235,9±11,8*	29,5±5,9*	16,7±3,3*
CCl ₄ +ДГХ1 25	34,1±6,3** #	61,9±12,1**	411,2±82,1** #	124,2±22,9**	22,7±5,6** #	13,9±2,6**
CCl ₄ +ДГХ1 50	25,9±4,8**	53,7±6,3** ^	310,3±62,9**	101,75±20,0**	15,8±2,2**	12,8±2,2**
CCl ₄ +ДГХ2 25	35,1±8,8** #	44,0±6,2** ^	305,0±76,3**	120,9±24,2**	15,0±2,8**	10,2±2,3** ^
CCl ₄ +ДГХ2 50	21,7±5,4** ^	39,0±5,4** ^	317,2±79,3**	98,7±19,7**	13,4±3,4** ^	8,9±1,8** ^
CCl ₄ +карсил	28,0±7,03**	63,6±12,7**	314,1±78,5**	112,1±22,4**	15,4±3,1**	14,1±2,8**

В табл. 6 * - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы

крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, оба исследуемых соединения изменяли показатели БХЛ в направлении контрольных значений при ТПП. При этом, для ДГХ1 был выражен дозозависимый эффект по отношению к параметрам БХЛ в сыворотке крови. Необходимо отметить, что из тестируемых соединений более эффективно изменял анализируемые значения по сравнению с карсилом ДГХ2.

4.2. Окислительная модификация белков в печени и сыворотке крови крыс при введении 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне индукции тетрахлорметанового повреждения печени

Известно, что в качестве основных индукторов окислительной модификации белков (ОМБ) выступают реактивные радикалы кислорода, увеличение содержания свободного железа, а также продуктов ПОЛ на фоне снижения антиоксидантной защиты.

Окислительный стресс вызывает реакции гликооксидации, модификации свободных аминокислотных групп в белках, что приводит к образованию конечных продуктов гликирования. Данные продукты обеспечивают сшивание белковых молекул, а также активируют рецепторы к конечным продуктам гликирования, вызывая воспалительную реакцию и тем самым способствуя прогрессированию патологии печени [72].

Согласно полученным результатам, развитие ТПП сопровождалось увеличением содержания карбонильных остатков аминокислот в белках в печени и сыворотке крови в 1,3 и 1,2 раза соответственно, относительно показателей контрольных животных (рис. 7). Вероятно, наблюдаемые

изменения являлись следствием возрастания интенсивности процессов свободнорадикального окисления биомолекул при развитии ТПП. Известно, что АФК и их производные способны к окислению тиоловых групп белков с образованием производных сульфеновой, сульфиновой и сульфоновой кислот. Помимо этого, остатки лизина, аргинина, гистидина, пролина, глутаминовой и аспарагиновой кислот при взаимодействии с реактивными радикалами кислорода образуют карбонильные группы. Карбонильные группы в альдегидах и кетонах являются одними из реакционноспособных функциональных групп. Они способны к взаимодействию с аминокетонами с образованием Шиффовых оснований, что в итоге приводит к формированию поперечных сшивок между белковыми молекулами и нарушению их активности [69].

Введение ДГХ1 животным с ТПП сопровождалось уменьшением уровня ОМБ в печени, тогда как использование в качестве протектора ДГХ2 способствовало снижению данного показателя и в печени, и в сыворотке крови. Так, администрация крыс с патологией ДГХ2 в дозе 25 мг/кг приводила к снижению содержания карбонильных остатков аминокислот в белках в сыворотке крови и печени в 1,4 и 1,5 раза, а применение вещества в дозе 50 мг/кг – в 1,2 и 1,4 раза соответственно. Кроме этого, использование ДГХ2 в обеих дозах вызывало более существенное снижение уровня ОМБ в печени по сравнению с карсилом, при введении которого данный показатель снижался на 10%. ДГХ1, используемый в дозе 50 мг/кг, был также более эффективен по сравнению с карсилом.

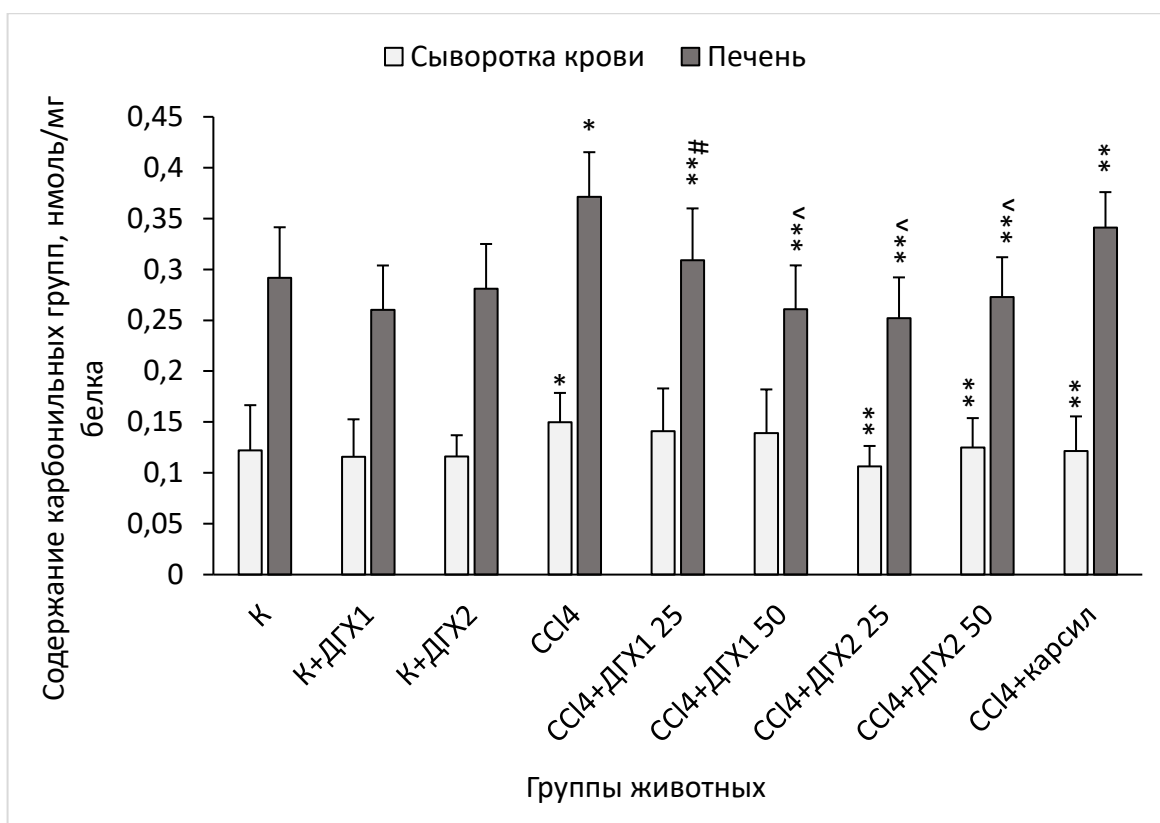


Рисунок 7. Уровень окислительной модификации белков в сыворотке крови и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с

тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, среди исследуемых дигидрохинолиновых производных и препарата сравнения при ТПП наиболее эффективно тормозил интенсивность образования карбонильных групп в белках ДГХ2.

4.3. Содержание диеновых конъюгатов в печени и сыворотке крови крыс при введении 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне индукции тетрахлорметанового повреждения печени

CCl_4 , превращаясь в трихлорметоксипероксильный радикал в процессе метаболизма цитохромом P450 2E1 (Cyp2e1) в центрилобулярных гепатоцитах, индуцирует активацию звездчатых клеток печени [158]. В ходе развивающегося при этом окислительного стресса активизируется ПОЛ, приводящее к повреждению гепатоцеллюлярной мембраны, высвобождению провоспалительных хемокинов и цитокинов, и развитию ещё более сильного воспаления [64].

В ходе проведённых нами исследований было установлено, что развитие ТПП сопровождалось увеличением в сыворотке крови и печени крыс содержания первичных продуктов ПОЛ – ДК, в 2,1 и 1,7 раза относительно контроля (рис. 8).

Введение животным тестируемых дигидрохинолиновых производных и карсила приводило к достоверному снижению концентрации ДК. При этом, ДГХ1 в дозе 50 мг/кг оказывал более сильный эффект на данный показатель по сравнению с карсилом. Так, на фоне введения тестируемого хинолинового производного уровень ДК снижался в сыворотке крови и печени крыс в 1,9 и 1,6 раза соответственно, относительно значений при ТПП.

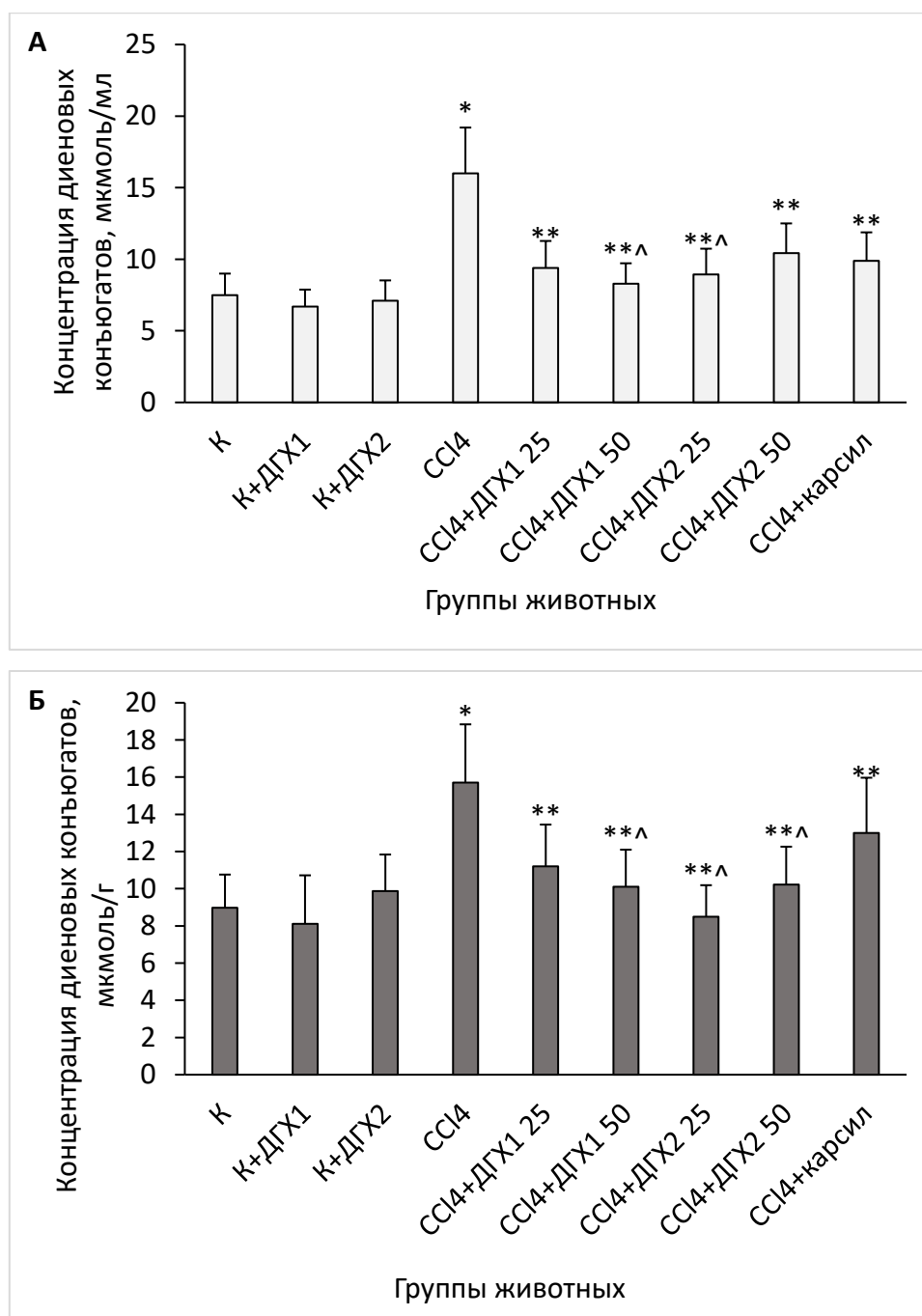


Рисунок 8. Содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных

животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

ДГХ2 вызывал более выраженное по сравнению с карсилом понижение концентрации ДК в сыворотке крови при использовании в дозе 25 мг/кг: содержание первичных продуктов ПОЛ изменялось в 1,8 раза относительно значений при ТПП. В печени животных наблюдалось более существенное снижение уровня ДК в случае применения ДГХ2 в обеих дозах: изменения относительно значений при патологии происходили в 1,8 и 1,5 раза при использовании доз 25 и 50 мг/кг соответственно.

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что тестируемые дигидрохинолиновые производные более эффективно снижают уровень первичных продуктов ПОЛ при ТПП по сравнению с карсилом, причём наилучший эффект был зарегистрирован для ДГХ2.

4.4. Воздействие 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в печени и сыворотке крови крыс при индукции тетрахлорметанового повреждения печени

В настоящее время известно, что некоторые ферменты окислительного метаболизма способны оказывать опосредованное действие на процессы

генерации АФК. В частности, свободные радикалы, чрезмерно образующиеся при окислительном стрессе, разрушают железо-серный кластер активного центра АГ, что сопровождается угнетением активности фермента [187, 17]. В то же время, при ингибировании АГ накапливается цитрат, который обладает способностью хелатировать Fe^{2+} , препятствуя его вступлению в прооксидантные реакции с образованием гидроксильного радикала [10].

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Так, активность АГ резко снижалась при развитии ТПП: в сыворотке – в 1,7 раза, в печени – в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 9). В группе животных, получавших ДГХ2 в дозе 25 мг/кг на фоне ТПП, в сыворотке крови исследуемый показатель существенно не изменялся. Тем не менее, в печени животных данной группы активность АГ возрастала в 1,8 раза, что было более существенно по сравнению с показателями у животных, получавших при патологии карсил. Введение ДГХ2 в дозе 50 мг/кг на фоне ТПП обеспечивало достоверное увеличение активности АГ и в печени, и в сыворотке крови: данный показатель возрастал в обоих анализируемых образцах в 1,7 раза. В свою очередь, ДГХ1 способствовал повышению активности АГ при использовании в обеих исследуемых дозах у животных с ТПП. При этом, достоверно значимые отличия в эффективности его действия по сравнению с карсилом наблюдались по отношению к активности фермента в сыворотке крови. Так, введение ДГХ1 крысам с патологией в дозе 25 и 50 мг/кг приводило к увеличению активности АГ в сыворотке в 1,5 и 1,6 раза. При этом прослеживались схожие тенденции в изменении удельной активности фермента (приложение 2, рис. 1).

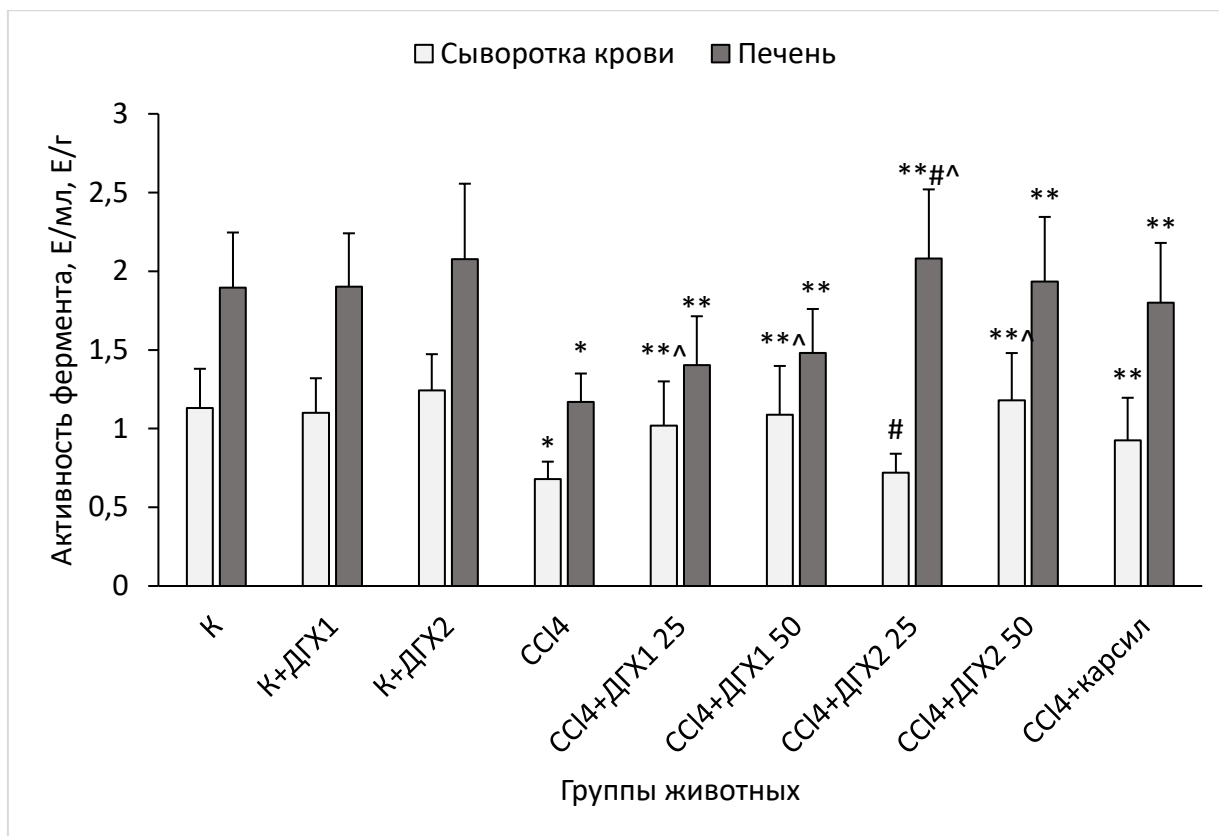


Рисунок 9. Активность аконитатгидратазы, представленная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы печени, крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с

тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

На фоне ингибирования активности АГ при индукции ТПП у крыс наблюдалось увеличение концентрации субстрата данного фермента – цитрата. В сыворотке крови уровень данного интермедиата увеличивался в 2,2 раза, а в печени – в 2,0 раза, по сравнению с контролем (рис. 10).

Использование в качестве протекторного средства ДГХ1 достоверно уменьшало концентрацию цитрата у животных с ТПП. Однако, статистически значимых отличий от группы животных с патологией, получавших карсил, выявлено не было. Так, применение ДГХ1 в дозе 50 мг/кг приводило к снижению концентрации цитрата в сыворотке крови и печени в 1,6 и 1,7 раза относительно значений при патологии. Введение ДГХ2 в дозе 25 мг/кг не способствовало значимому изменению содержания цитрата в сыворотке крови крыс с ТПП, тогда как использование дозы 50 мг/кг приводило к снижению данного показателя в 2,0 раза. В печени животных с патологией введение ДГХ2 в дозе 25 мг/кг вызывало уменьшение уровня цитрата в 1,6 раза, а использование вещества в дозе 50 мг/кг приводило к понижению показателя в 2,1 раза, что значимо отличалось по эффективности от действия карсила.

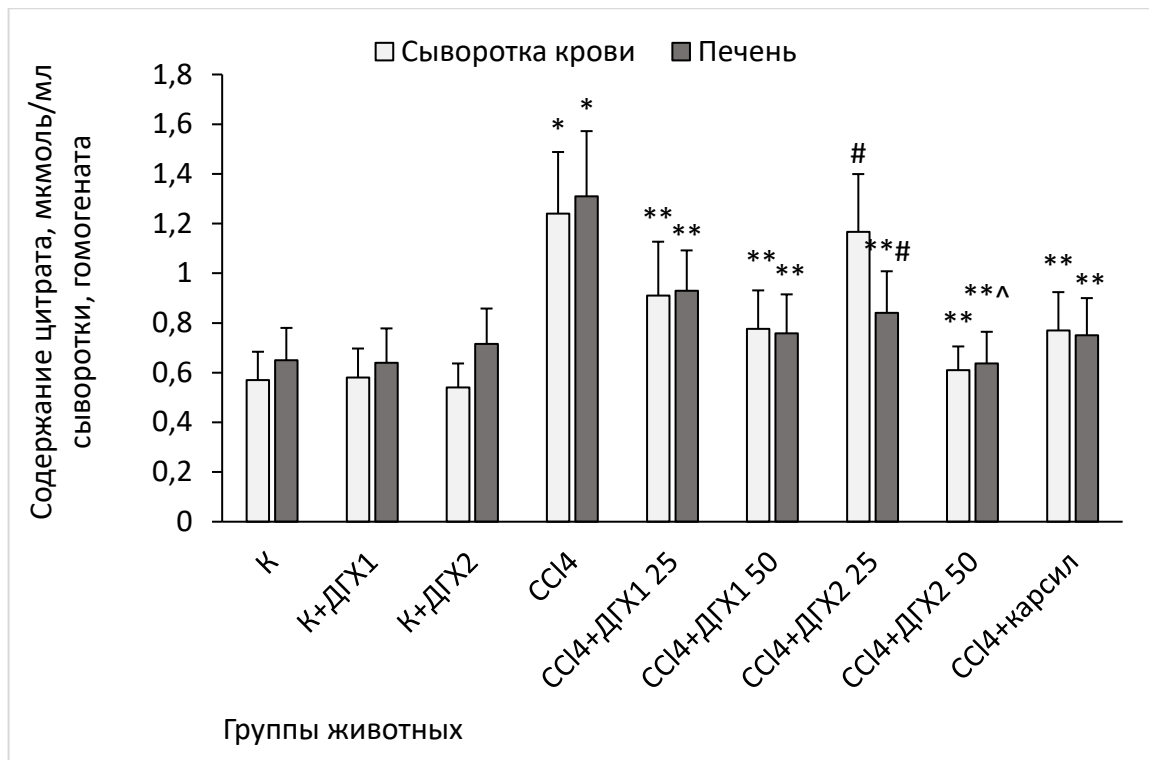


Рис. 10. Концентрация цитрата в сыворотке крови и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Вероятно, обнаруженные изменения показателей БХЛ, содержания ДК и карбонильных остатков аминокислот в белках, а также активности АГ и концентрации цитрата были связаны с наличием у тестируемых дигидрохинолиновых производных антиоксидантной активности, проявляющейся в условиях ТПП. Известно, что в печени в ходе метаболизма CCl_4 образуются радикалы $\text{CCl}_3\cdot$ и $\text{CHCl}_2\cdot$ [145], которые вызывают существенное нарушение обмена липидов, активизацию ПОЛ и увеличение концентрации продуктов данного процесса, а также способствуют развитию стеатоза или ожирения печени. В условиях высокого парциального давления кислорода в печени в ходе метаболизма CCl_4 образуется радикал $\text{CCl}_3\text{-OO}\cdot$, активирующий апоптоз в гепатоцитах. Помимо этого, повреждение компонентов мембран клеток под действием свободных радикалов стимулирует секрецию провоспалительных хемокинов и цитокинов с последующим развитием воспалительного повреждения печени [64]. В свою очередь, ДГХ1, по-видимому, способен снижать уровень образующихся в ходе метаболизма CCl_4 радикалов напрямую или путем поддержания пула других антиоксидантов, судя по его предсказанной восстановительной способности (Reductant, вероятность 0,888; Lipid peroxidase inhibitor, вероятность 0,697). Помимо этого, для тестируемого соединения спрогнозирована достаточно высокая способность поддержания целостности биологических мембран (Membrane integrity agonist, вероятность 0,736). В литературе имеются сведения о наличии антиоксидантных свойств у различных производных дигидрохинолина. Путём виртуального скрининга высокая антиокислительная активность была обнаружена у нескольких веществ дигидрохинолинового ряда [65]. Выявлена способность 6,6-метилен-бис (2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина) и 6,6-метилен-бис (2,2-диметил-4-метансульфоновой кислоты натрия-1,2-дигидрохинолина) снижать концентрацию продуктов ПОЛ при печёночных патологиях, вызванных галактозамином и CCl_4 [70]. Известна также способность производных 8-

гидроксихинолина понижать концентрацию β -амилоида, хелатировать ионы меди и выступать в роли скавенджеров свободных радикалов [71]. Применение карсила в условиях ТПП способствовало несколько более существенному увеличению активности АГ в печени относительно показателей у животных, получавших ДГХ1. По-видимому, наблюдаемый эффект карсила был связан с особенностями проявления биологической активности основным компонентом данного лекарственного средства – силимарина. В частности, было показано, что применение силимарина сопровождается увеличением сопряжения окисления и фосфорилирования, возрастанием активности клеточного дыхания и повышением интенсивности метаболизма интермедиатов цикла Кребса в условиях экспериментального торможения β -окисления жирных кислот [4].

ДГХ2, судя по всему, обладает схожими антиоксидантными свойствами с ДГХ1. Не смотря на то, что в ходе компьютерного анализа ДГХ2 была спрогнозирована более высокая его токсичность по сравнению с ДГХ1 (ЛД50 800 мг/кг против 1450 мг/кг), введение в структуру бензольного кольца с целью блокирования образования 2,2,4-триметил-6(2*H*)-хинолинона, всё же, способствовало увеличению гепатопротекторного потенциала соединения. Так, ДГХ2 при использовании в меньшей дозе (25 мг/кг) демонстрировал большую эффективность по отношению к маркерным показателям цитолиза гепатоцитов в сравнении карсилом. ДГХ1 в данном ключе также был эффективнее препарата сравнения, но при введении в более высокой дозе – 50 мг/кг. Кроме того, ДГХ2 в обеих дозах существенно карсила изменял показатели интенсивности свободнорадикального окисления, тогда как ДГХ1 проявлял такое свойство только в дозе 50 мг/кг.

Таким образом, исследуемые дигидрохинолиновые производные при ТПП обладали более выраженным гепатопротекторным и антиокислительным потенциалом по сравнению с карсилом. ДГХ2 по совокупности свойств оказался более эффективным протектором.

ГЛАВА 5. ИНТЕНСИВНОСТЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ И ВВЕДЕНИИ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА И 1-БЕНЗОИЛ-6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА

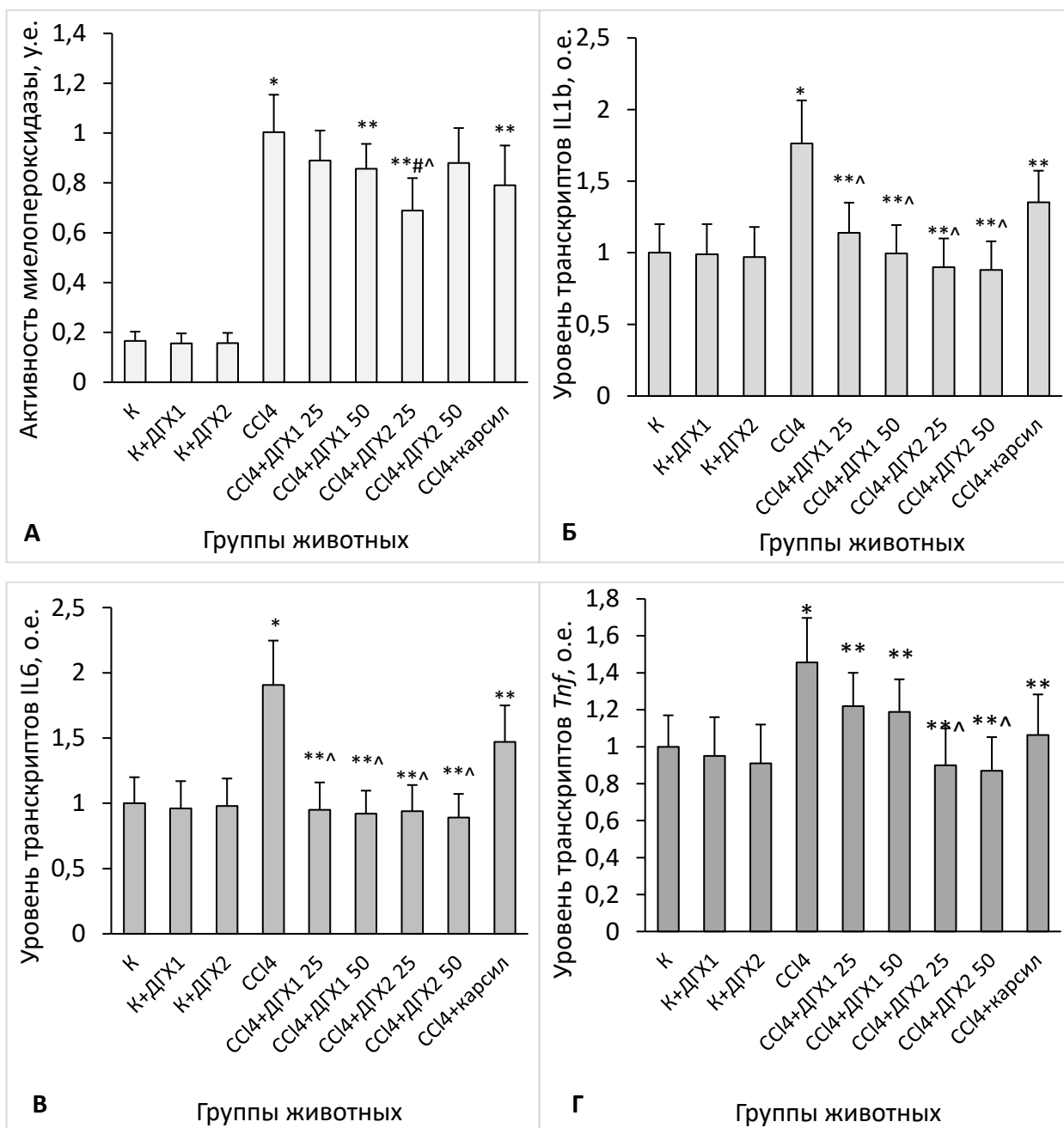
Активизация свободнорадикального окисления, вызванная CCl_4 , сопровождается синтезом воспалительных цитокинов, таких как $IL-1\beta$, $IL-6$ и $TNF-\alpha$, а также, активацией миелопероксидазы (МПО), отражающей степень нейтрофильной инфильтрации печени, и циклооксигеназы-2 (COX2) – фермента, который метаболизирует арахидоновую кислоту до простагландинов. Данные соединения оказывают различное влияние на печень, но многие продукты, образующиеся под действием COX2, усиливают воспаление и портальную гипертензию [120,84]. Центральную роль в воспалительной реакции и запуске экспрессии важнейших воспалительных генов играет транскрипционный фактор NF- κ B, который регулирует различные медиаторы воспаления, включая $TNF-\alpha$, $IL-18$, $IL-6$ и $IL-1\beta$ [197]. Комплекс ИКК (IkB kinase) активируется CCl_4 через сигнальный путь TLR4 (Toll-like receptor 4) и фосфорилирует $I\kappa B\alpha$ в цитоплазме. $I\kappa B\alpha$ затем подвергается протеасомной деградации, что приводит к высвобождению NF- κ B из комплекса ИКК и его транслокации в ядро для последующего усиления экспрессии целевых генов, участвующих в воспалительном ответе, включая ген *Nfkb2* субъединицы-предшественника p100 самого транскрипционного фактора NF- κ B [199]. Таким образом, подавление сигнального пути NF- κ B является одной из основных мишеней для ослабления воспалительного ответа и связанных с ним заболеваний.

Как показали результаты нашей работы, индукция ТПП у крыс сопровождалась возрастанием активности МПО в печени в 6,0 раза, а также увеличением уровня транскриптов генов *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ptgs2* и *Nfkb2* (кодирующих, соответственно, $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$, COX2 и предшественник

p100 фактора NF- κ B) в 1,8, 1,9, 1,5, 2,4 и 1,3 раза, относительно показателей контроля (рис. 11). Полученные нами данные об индукции генов цитокинов при ТПП согласуются с имеющимися литературными данными о развитии воспаления при патологиях подобного рода [125]. Кроме того, из литературы известно, что увеличение уровней TNF- α и IL-1 β соотносится с гистопатологическими признаками некроза печени и повышением активности АлАТ и АсАТ в сыворотке крови. Следовательно, ингибирование высвобождения провоспалительных цитокинов представляет собой целесообразную терапевтическую стратегию для уменьшения воспаления и повреждения печени [130].

Наше исследование показало, что введение дигидрохинолиновых производных приводило к снижению показателей, отражающих интенсивность воспалительных процессов. Так, наблюдалось значимое снижение активности МПО у крыс с ТПП при введении ДГХ1 в дозе 50 мг/кг и ДГХ2 в дозе 25 мг/кг, происходившее соответственно в 1,2 и 1,5 раза. При этом, использование в качестве протектора ДГХ2 обеспечивало более существенное снижение активности МПО по сравнению с карсилем (рис. 11 А). Уровень транскриптов *I1b* и *I6* снижался сильнее у всех групп животных, получавших на фоне ТПП дигидрохинолиновые производные, по сравнению с крысами, получавшими карсил (рис. 11 Б, рис. 11 В). Так, содержание мРНК *I1b* и *I6* падало при применении ДГХ1 в дозе 25 мг/кг в 1,5 и 2,0 раза, в случае применения дозы 50 мг/кг – в 1,8 и 2,1 раза, относительно данных при патологии. Концентрация мРНК *I1b* и *I6* при введении на фоне ТПП ДГХ2 в дозе 25 мг/кг снижалась в 2,0 раза, а при введении ДГХ2 в дозировке 50 мг/кг – в 2,0 и 2,1 раза. Уровень транскриптов *Tnf* уменьшался достоверно во всех группах крыс с патологией, получавших протекторы (рис. 11 Г). Однако, эффективнее карсила в отношении транскриптов *Tnf* выступал только ДГХ2, при использовании которого в дозах 25 и 50 мг/кг данный показатель снижался в 1,6 и 1,7 раза относительно значений при патологии. Та же тенденция

наблюдалась и по отношению к содержанию мРНК *Ptgs2*: данный показатель снижался при использовании ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг в 2,2 и 2,4 раза (рис. 11 Е). Содержание транскриптов *Nfkb2* достоверно снижалось под действием всех протекторов относительно значений при ТПП (рис. 11 Д). Эффективнее же карсила по отношению к данному показателю проявил себя ДГХ1 в дозе 50 мг/кг, обеспечивающий его снижение в 1,4 раза по сравнению с данными при ТПП.



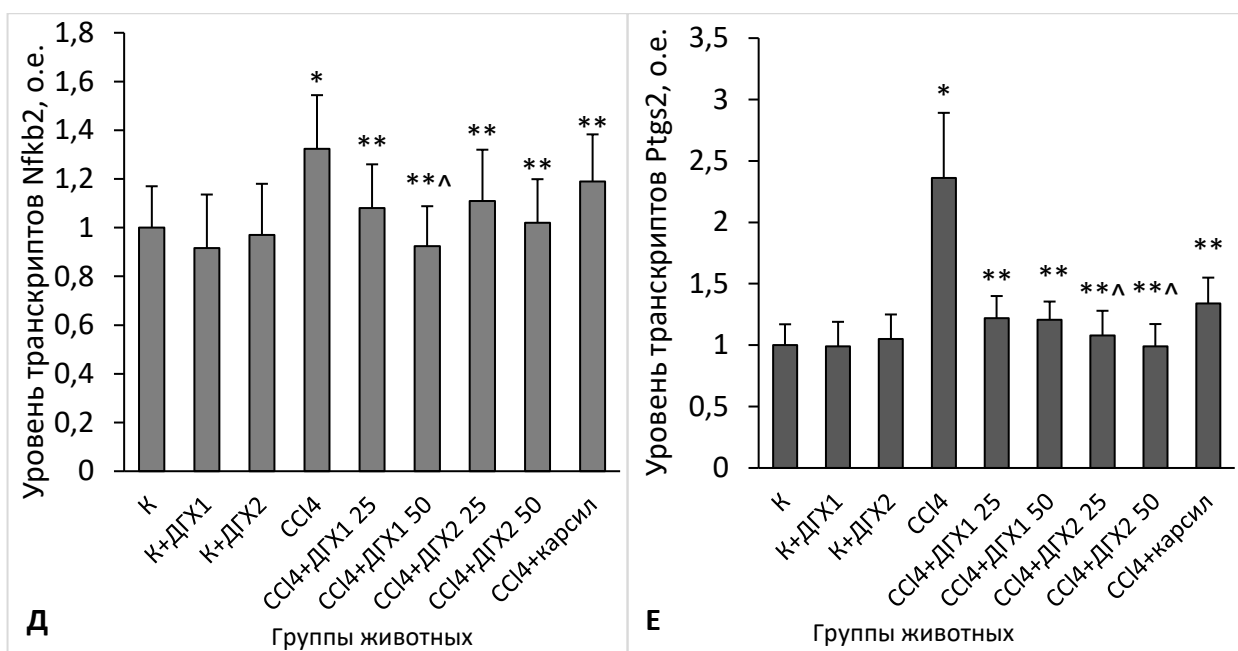


Рисунок 11. Активность миелопероксидазы (А) и уровень мРНК генов *Il1b* (Б), *Il6* (В), *Tnf* (Г), *Nfkb2* (Д) и *Ptgs2* (Е) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, результаты работы продемонстрировали, что ДГХ1 и ДГХ2 способны снижать активность МПО в ткани печени после введения CCl_4 , что предполагает уменьшение нейтрофильной инфильтрации и последующего образования АФК. Наряду с этим, использование тестируемых соединений способствовало снижению уровня мРНК COX2 и генов провоспалительных цитокинов. Действительно, судя по предсказанию биологической активности, ДГХ1 обладает противовоспалительными свойствами, для тестируемого соединения предсказана вероятность (0,697) ингибирования пероксидазы липидов – одного из двух активных центров каталитического домена COX2, участвующего в восстановлении широкого ряда гидропероксидов и биосинтезе простагландинов [166], способных активизировать воспалительный процесс.

С целью уточнения механизмов действия дигидрохинолиновых производных на регуляцию воспалительного ответа была проведена оценка функционирования NLRP3 сигнального пути у крыс с ТПП, получавших ДГХ1. NLRP3 представляет собой мультибелковый внутриклеточный комплекс, активирующийся при инфекции или стрессе. Активированная инфламасома запускает созревание провоспалительных цитокинов с последующей активацией иммунной защиты. Показано, что воспаление, вызванное активацией NLRP3 инфламасомы имеет место при остром повреждении печени [119, 198, 104, 195.] NLRP3-инфламасома, образуя комплекс с адаптерной молекулой ASC, активирует сериновую протеазу каспазы-1, которая расщепляет про-IL-1 β и про-IL-18 до их зрелых секретлируемых форм IL-1 β и IL-18 [75, 106]. Сам же IL-1 β функционирует как регуляторный медиатор провоспалительных цитокинов, который играет центральную роль в реализации врожденных и адаптивных иммунных реакций [214].

Как показали наши исследования, экспрессия продуктов NLRP3 инфламасомы – активированной каспазы-1 и расщепленного IL-1 β – была

значительно повышена у животных с ТПП по сравнению с контролем (рис. 12). В свою очередь, введение ДГХ1 тормозило активацию NLRP3, в также приводило к снижению уровня активированной каспазы-1 и зрелой формы IL-1 β .

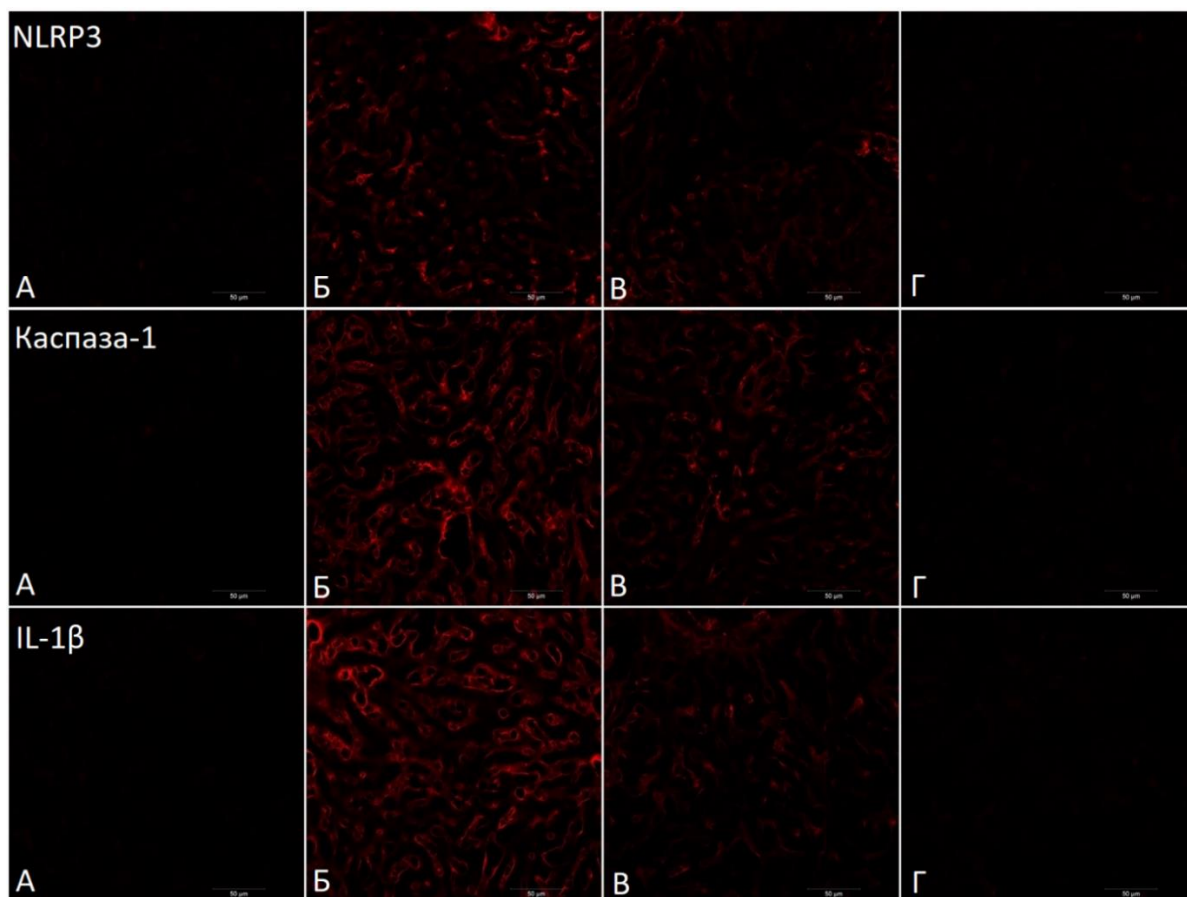


Рисунок 12. Экспрессия NLRP3-инфламмосомы, зрелой каспазы-1 и расщеплённого IL-1 β в печени крыс контрольной группы (А), животных с тетрахлометановым повреждением печени (Б), крыс, получавших на фоне патологии 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (В), а также контрольных животных, подверженных введению 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина в дозе 50 мг/кг (Г). Шкала на рисунках соответствует 50 мкм.

Судя по всему, в качестве важного механизма реализации гепатопротекторного и противовоспалительного эффекта дигирохиолиновых производных могла выступать их способность ингибировать активацию

NLRP3-инфламмосомы. По-видимому, данный эффект, наряду с возможностью прямого обезвреживания реактивных молекул, составлял главную причину позитивного воздействия тестируемого соединения на выраженность окислительного стресса – центрального патогенетического фактора ТПП. Наряду с этим, ингибирование NLRP3-инфламмосомы является существенным фактором торможения каспаза-1-опосредованного пироптоза [101], играющего значимую роль в патологиях печени [202].

Таким образом, оба тестируемых соединения обладают высокой противовоспалительной активностью и по отношению к ряду показателей развития воспалительного процесса представляются более эффективными протекторами, чем карсил.

ГЛАВА 6. ВОЗДЕЙСТВИЕ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА И 1-БЕНЗОИЛ-6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

В настоящее время хорошо известно, что АФК могут вызывать апоптоз. CCl_4 также способен индуцировать апоптоз печени митохондриально-зависимыми и внешними путями. В связи с этим очевидно, что прямое снижение уровней АФК и ингибирование окислительного стресса имеет существенное значение для профилактики и лечения острого повреждения печени [190]. Ключевыми исполнителями программы как митохондриально-зависимого, так и лиганд-зависимого апоптоза являются каспазы – протеолитические ферменты, относящихся к семейству цистеиновых протеаз, расщепляющих белки после остатков аспартата [128].

Как было показано в ходе наших исследований, индукция ТПП была сопряжена со значительным возрастанием активности индукторной каспазы-8, участвующей в передаче апоптотического сигнала от рецепторов лигандов смерти, и эффекторной каспазы-3 (рис. 13 А, Б). Так, у животных с патологией активность каспазы-3 и каспазы-8 увеличивалась в 2,4 и 2,3 раза, по сравнению с контролем. Каспаза 3 ответственна за расщепление нескольких критических ядерных мишеней в апоптотическом каскаде, включая ингибитор активируемой каспазой дезоксиноклеазы, которая обуславливает фрагментацию ядра, и PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), приводящий к дефектной функции восстановления ДНК. Сообщалось, что апоптоз гепатоцитов печени наблюдался при остром повреждении печени, вызванном CCl_4 , и ингибирование активированной каспазы-3 и PARP рассматривалось в качестве гепатопротекторного подхода [118]. При CCl_4 -индуцированном повреждении АФК атакуют различные гепатоцеллюлярные структуры,

вызывая высвобождение провоспалительных медиаторов, в частности TNF- α , которые способствуют развитию апоптоза. TNF- α активирует Fas-лиганд с последующей генерацией апоптозного комплекса, связывания его с прокаспазой-8 и активацией данной каспазы. Каспаза-8 может активировать эффекторную каспазу-3, что в конечном итоге приводит к апоптозу клеток [203].

Вместе с тем, нами было показано, что моделирование ТПП сопровождалось возрастанием в 3,3 раза уровня транскриптов фактора AIF – белка митохондриального межмембранного пространства, который при повышении проницаемости наружной митохондриальной мембраны высвобождается и транслоцируется в ядро, где вызывает двухцепочечные разрывы и конденсацию ДНК (рис. 13 В) [168, 171]. Регуляция AIF осуществляется и на транскрипционном уровне, его положительным модулятором выступает p53 [171]. Известно, что AIF участвует в патогенезе лекарственного поражения печени [93], а CCl₄-индуцированная гепатотоксичность является мощным стресс-сигналом, активирующим белок p53 [67].

Как показали наши исследования, при применении ДГХ1 на фоне ТПП происходило снижение уровня AIF, каспазы-8 и каспазы-3. Так, использование ДГХ1 в дозе 25 мг/кг способствовало снижению мРНК AIF в 2,2 раза (рис. 13 В), а активности каспаз – в 1,2 раза, по сравнению данными при ТПП (рис. 13 А, Б). Введение ДГХ1 в дозе 50 мг/кг сопровождалось понижением уровня AIF, каспазы-8 и каспазы-3 в 2,5, 1,3 и 1,2 раза. Достоверных отличий в эффективности действия ДГХ1 на активность апоптоза относительно карсила выявлено не было.

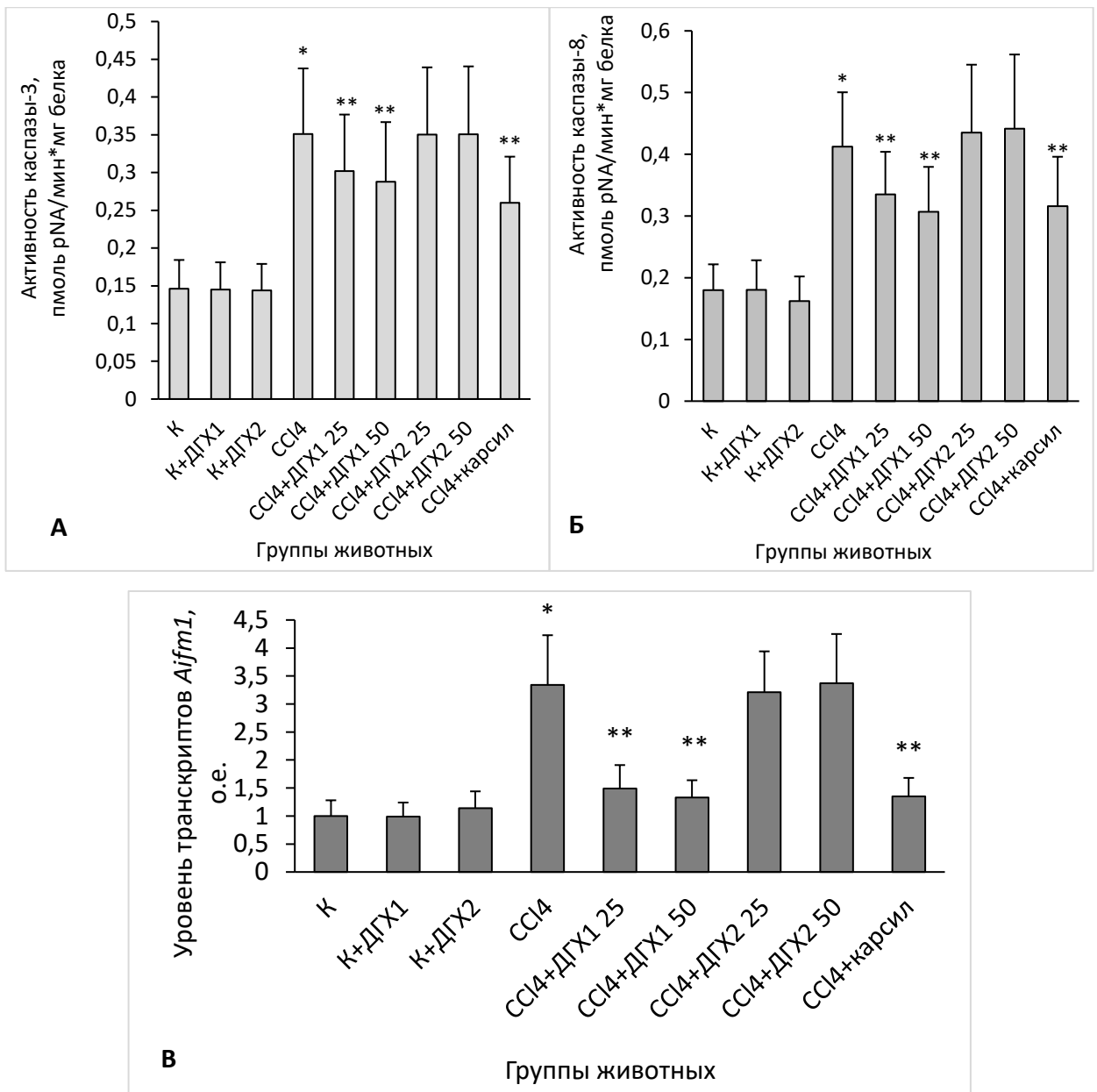


Рисунок 13. Активность каспазы-3 (А), каспазы-8 (Б) и уровень мРНК *Aifm1* (В) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлометановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-

2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Наблюдаемые изменения подтверждают способность тестируемого соединения снижать интенсивность процесса апоптоза, выступающего в роли одного из факторов поражения печени при токсическом действии CCl_4 . По-видимому, проявляя противовоспалительные и антиокислительные свойства, ДГХ1 способствовал уменьшению уровня сигналов, опосредующих активацию как митохондриального, так и лиганд-опосредованного путей апоптоза.

В то же время, в ходе проводимых нами исследований было показано, что ДГХ2 не оказывал эффекта на активность каспазы-3, каспазы-8 и уровень мРНК АИФ. Возможно, лимитирующим фактором при применении ДГХ2 могла быть длительность проведения эксперимента, составлявшая 4 дня от момента введения CCl_4 , что было недостаточно для отслеживания значимого эффекта соединения на активность каспаз.

ГЛАВА 7. ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИГИДРОХИНОЛИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Функцию защиты от действия АФК, играющих критическую роль при токсических поражениях печени, выполняет антиоксидантная система, представленная ферментами и неферментативными соединениями, работа которых скоординирована и регулируется на различных физиолого-биохимических уровнях, включая транскрипционный, трансляционный, молекулярный и гормональный. Среди ферментативных антиоксидантов СОД дисмутирует супероксидный анион-радикал, а каталаза разлагает образующийся в ходе данной реакции H_2O_2 . ГП участвует в окислении GSH до GSSG и, посредством этого, восстанавливает органические и неорганические пероксиды при окислительном стрессе. Ревосстановление GSSG до GSH катализирует ГР за счёт окисления НАДФН. ГТ в клетках печени катализируют реакции конъюгации ксенобиотиков с GSH и играют роль основных защитных ферментов против химического стресса и канцерогенеза [144]. Кроме того, сам GSH может не только служить в качестве субстрата для ГП и ГТ, но и действовать непосредственно как перехватчик свободных радикалов [53]. Важное место в регуляции системы клеточной защиты от свободных радикалов и ксенобиотиков отводится транскрипционному фактору Nrf2, который регулирует экспрессию ARE-содержащих генов, включая СОД, ГП, NADPH-хинон оксидоредуктазу, гем-оксигеназу-1, и других ферментов, индуцируемых при чрезмерной генерации АФК и регулирующих окислительно-восстановительное состояние в клетках [167]. Другим редокс-чувствительным фактором, способным осуществлять регуляцию экспрессии антиоксидантных ферментов, включая Mn-СОД и ГП, является FOXO1 [154]. Нами в ходе работы была проведена оценка воздействия ДГХ1 и ДГХ2 на активность СОД, каталазы, ГР, ГП и ГТ, уровень

транскриптов их генов, а также на содержание мРНК транскрипционных факторов Nrf2 и FOXO1 при ТПП у крыс.

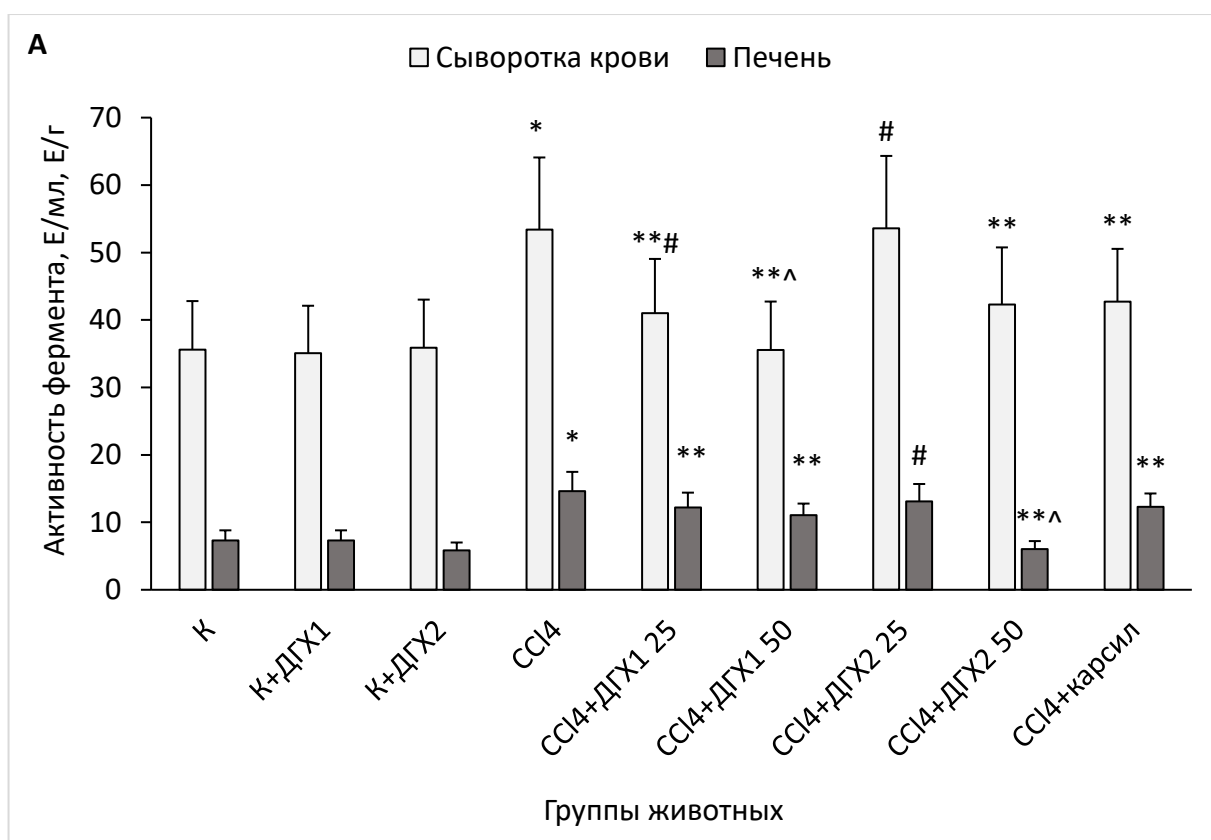
7.1. Исследование функционирования супероксиддисмутазы и каталазы у крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин

Как показали наши исследования, развитие ТПП у крыс приводило к возрастанию активности СОД и каталазы (рис. 14), что, по-видимому, являлось результатом адаптивной реакции на введение ксенобиотика и развитие окислительного стресса. Так, известно, что результатом стрессорного воздействия на клетку является индукция стрессового ответа, для которого может быть характерна как активация, так и торможение определенных метаболических процессов, в зависимости от длительности и силы раздражающего воздействия [46].

Введение крысам с ТПП тестируемых соединений приводило к изменению активности СОД и каталазы в направлении контрольных значений. Наибольшие сдвиги активности СОД наблюдались при введении ДГХ1 и ДГХ2 в дозе 50 мг/кг. Так, активность фермента в сыворотке крови животных уменьшалась в этих условиях в 1,5 и 1,3 раза относительно данных при патологии, причём ДГХ1 приводил к достоверно более существенным изменениям по сравнению с карсилом (см. рис. 14). В печени животных с ТПП, подверженных введению ДГХ1 и ДГХ2 в дозе 50 мг/кг, активность СОД снижалась в 1,3 и 1,4 раза, при этом более выраженное действие в сравнении с карсилом оказывал ДГХ2.

При анализе активности каталазы в сыворотке крови экспериментальных животных также был продемонстрирован дозозависимый эффект дигидрохиолиновых производных. ДГХ1 оказывал более

существенное воздействие на данный показатель в дозировке 50 мг/кг: активность фермента при этом снижалась в 2,4 раза относительно значений при ТПП, причём изменения были более существенны, чем при введении карсила. ДГХ2 оказывал более сильное действие в обеих дозах относительно препарата сравнения. При этом, использование вещества в дозировке 25 мг/кг существенно изменяло активность каталазы по направлению к контрольным значениям, чем в дозе 50 мг/кг. Так, введение крысам с ТПП ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к снижению активности фермента в 3,9 и 2,4 раза.



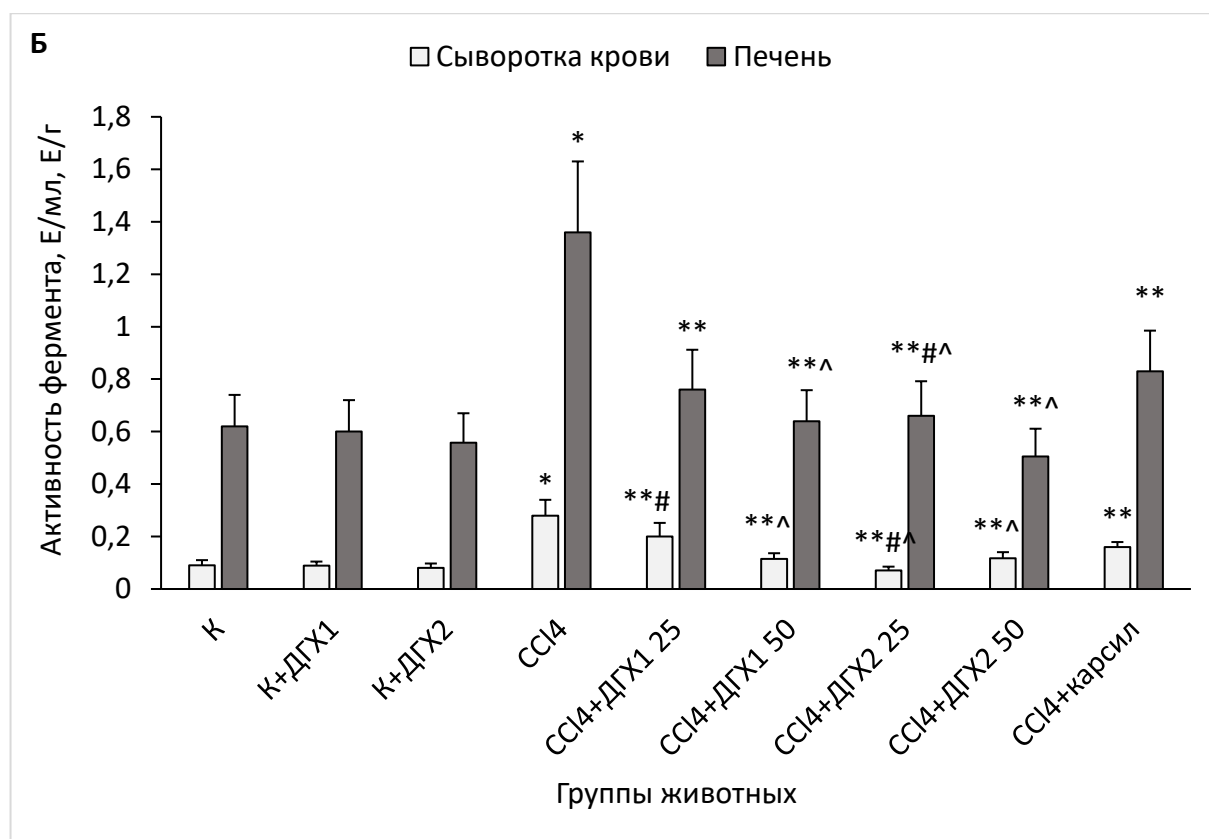


Рисунок 14. Активность супероксиддисмутазы (А), представленная в Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы печени, и активность каталазы (Б) в сыворотке крови и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-

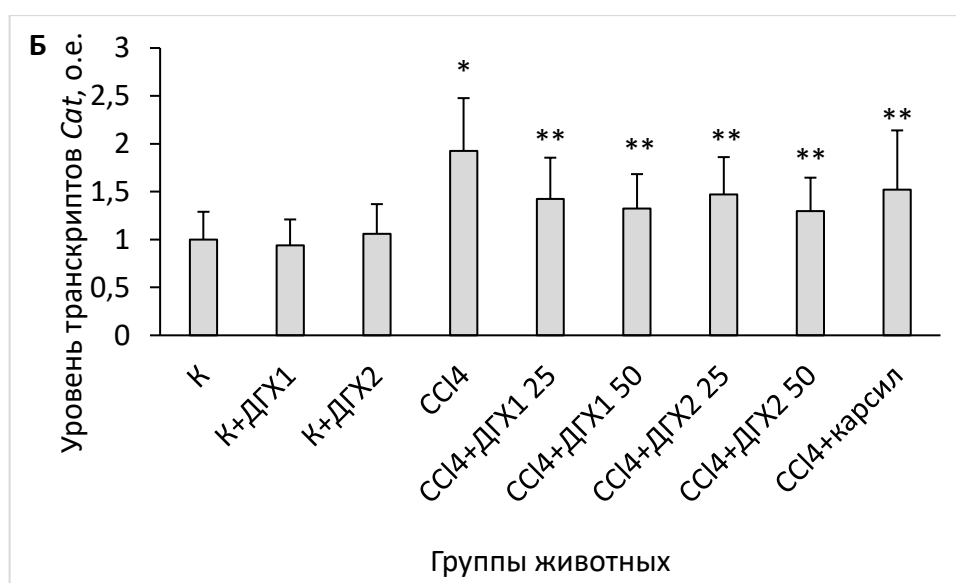
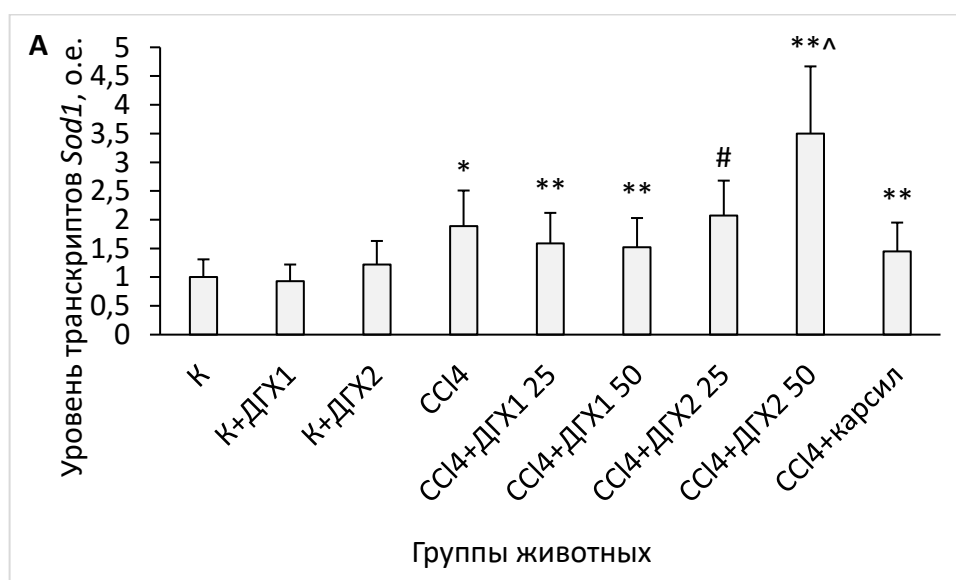
дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Схожая тенденция наблюдалась для активности каталазы в печени экспериментальных животных: больший эффект по сравнению с карсилом оказало введение ДГХ1 в дозе 50 мг/кг и ДГХ2 в обеих дозах (см. рис. 14). При использовании в качестве протектора ДГХ1 в дозе 50 мг/кг активность фермента снижалась в 2,1 раза относительно данных при ТПП. Введение ДГХ2 в дозировках 25 и 50 мг/кг крысам с патологией способствовало уменьшению исследуемого показателя в 2,1 и 2,7 раза. В данном случае достоверно более эффективной оказалась доза ДГХ2 50 мг/кг. Динамика изменения удельной активности СОД (приложение 2, рис. 2) и каталазы (приложение 2, рис. 3) у экспериментальных животных имела схожую тенденцию. Наблюдаемые изменения, очевидно, были связаны со снижением уровня окислительного стресса под действием дигидрохинолиновых производных и последующим уменьшением нагрузки на АОС, опосредованной АФК, генерируемыми при ТПП.

Важнейшим механизмом, обуславливающим сдвиги активности ферментов АОС в тканях экспериментальных животных, могло выступать изменение их регуляции на транскрипционном уровне. Действительно, как нами было показано, индукция ТПП сопровождалась значительным возрастанием уровня мРНК генов *Sod1* и *Cat*. Кроме того, происходило накопление транскриптов генов факторов, играющих центральную роль в реализации клеточной защиты от АФК – *Nrf2* и *Foxo1* (рис. 16).

Как показали результаты нашей работы, уровень мРНК гена *Cat* у животных с ТПП снижался под действием тестируемых соединений. Так, введение ДГХ1 в дозе 25 и 50 мг/кг приводило к уменьшению показателя в 1,4 и 1,5 раза, а применение ДГХ2 на фоне патологии способствовало понижению уровня мРНК в 1,3 и 1,5 раза (см. рис. 15). Содержание мРНК *Sod1* также

снижалось под действием ДГХ1 в обеих дозах в 1,2 раза относительно значений при патологии. В то же время, ДГХ2 в дозировке 50 мг/кг оказывал стимулирующее действие на транскрипцию *Sod1*: данный показатель возрастал в 1,9 раза по сравнению со значениями при ТПП. Уровень мРНК гена *Nfe2l2* (фактора Nrf2) достоверно снижался только под действием ДГХ1 в дозировках 25 и 50 мг/кг, причем изменения были существеннее, чем таковые при введении карсила. Так, уровень транскриптов анализируемого гена падал в 1,6 и 1,8 раза, относительно данных при ТПП. В свою очередь, ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг способствовал возрастанию содержания мРНК *Foxo1* в 1,3 и 1,5 раза, относительно значений при ТПП.



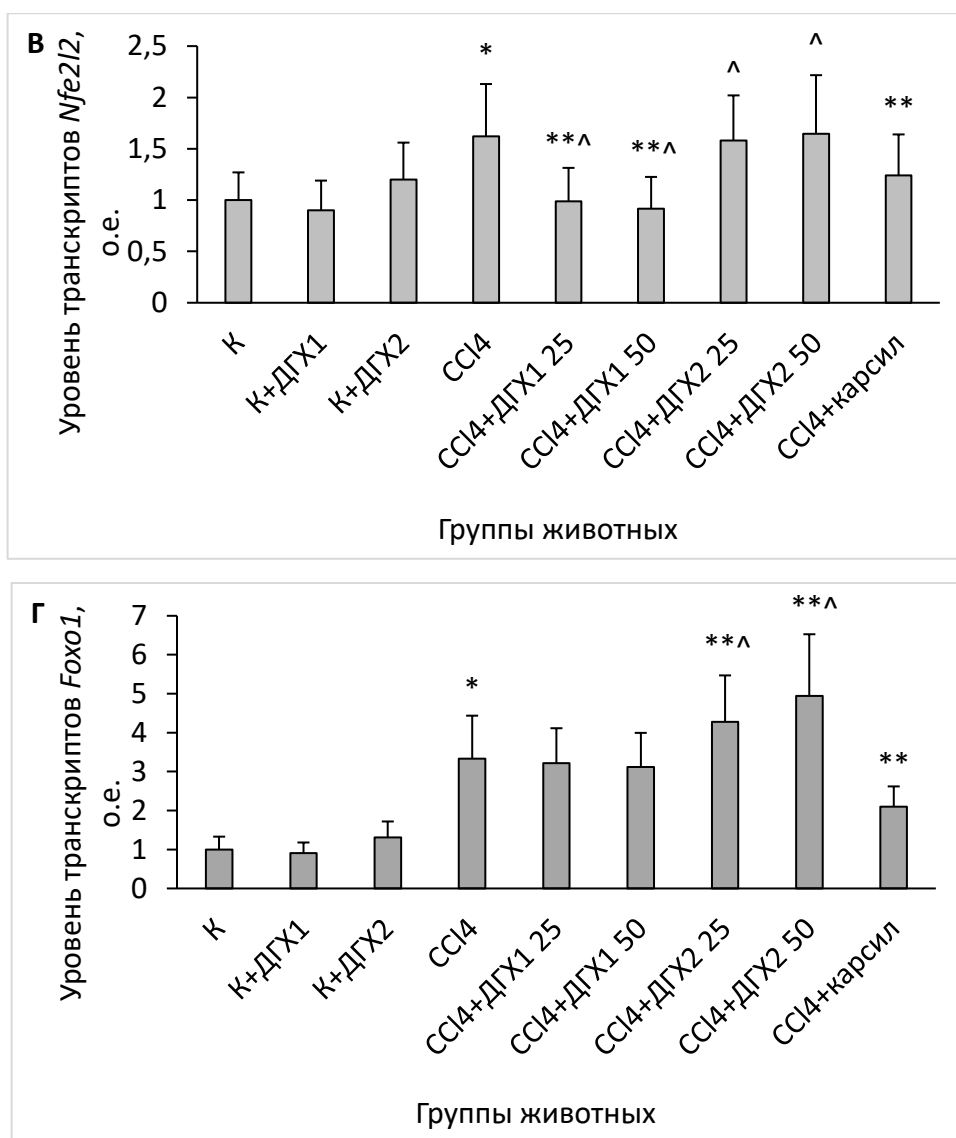


Рисунок 15. Уровень мРНК генов *Sod1* (А), *Cat* (Б), *Nfe2l2* (В) и *Foxo1* (Г) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (CCl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (CCl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (CCl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (CCl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (CCl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (CCl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

На основании полученных результатов можно предположить, что помимо прямого антиоксидантного эффекта ДГХ2 оказывал стимулирующее действие на экспрессию *Sod1*. ДГХ2 мог реализовывать свой эффект через *Foxo1* и *Nfe2l2*, осуществляя регуляцию на транскрипционном уровне. В литературе имеются сведения о стимулирующем действии дигидрохинолиновых производных на редокс-чувствительные транскрипционные факторы. Так, этоксихин является селективным активатором Nrf2 [140]. По-видимому, с наблюдаемым индуцирующим действием ДГХ2 связан тот факт, что при снижении интенсивности окислительного стресса и нормализации активности ферментов АОС под действием тестируемого вещества содержание мРНК *Sod1* находилось все ещё на повышенном уровне.

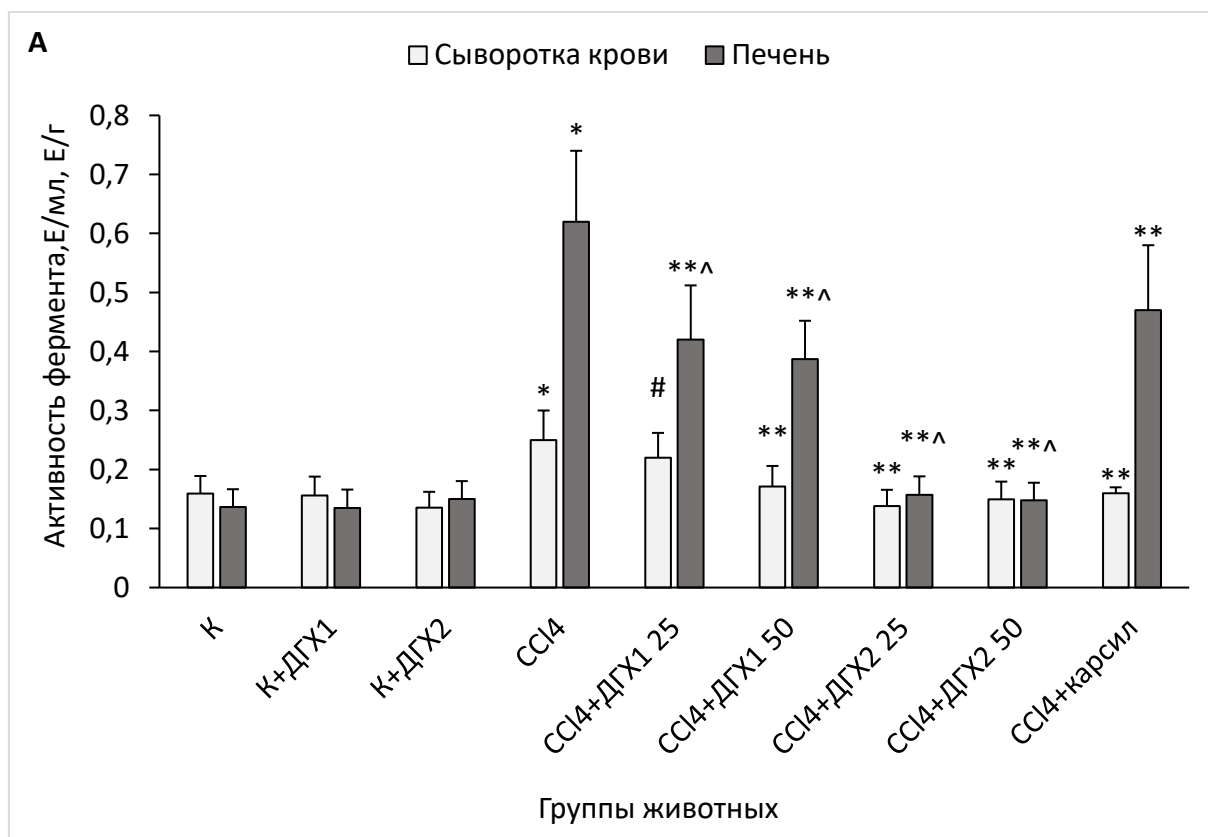
Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали, что дигидрохинолиновые производные оказывали более существенное воздействие на функционирование СОД и каталазы у крыс с ТПП. Следует также отметить наличие дополнительного стимулирующего эффекта ДГХ2 на транскрипцию *Sod1* и генов редокс-чувствительных факторов Nrf2 и FOXO1, что, помимо прямого антиоксидантного действия вещества, также может лежать в основе снижения интенсивности свободнорадикального окисления при ТПП.

7.2. Функционирование глутатионовой антиоксидантной системы и содержание α -токоферола у крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин

Результаты проведённой нами работы показали, что у крыс с ТПП наблюдалось разнонаправленное изменение показателей, отражающих функционирование глутатионовой АОС. Так, развитие патологии у животных приводило к увеличению активности ГП и ГР относительно контроля (рис. 16). Вместе с тем, наблюдалось падение активности ГТ в печени животных с ТПП. Концентрация GSH при этом изменялась в тканях разнонаправленно: увеличивалась в печени и уменьшалась в сыворотке крови (рис. 17). По-видимому, на момент выведения животных из эксперимента после администрации CCl_4 имело место нарушение скоординированного действия компонентов глутатионовой АОС, что могло являться важнейшей предпосылкой к наступлению стадии декомпенсации антиокислительной защиты и ещё более сильному развитию окислительного стресса. Помимо развития дисбаланса в работе глутатионовой АОС, индукция ТПП у крыс сопровождалась истощением пула α -токоферола, расхождение которого могло быть связано с восстановлением свободных радикалов, образующихся в ходе метаболизма CCl_4 и окисления биологических молекул.

Проведённые нами исследования показали, что введение крысам с ТПП дигидрохинолиновых производных сопровождалось изменением в направлении контроля активности ГП. При этом в печени лабораторных животных, получавших ДГХ1 и ДГХ2, данный показатель изменялся более существенно, чем у крыс, которым на фоне патологии вводили карсил. Так, активность ГП, представленная в Е/г сырой массы ткани, понижалась под действием ДГХ1 в дозе 25 и 50 мг/кг в 1,5 и 1,6 раза, а при введении ДГХ2 – в 3,9 и 4,2 раза, относительно значений при ТПП (см. рис. 16). На активность ГР

в сыворотке крови достоверное воздействие оказывал только ДГХ1. Так, при введении данного соединения в обеих дозировках животным с патологией активность фермента снижалась в 1,2 раза. В печени активность ГР снижалась во всех группах крыс, получавших протекторы, а также препарат сравнения. Достоверно более существенное изменение активности ГР в печени относительно действия карсила вызывало введение ДГХ2 в дозе 50 мг/кг – анализируемый показатель понижался в 2,0 раза, относительно данных при ТПП. Развитие патологии сопровождалось снижением активности ГТ в печени экспериментальных животных. ДГХ2 при введении крысам с ТПП в дозах 25 и 50 мг/кг способствовал повышению активности данного фермента в 1,5 и 2,4 раза, причём применение большей дозировки оказало более мощный эффект, чем использование карсила. При этом прослеживались схожие тенденции в изменении удельной активности исследуемых ферментов (приложение 2, рис. 4, рис. 5, рис.6).



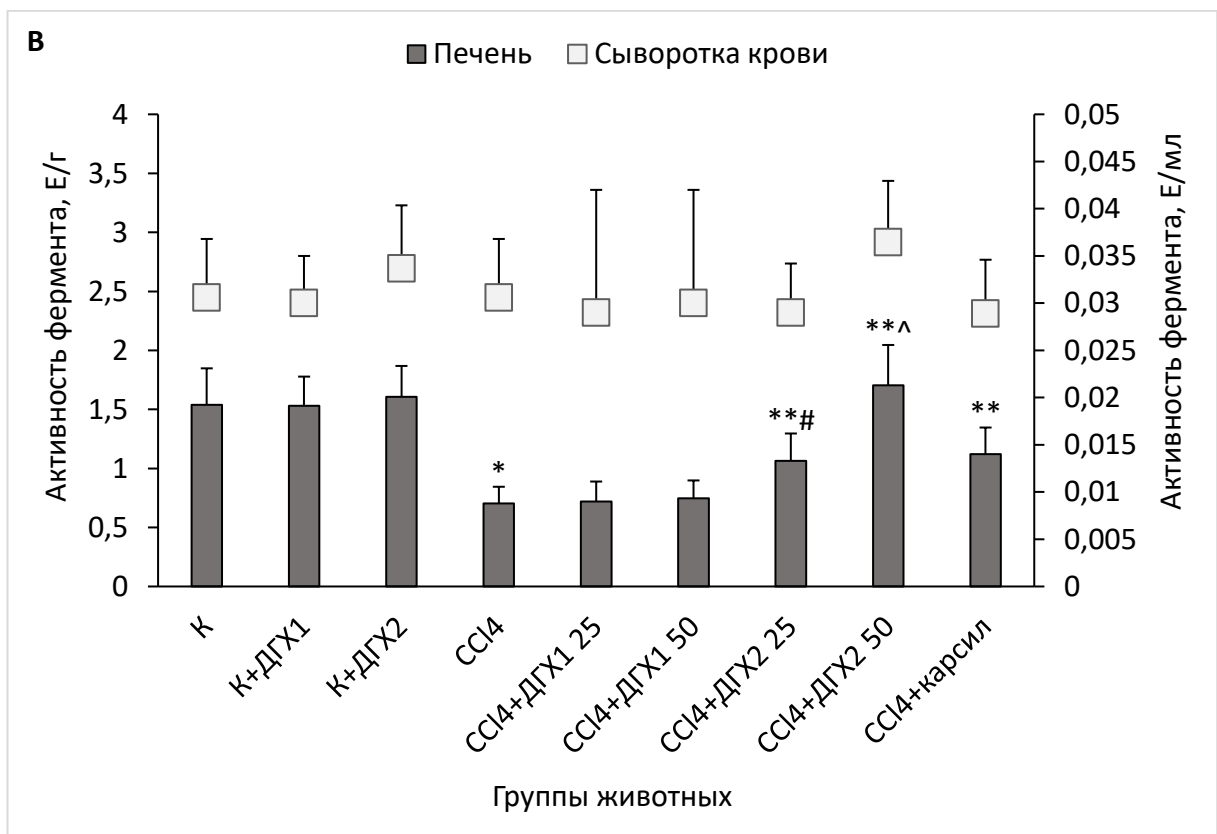
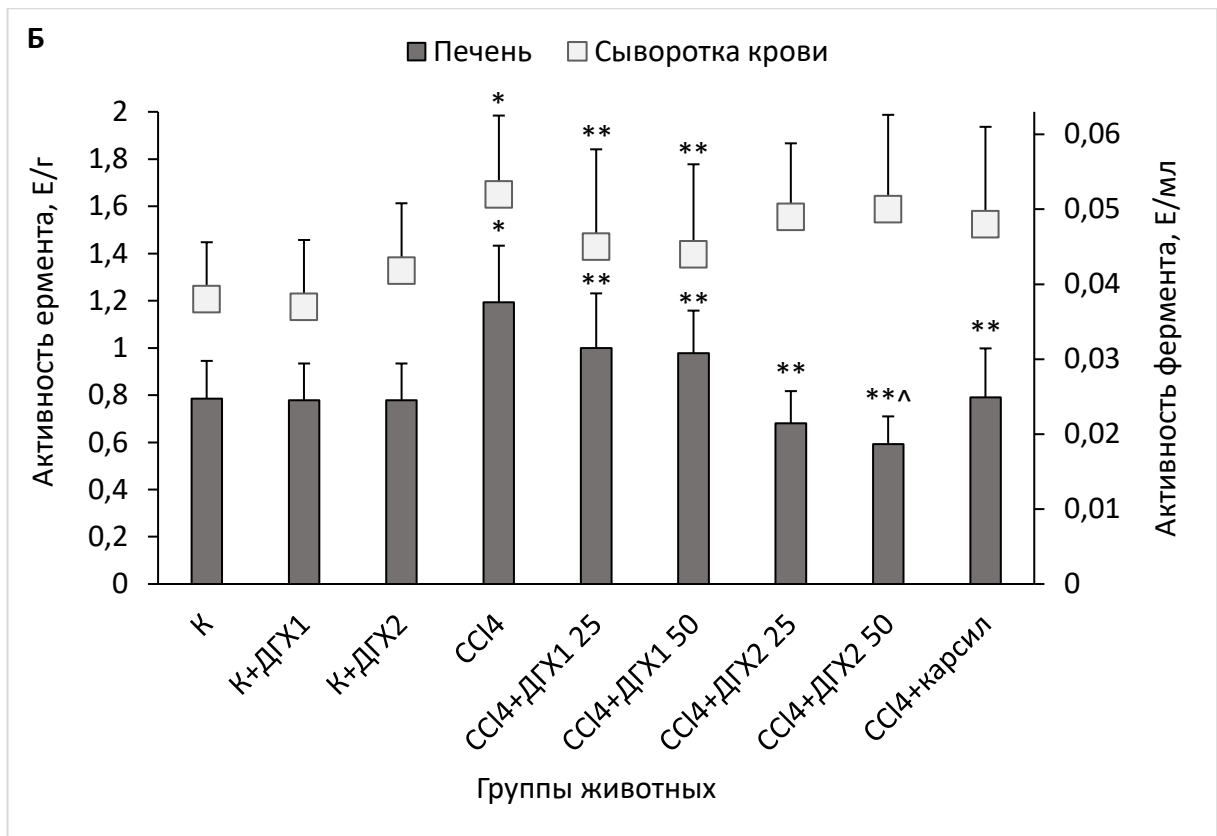


Рис. 16. Активность глутатионпероксидазы (А), представленная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани печени, активность

глутатионредуктазы (Б) в сыворотке крови и печени, и активность глутатионтрансферазы (В) в сыворотке крови и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СCl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СCl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СCl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СCl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СCl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СCl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Концентрация GSH, понижавшаяся в сыворотке животных с ТПП, увеличивалась под действием ДГХ2 в дозе 50 мг/кг в 1,3 раза (см. рис. 17 А). В печени животных с патологией уровень данного тиола был выше контрольных значений, а введение дигидрохиолиновых производных способствовало его уменьшению (рис. 17 А). Эффективнее карсила в данном ключе оказался ДГХ2 в дозе 25 мг/кг, под действием которого содержание GSH в печени снижалось в 2,6 раза у крыс с ТПП.

Следует отметить, что оба тестируемых протектора эффективнее карсила восстанавливали уровень α -токоферола в сыворотке крови крыс с ТПП (рис. 17 Б). Так, введение ДГХ1 в дозе 25 и 50 мг/кг приводило к увеличению данного показателя в 1,6 и 2,1 раза, а администрация ДГХ2 в

дозировках 25 и 50 мг/кг – в 2,1 и 1,9 раза. В печени животных эффективнее карсила повышали уровень α -токоферола ДГХ1 в дозе 50 мг/кг и ДГХ2 в дозе 25 мг/кг. Так, данные соединения способствовали увеличению показателя в 2,1 и 2,0 раза, относительно значений при ТПП (рис. 17 Б).

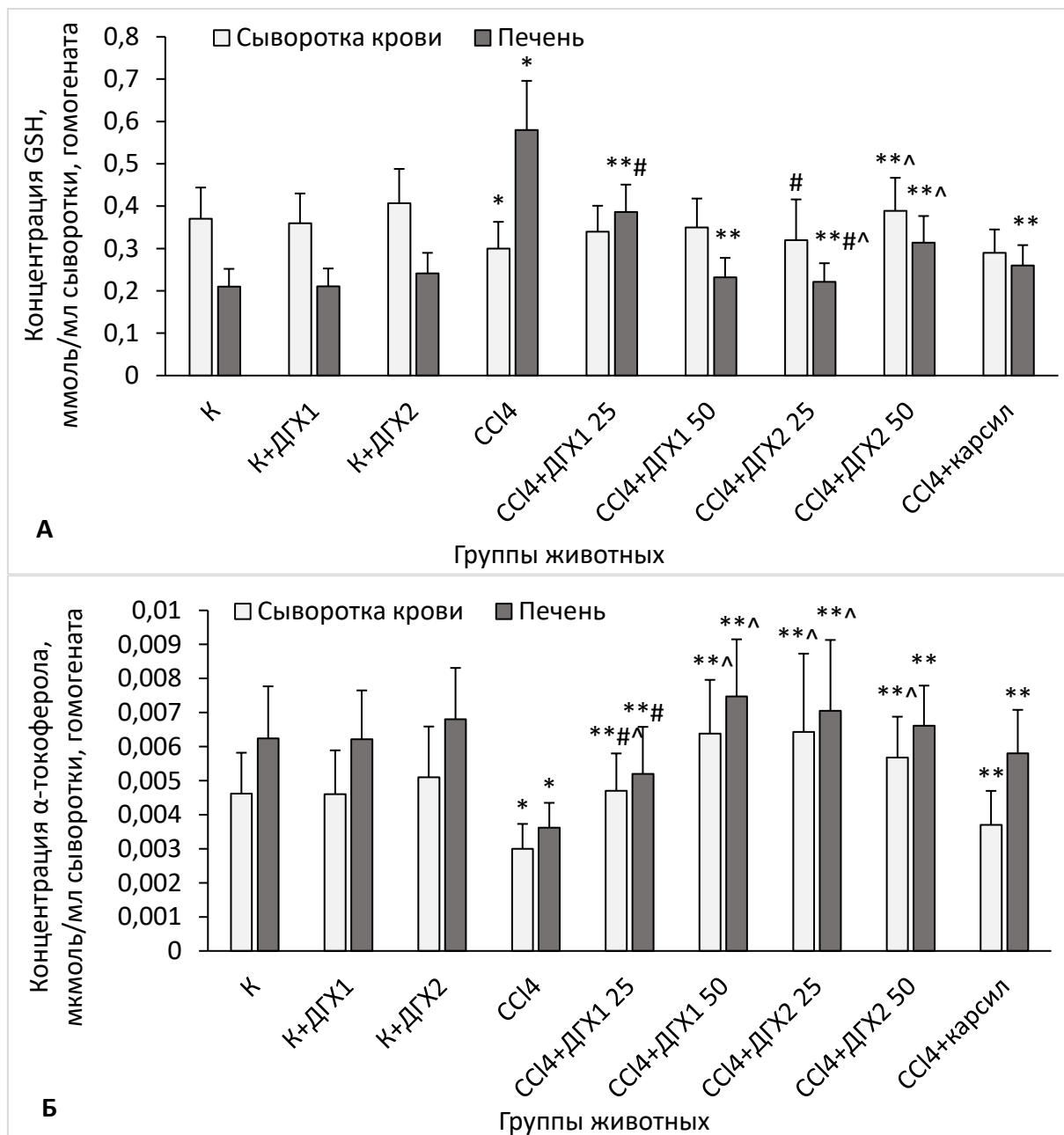


Рис. 17. Содержание восстановленного глутатиона в сыворотке крови и гомогенате печени (А), и концентрация α -токоферола в сыворотке крови и гомогенате печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг

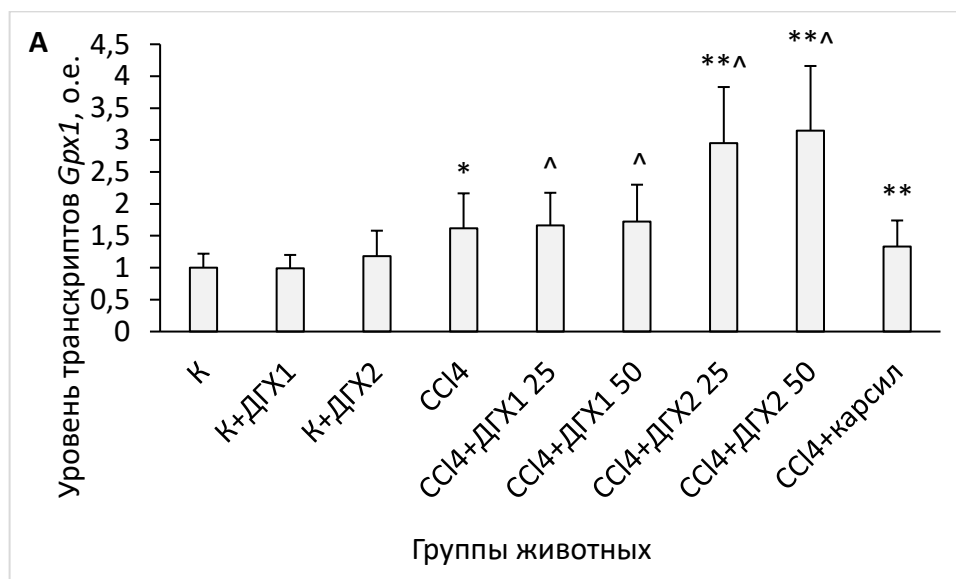
(CCl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (CCl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (CCl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (CCl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (CCl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, воздействие дигидрохиолиновых производных на фоне введения CCl₄ крысам способствовало нормализации активности ферментов глутатионового звена АОС и содержания GSH и α -токоферола. По-видимому, проявляя антиокислительную и восстанавливающую активность, производные дигидрохиолина нивелировали развивающиеся нарушения в координации работы АОС.

Изменение активности ГП, ГР и ГТ у крыс с ТПП сопровождалось соответствующими сдвигами в уровне мРНК генов данных ферментов. Так, для крыс с патологией было характерно увеличение содержания транскриптов генов *Gpx1* и *Gsr*, а также снижение мРНК гена *Gsta2* (рис 18). Введение ДГХ1 на фоне ТПП не оказывало значимого воздействия на уровень мРНК *Gpx1*, а введение ДГХ2 в дозах 25 и 50 мг/кг способствовало дополнительному возрастанию данного показателя относительно значений при патологии в 1,8 и 1,9 раза. Стимулирующее воздействие ДГХ2 на уровень транскриптов *Gpx1* могло быть опосредовано транскрипционной регуляцией FOXO1, экспрессия

генов которого также увеличивалась при введении данного соединения (см. рис. 15). При этом, по-видимому, вовлечения в трансляцию значительной части мРНК *Gpx1* не происходило, поскольку под действием ДГХ2 существенно снижалась интенсивность свободнорадикального окисления у крыс с ТПП и, как следствие, уменьшалась выраженность компенсаторного ответа АОС. Содержание мРНК *Gsr* достоверно снижалось под действием дигидрохинолиновых производных при ТПП. Так, введение ДГХ1 в дозах 25 и 50 мг/кг крысам с патологией приводило к уменьшению данного показателя в 1,9 и 1,8 раза, а применение ДГХ2 в дозировках 25 и 50 мг/кг способствовало понижению уровня транскриптов *Gsr* в 2,2 и 2,8 раза. Для мРНК гена *Gsta2* в печени крыс, получавших на фоне ТПП тестируемые соединения, было зарегистрировано возрастание концентрации, выраженное более сильно, чем таковое на фоне применения карсила. Так, администрация животных с патологией ДГХ1 в дозах 25 и 50 мг/кг приводила к увеличению мРНК *Gsta2* в 3,1 и 3,4 раза, а ДГХ2 – в 4,9 и 7,7 раза. При этом, ДГХ2 в большей дозировке обуславливал накопление мРНК *Gsta2*, превышающее контрольные показатели.



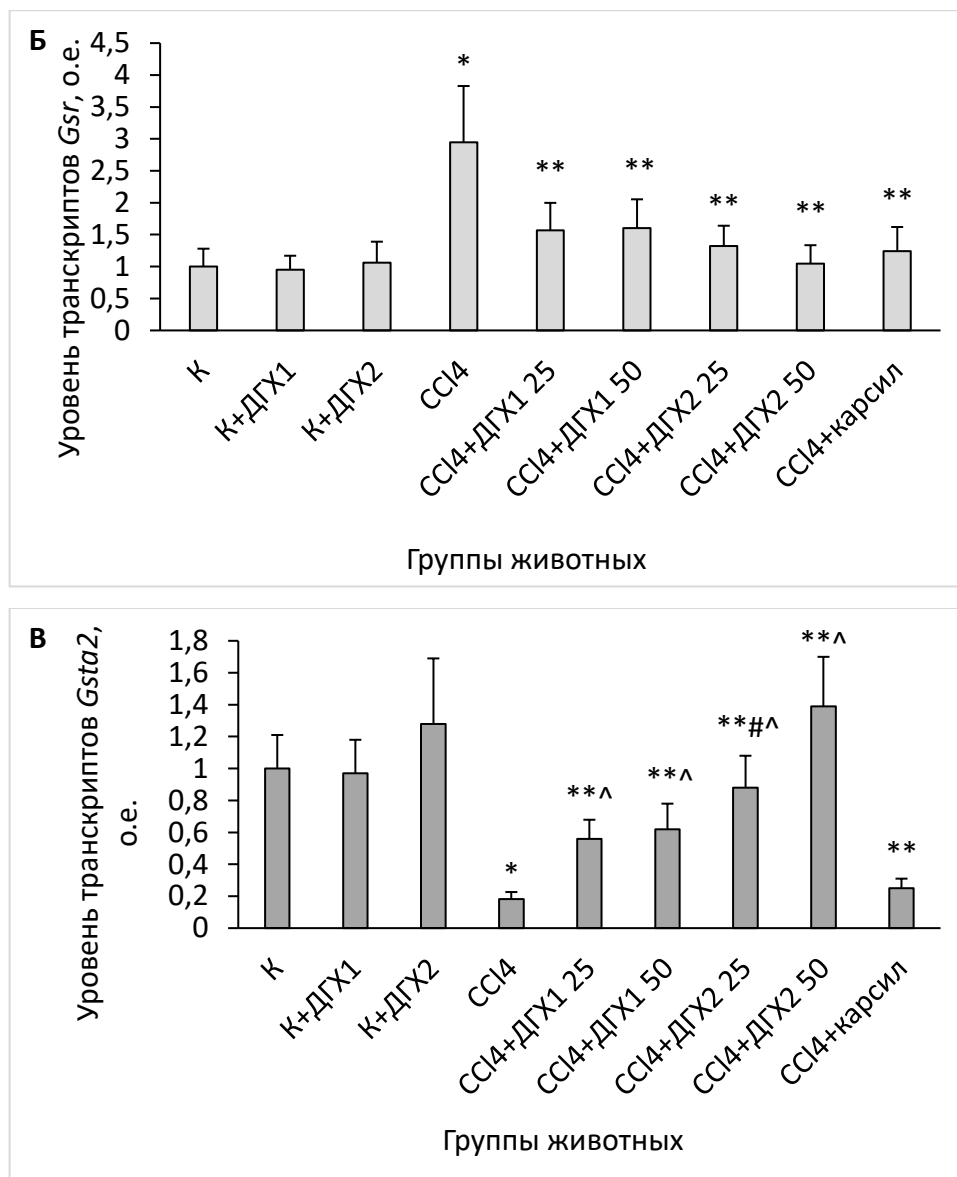


Рисунок. 18. Содержание мРНК генов *Gpx1* (А), *Gsr* (Б) и *Gsta2* (В) в печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Полученные в ходе работы данные продемонстрировали способность тестируемых соединений восстанавливать уровень мРНК *Gsta2*, а также наличие активирующего действия у ДГХ2 по отношению к транскрипции *Foxo1*, *Gpx1* и *Gsta2* при ТПП. Отсутствие выраженного стимулирующего действия ДГХ1 и ДГХ2 на *Gsr* может быть обусловлено достаточной концентрацией GSH, достигающейся в условиях введения протекторов. Известно, что Nrf2 в ответ на повышение концентрации GSSG способен регулировать экспрессию *Gsr* дифференцированно от генов ГП. Анализ промотора *Gsr in silico* выявил три потенциальных ARE участка, с которыми связывается Nrf2. Наряду с этим, известно, что два из трёх участков ARE в промоторе гена функциональны в различной степени, и Nrf2 посредством них регулирует индуцибельную экспрессию *Gsr* в ответ на изменение редокс-статуса, но не регулирует базальную экспрессию гена [85].

В результате проведённых исследований было выяснено, что дигидрохинолиновые производные оказывают более существенный эффект на функционирование АОС у крыс с ТПП по сравнению с карсилом. При этом, для ДГХ2 было характерно наличие стимулирующего эффекта на транскрипцию ряда антиоксидантных генов у животных с патологией.

7.3. Очистка и исследование некоторых каталитических свойств глутатионпероксидазы из печени крыс с тетрахлорметановым поражением печени, получавших дигидрохинолиновое производное

Как показали результаты нашей работы, наиболее выраженное воздействие по сравнению с карсилем ДГХ1 оказывал на активность ГП в печени крыс с ТПП. В связи с этим, с целью выяснения регуляторного влияния дигидрохинолиновых производных на молекулы антиоксидантных ферментов был проведен анализ некоторых каталитических свойств ГП из печени крыс, которым индуцировали ТПП и вводили ДГХ1 в дозе 50 мг/кг. Очистку ГП осуществляли с применением высаливания сульфатом аммония и освобождения от низкомолекулярных примесей путём гель-фильтрации на сефадексе G-25 с последующим объединением фракций с наибольшей активностью фермента. Смесь фракций наносили затем на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюцию фермента проводили 0,01 М калий-фосфатным буфером, объединяли фракции с наиболее высокой активностью ГП и полученный препарат использовали для исследования некоторых каталитических и регуляторных свойств фермента. Выход ГП после хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе составил 28%, степень очистки – 24,5.

Таблица 7. Очистка глутатионпероксидазы из печени крыс с токсическим поражением печени, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг.

Стадия очистки	Общая активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	2,098±0,181	28,33±2,51	0,074±0,006	100	1
Хроматография на сефадексе G-25	1,945±0,160	18,64±1,67	0,104±0,007	92,7	1,52
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	0,587±0,038	1,16±0,12	0,507±0,022	28,0	24,51

Проведённые исследования продемонстрировали, что индукция ТПП у крыс сопровождалась уменьшением константы Михаэлиса (K_m) по отношению к GSH, определенной методом двойных обратных координат. Применение на фоне патологии ДГХ1 в дозе 50 мг/кг способствовало увеличению данного параметра по сравнению со значениями у крыс с ТПП в 2,9 раза и приближению его к контрольным показателям. По-видимому, снижение сродства ГП к GSH могло быть взаимосвязано с изменением соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона в условиях введения ДГХ1 на фоне патологии и сопутствующего снижения степени развития окислительного стресса. Антиоксидантная активность ДГХ1 может быть обусловлена наличием гидроксильной группы и сопряжением р-электронов N и O в пара-положении ароматического цикла [173]. Ранее было показано, что развитие ТПП сопровождалось смещением оптимального значения pH для ГП в кислую сторону [22]. Введение ДГХ1 в дозе 50 мг/кг крысам с патологией приводило к возвращению данного параметра к значениям контрольной группы (рис. 19). По-видимому, под действием ДГХ1, проявляющего антиокислительные свойства, происходило уменьшение активности свободнорадикального окисления и сопутствующего развития ацидоза.

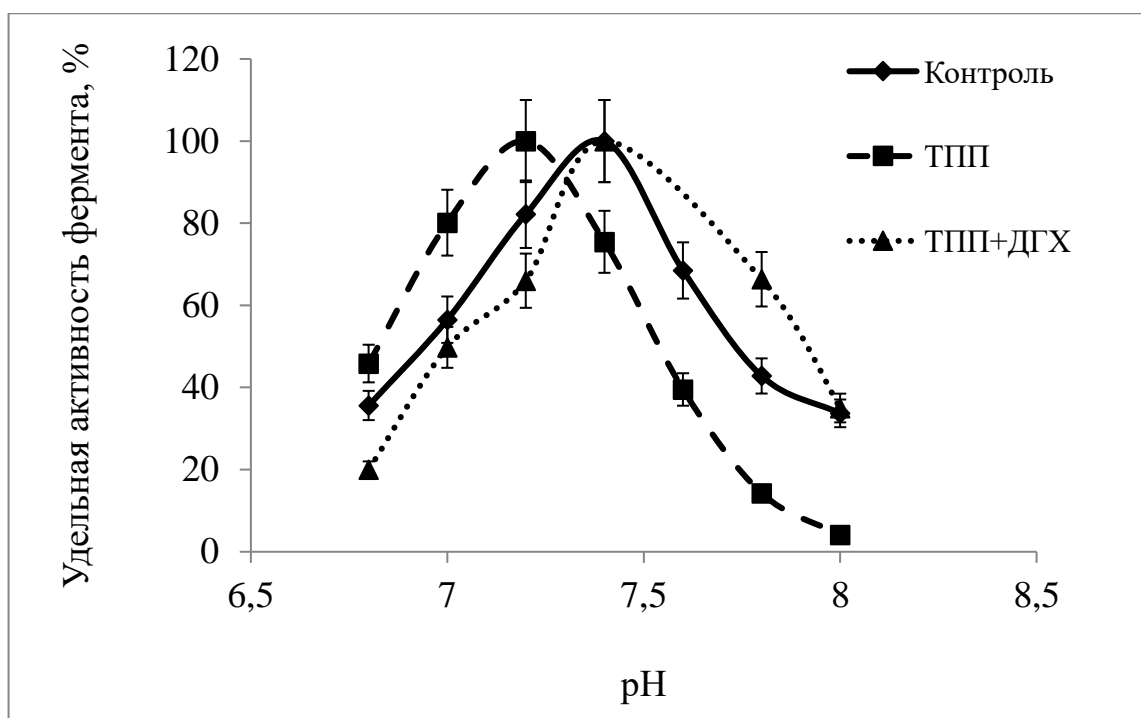


Рисунок 19. Зависимость скорости глутатионпероксидазной реакции от концентрации ионов водорода у интактных крыс (Контроль), животных с токсическим поражением печени (ТПП) и крыс, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг (ТПП+ДГХ).

Представляет интерес анализ регуляторного воздействия изоцитрата (ИЦ) и глюкозо-6-фосфата (Г6Ф) на ГП в условиях развития окислительного стресса. В ходе ГП-реакции окисляется GSH, который подвергается затем ревосстановлению под действием ГР с за счёт НАДФН. Генерируют данный восстановительный эквивалент для глутатионовой АОС ферменты НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ, ИЦ и Г6Ф для которых являются субстратами. Ранее было продемонстрировано, что добавление в реакцию среду ИЦ в концентрациях до 0,1 мМ способствует ингибированию активности ГП [25]. У крыс с ТПП, получавших ДГХ1 в дозе 50 мг/кг, ИЦ оказывал активирующее воздействие на ГП в концентрации 0,05 мМ. При увеличении содержания данного метаболита в реакционной среде до 0,2 мМ происходило снижение активности фермента, которая при дальнейшем добавлении ИЦ практически

не изменялась (рис. 20). Кроме того, у животных с ТПП, получавших ДГХ1, наблюдалось ингибирование активности ГП под действием Г6Ф, которое становилось менее выраженным по мере возрастания содержания данного метаболита в реакционной среде (рис. 21). Наблюдаемые эффекты свидетельствуют о способности ДГХ1 воздействовать на регуляторные свойства ГП при ТПП. По-видимому, тестируемое соединение уменьшало интенсивность свободнорадикальных процессов за счёт наличия антиоксидантной активности, что отражалось на концентрации в печени животных ИЦ и Г6Ф – основных субстратов для ферментов-поставщиков НАДФН для глутатионовой АОС. Таким образом, ДГХ1 обладает способностью регулировать активность ГП при изменении концентрации ключевых интермедиатов НАДФН-генерирующих метаболических путей.

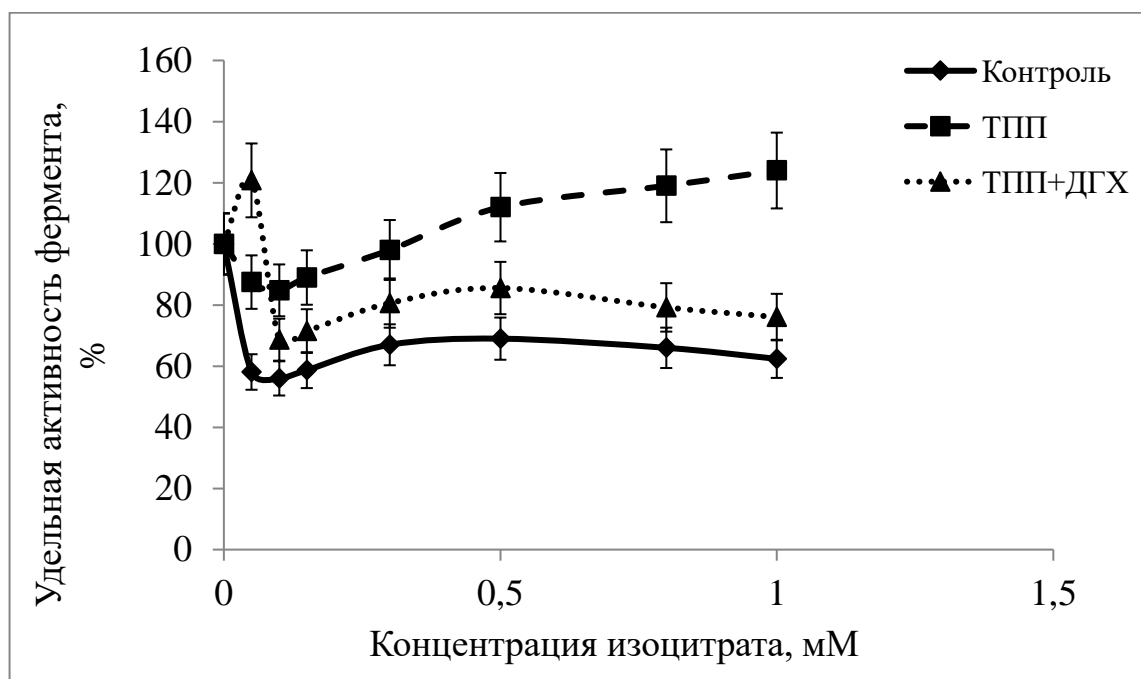


Рисунок 20. Воздействие изоцитрата на активность глутатионпероксидазы из печени интактных крыс (Контроль), животных с токсическим поражением печени (ТПП) и крыс, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (ТПП+ДГХ).

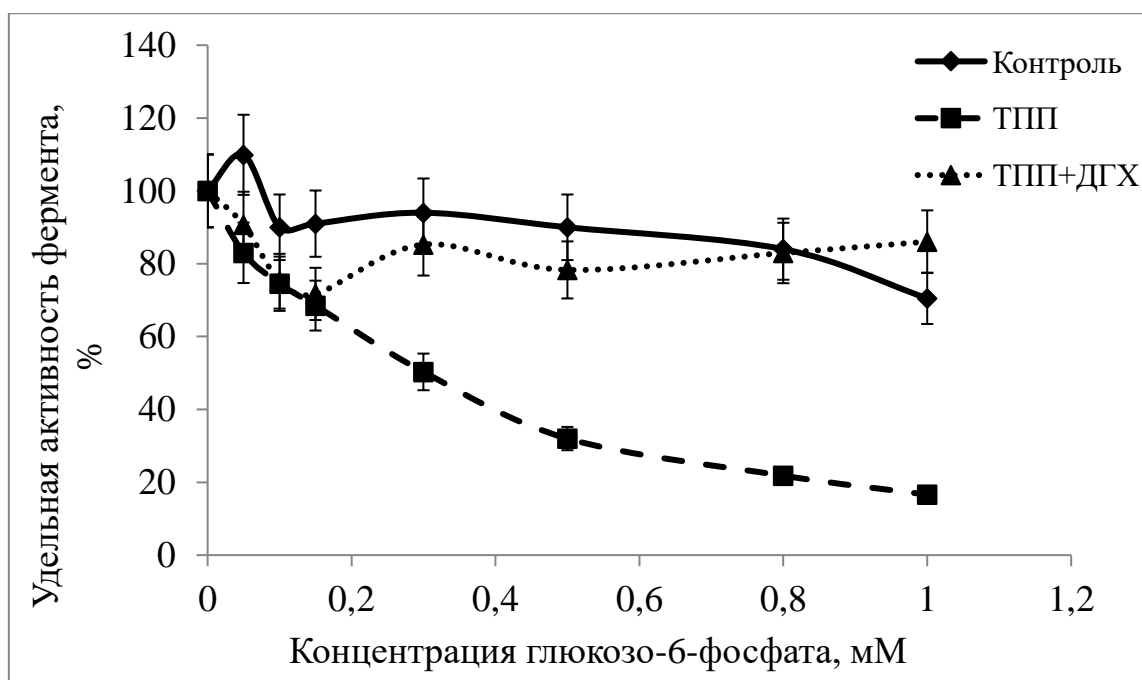


Рисунок 21. Воздействие глюкозо-6-фосфата на активность глутатионпероксидазы из печени интактных крыс (Контроль), животных с токсическим поражением печени (ТПП) и крыс, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (ТПП+ДГХ)

Интересной представляется также оценка воздействия на активность ГП ионов Fe^{2+} , способных вступать в реакции Фентона и Хабера-Вайса с последующим образованием свободных радикалов. Проведённые ранее исследования показали, что внесение в реакционную среду сульфата железа способствовало ингибированию ГП из печени крыс с ТПП [22]. У животных, которым вводили ДГХ1 в дозе 50 мг/кг на фоне патологии, активность фермента при концентрациях Fe^{2+} свыше 0,2 мМ изменялась в направлении контрольных значений (рис. 22).

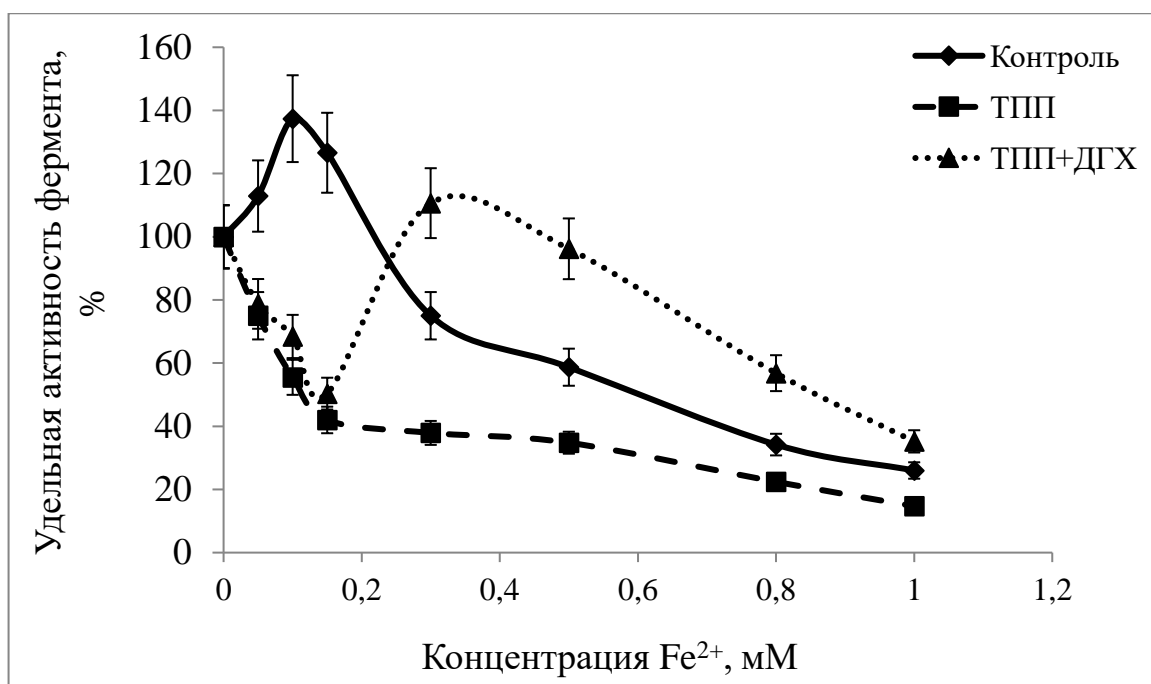


Рисунок 22. Воздействие ионов Fe²⁺ на активность глутатионпероксидазы из печени интактных крыс (Контроль), животных с токсическим поражением печени (ТПП) и крыс, которым на фоне развития патологии вводили 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 50 мг/кг (ТПП+ДГХ)

Таким образом, проведённые исследования показали, что ДГХ1 оказывает воздействие на ряд каталитических и регуляторных свойств ГП, изменяя соответствующие параметры в направлении контрольных значений, вероятно, посредством проявления антиоксидантной активности. Полученные данные свидетельствуют, что тестируемое соединение, наряду с изменением уровня свободнорадикального окисления и транскрипции генов антиоксидантных белков, может оказывать модулирующее действие на АОС через изменение свойств молекул ферментов данной системы.

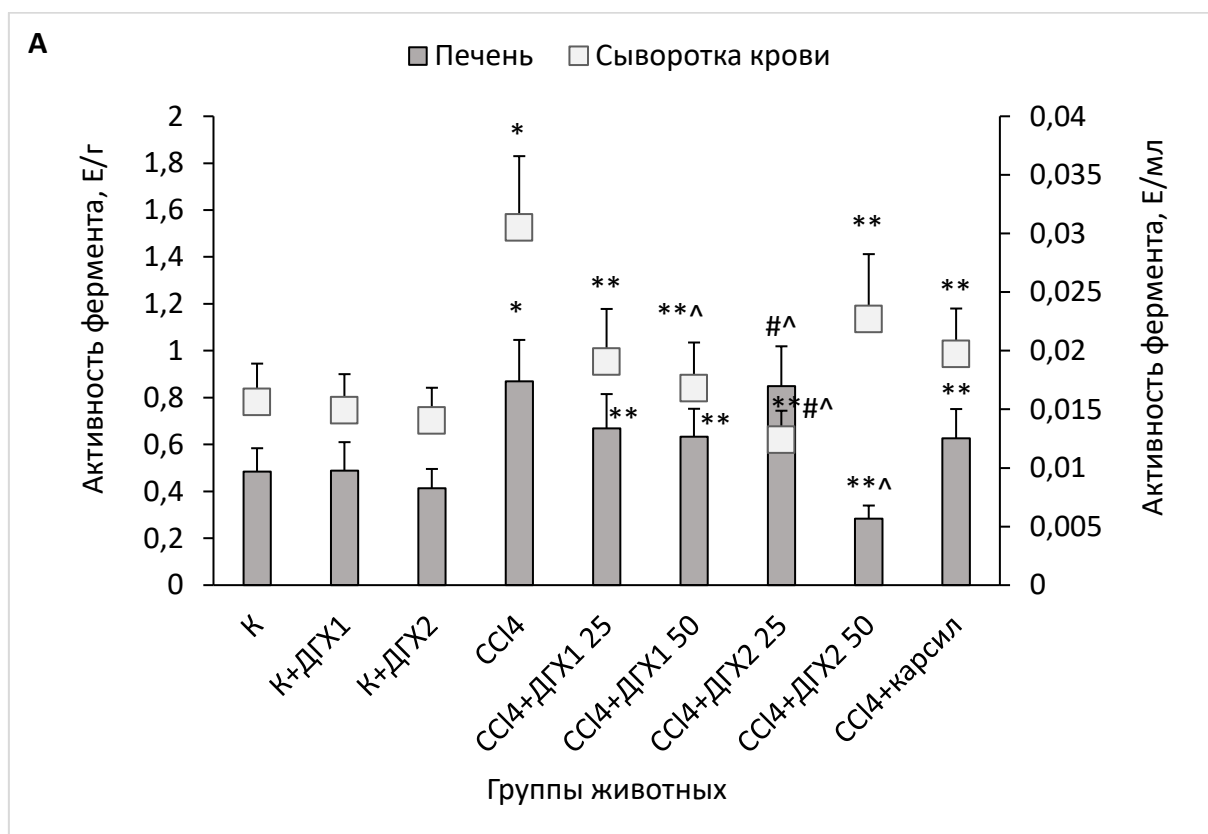
7.4. Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при тетрахлорметановом поражении печени у крыс

НАДФН играет существенную роль в функционировании глутатионовой АОС, заключающуюся в поставке восстановительных эквивалентов для образования GSH из GSSG. Среди основных ферментов-поставщиков НАДФН можно выделить Г6ФДГ, катализирующую лимитирующую стадию пентозофосфатного пути, и НАДФ-ИДГ, которая катализирует декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата [157].

Проведённые исследования показали, что при индукции ТПП у крыс наблюдалось увеличение активности НАДФ-ИДГ, выраженной в виде Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани печени в 1,5 и 1,6 раза, а активность Г6ФДГ увеличивалась в 2,0 и 1,8 раза (рис. 23). Полученные результаты согласуются с представленными в литературе данными о роли НАДФН-генерирующих ферментов в защите тканей печени от АФК. Так, продемонстрировано, что у мышей с нокаутом гена цитоплазматической формы НАДФ-ИДГ введение липополисахарида сопровождалось более существенным развитием окислительного стресса, воспаления и цитолиза гепатоцитов, по сравнению с контролем [98]. Имеются также данные, что при чрезмерной активации свободнорадикального окисления происходит индукция сиртуина-2, который деацетилирует в положении Lys-403 молекулу фермента Г6ФДГ и способствует, таким образом, увеличению активности данного фермента и возрастанию скорости производства НАДФН [113, 6].

В ходе нашей работы было выяснено, что введение дигидрохинолиновых производных на фоне ТПП способствовало нормализации активности НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ. Так, при администрации крыс с патологией ДГХ1 в дозах 25 и 50 мг/кг происходило уменьшение

активности НАДФ-ИДГ в сыворотке крови в 1,4 и 1,5 раза, а в печени – в 1,5 и 1,6 раза, по сравнению со значениями при ТПП (см. рис. 23). ДГХ2 оказывал значимое воздействие на активность НАДФ-ИДГ в сыворотке в дозе 25 мг/кг: данный показатель снижался в этих условиях в 1,3 раза. В печени животных под действием ДГХ2 в дозировках 25 и 50 мг/кг исследуемый показатель уменьшался на 12 и 44%. Схожая динамика наблюдалась и при анализе активности Г6ФДГ. По отношению к данному показателю в сыворотке крови эффективнее карсила оказался ДГХ1 при использовании в дозе 50 мг/кг, а также ДГХ2 при введении в дозе 25 мг/кг. Так, администрация крыс с ТПП тестируемыми веществами в данных дозах способствовала уменьшению активности фермента в 1,8 и 2,5 раза. В печени крыс воздействие ДГХ1 в дозах 25 и 50 мг/кг приводило к снижению активности Г6ФДГ в 1,3 и 1,4 раза, а ДГХ2 в дозе 50 мг/кг – в 3,1 раза, относительно значений при ТПП.



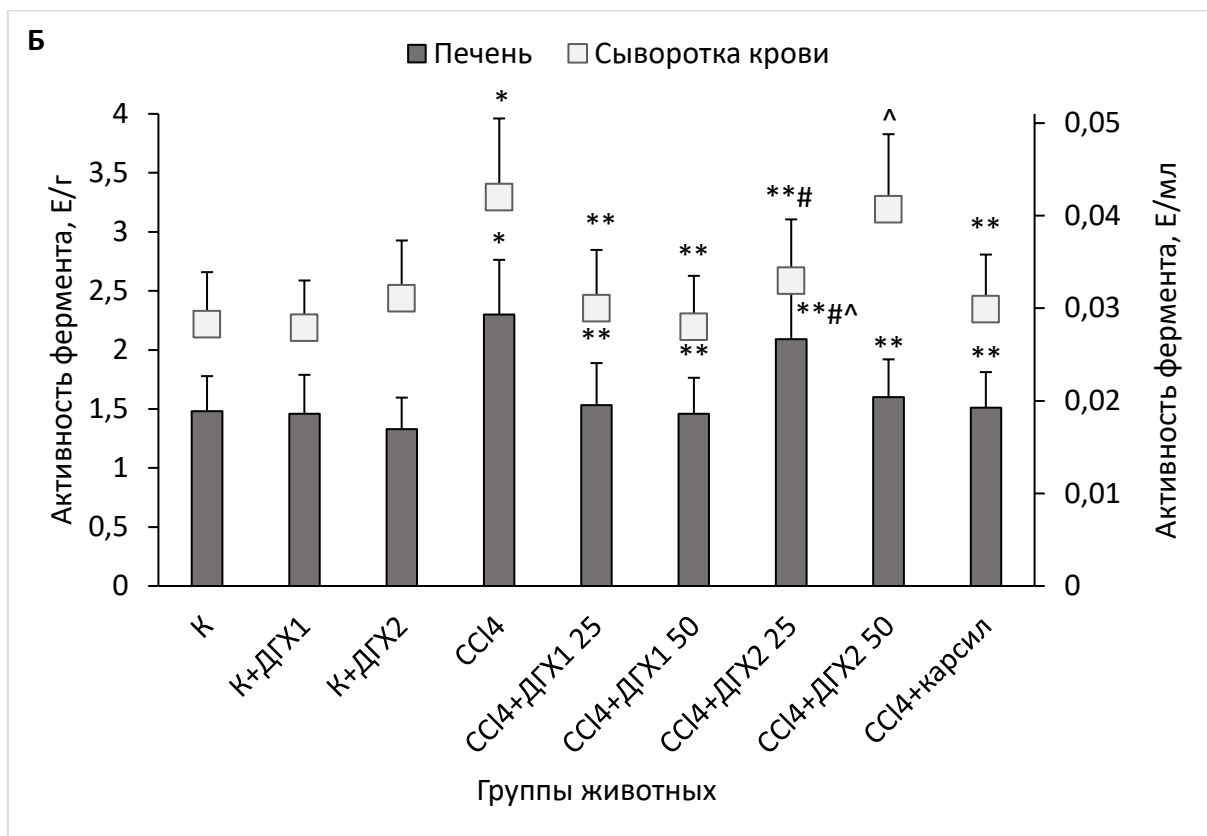


Рисунок 23. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (А) в сыворотке крови и печени, а также активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (Б) в сыворотке и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-

дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

Полученные данные позволяют предположить, что у крыс с ТПП изменения активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, вызванные введением ДГХ1 и ДГХ2, происходили в результате уменьшения нагрузки на АОС клеток печени и снижения её потребности в НАДФН. Тестируемые дигидрохинолиновые производные, по-видимому, оказывали ингибирующее действие на интенсивность свободнорадикального окисления, что приводило к уменьшению степени компенсаторного ответа на окислительный стресс [77]. В то же время, применение ДГХ2 при ТПП сопровождалось снижением активности Г6ФДГ ниже уровня контрольных показателей, что может быть следствием ингибирующего действия соединения на данный фермент. В литературе имеются сведения о подавляющем действии некоторых хинолиновых производных на Г6ФДГ. Так, противомаларийные препараты на основе производных аминохинолина обладают гемолитическим действием при применении некоторыми пациентами, причиной чего является развивающийся дефицит Г6ФДГ под действием данных лекарственных средств [39]. Несмотря на это, производные аминохинолина широко применяются при малярии, а также проводятся исследования по поиску их наиболее безопасных и оптимальных аналогов [38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из актуальных проблем биомедицины в настоящее время являются заболевания печени [196]. Ксенобиотики, в том числе CCl_4 , могут вызывать острое повреждение данного органа. Генерируемые в ходе метаболизма CCl_4 радикалы окисляют биомолекулы различного класса в гепатоцитах, что приводит к нарушению их функционирования и гибели. Защиту печени от окислительного стресса осуществляет АОС, включающая ферментативное и неферментативное звенья. При чрезмерном образовании АФК резервов АОС может оказаться недостаточно, что обуславливает развитие окислительного стресса в тканях. В данных условиях может активизироваться синтез провоспалительных цитокинов и индуцироваться воспалительный ответ [120]. Помимо воспаления, окислительный стресс способствует запуску различных путей гибели клеток, важную роль среди которых в патогенезе ТПП играет апоптоз [128].

Исходя из этого, актуальной задачей представляется поиск новых соединений, обладающих гепатопротекторной и антиокислительной активностью. В этом ключе интерес могут вызывать дигидрохинолиновые производные – структурные аналоги антиоксиданта этоксихина. С помощью *in silico* прогнозирования биологической активности химических соединений для исследования был отобран ДГХ1, а также его структурный аналог, полученный путём введения бензольного кольца к атому азота гидрохинолинового цикла – ДГХ2. Таким образом, целью настоящей работы стало исследование гепатопротекторного потенциала ДГХ1 и ДГХ2, а также выяснение их регуляторного воздействия на воспалительные, апоптотические процессы и функционирование АОС при CCl_4 -индуцированном ТПП у крыс. Анализ токсичности *in silico* показал, что ДГХ1 и ДГХ2 относятся к 4 классу токсичности по GHS с предсказанной ЛД₅₀ 1450 и 800 мг/кг соответственно,

что существенно превышает величину дозировок данных веществ, использующихся в эксперименте – 25 и 50 мг/кг.

Известно, что CCl_4 вызывает резко выраженные нарушения клеток печени вокруг центральных вен, дистрофические изменения различной степени, включая явления некробиоза и некроза обширных областей паренхимы [100]. Полученные данные о морфологии ткани печени у животных с ТПП продемонстрировали наличие тяжёлого гепатоцеллюлярного повреждения, характеризующегося обширными участками некроза и значительной потерей архитектуры ткани, что согласуется с литературными данными [100]. В свою очередь, у крыс с ТПП, получавших ДГХ1 и ДГХ2, визуализировалось менее тяжелое повреждение печени с менее существенной, очаговой гепатоцеллюлярной дегенерацией, причём протекторный эффект тестируемых соединений был несколько более выражен по сравнению с действием карсила. Таким образом, гистологические исследования подтвердили гипотезу о наличии гепатопротекторной активности у ДГХ1 и ДГХ2, реализующейся при ТПП и превосходящей по эффективности действие препарата сравнения.

Гепатопротекторные свойства дигидрохинолиновых производных были подтверждены снижением под их воздействием активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов – АсАТ, АлАТ и ГГТП. ДГХ1 и ДГХ2 оказывали более сильное действие на данные показатели относительно препарата сравнения – карсила. Более существенный эффект по сравнению с карсилом ДГХ1 оказывал в дозе 50 мг/кг, а ДГХ2 – в дозе 25 мг/кг.

С целью исследования механизмов проявления гепатопротекторной активности дигидрохинолиновыми производными был проведён анализ интенсивности свободнорадикального окисления в печени и сыворотке крови экспериментальных животных. Результаты работы показали, что при развитии патологии наблюдалось возрастание значений I_{max} и S БХЛ, отражающих активность свободнорадикальных процессов, а также показателя tga_2 ,

характеризующего антиоксидантный потенциал. При ТПП происходило также накопление первичных продуктов ПОЛ – ДК, карбонильных остатков аминокислот в белках, угнетение активности АГ и накопление цитрата. Введение ДГХ1 и ДГХ2 на фоне развития ТПП способствовало изменению всех исследуемых параметров в направлении контрольных значений. Тестируемые соединения, судя по всему, оказывали прямое антиоксидантное действие, что отражалось на снижении показателей интенсивности свободнорадикального окисления. При этом, эффективнее карсила ДГХ1 выступал при использовании его в дозе 50 мг/кг, а ДГХ2 – в обеих дозировках.

Результаты нашей работы показали, что активизация свободнорадикального окисления, вызванная CCl_4 , сопровождалась развитием воспаления. Так, индукция ТПП у крыс приводила к возрастанию активности МПО в печени, а также увеличению уровня транскриптов генов *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Ptgs2* и *Nfkb2*. Введение ДГХ1 и ДГХ2 на фоне патологии снижало активность воспалительных процессов, о чём свидетельствовало понижение активности МПО и уровня мРНК генов цитокинов и транскрипционного фактора NF- κ B. Таким образом, тестируемые соединения продемонстрировали противовоспалительную активность, причём по отношению к большинству показателей развития воспалительного процесса были более эффективны, чем карсил.

С целью уточнения механизмов действия дигидрохинолиновых производных на регуляцию воспалительного ответа была проведена оценка функционирования NLRP3 сигнального пути у экспериментальных животных. Было показано, что экспрессия продуктов NLRP3-инфламмосомы – активированной каспазы-1 и расщепленного IL-1 β – была значительно повышена у животных с ТПП по сравнению с контролем. В свою очередь, введение ДГХ1 тормозило активацию NLRP3-инфламмосомы, в также приводило к снижению уровня активированной каспазы-1 и зрелой формы IL-1 β . Судя по всему, в качестве важного механизма реализации

гепатопротекторного и противовоспалительного эффекта дигирохинолиновых производных могла выступать их способность ингибировать активацию NLRP3-инфламмосомы [101, 202].

Индукция ТПП у экспериментальных животных была сопряжена со значительным возрастанием в печени активности индукторной каспазы-8, участвующей в передаче апоптотического сигнала от рецепторов лигандов смерти, и эффекторной каспазы-3. Кроме этого, моделирование ТПП сопровождалось возрастанием уровня транскриптов фактора AIF – белка митохондриального межмембранного пространства, который при повышении проницаемости наружной митохондриальной мембраны высвобождается и транслоцируется в ядро, где вызывает двухцепочечные разрывы и конденсацию ДНК [168,171]. Значимое воздействие на параметры, отражающие активность апоптотических процессов, оказывал ДГХ1, что подтверждает способность данного соединения снижать интенсивность апоптоза, выступающего в роли одного из факторов поражения печени при токсическом действии CCl_4 . По-видимому, проявляя противовоспалительные и антиокислительные свойства, ДГХ1 способствовал уменьшению уровня сигналов, опосредующих активацию как митохондриального, так и лиганд-опосредованного путей апоптоза.

Проведённые исследования показали, что развитие ТПП у крыс приводило к возрастанию активности СОД и каталазы, что, по-видимому, являлось результатом адаптивной реакции на введение ксенобиотика и развитие окислительного стресса. Кроме этого, у животных с патологией наблюдалось разнонаправленное изменение показателей, отражающих функционирование глутатионовой АОС. Так, развитие патологии у животных приводило к увеличению активности ГП и ГР относительно контроля. Вместе с тем, наблюдалось падение активности ГТ в печени животных с ТПП. Концентрация GSH при этом изменялась в тканях разнонаправленно: увеличивалась в печени и уменьшалась в сыворотке крови. Индукция ТПП у

крыс сопровождалась также истощением пула α -токоферола, расходование которого могло быть связано с восстановлением свободных радикалов. Изменение активности антиоксидантных ферментов при ТПП сопровождалось соответствующими сдвигами уровней мРНК их генов. Происходило также накопление транскриптов генов факторов, играющих центральную роль в реализации клеточной защиты от действия свободных радикалов – *Nrf2* и *Foxo1*. Введение дигидрохинолиновых производных на фоне патологии способствовало изменению активности антиоксидантных ферментов, уровня мРНК их генов и концентрации неферментативных антиоксидантов в направлении контрольных значений. По-видимому, проявляя антиокислительную активность, производные дигидрохинолина нивелировали развивающиеся нарушения в координации работы АОС. Полученные данные продемонстрировали, что дигидрохинолиновые производные оказывали более существенное воздействие на параметры функционирования АОС по сравнению с карсиллом. Кроме этого, наблюдалось дополнительное стимулирующее воздействие ДГХ2 на уровень мРНК *Sod1*, *Gpx1* и *Gsta2*, что могло быть реализовано посредством моделирования транскрипции факторов *Nrf2* и *FOXO1*. Судя по всему, данный эффект соединения, наряду с его прямым антиоксидантным действием, лежал в основе снижения интенсивности свободнорадикального окисления при ТПП.

С целью выяснения регуляторного влияния дигидрохинолиновых производных на молекулы антиоксидантных ферментов были исследованы некоторые каталитические свойства ГП из печени крыс в условиях развития ТПП и действия ДГХ1. На основании проведенной работы было показано, что ДГХ1 изменял в направлении контроля Км ГП по отношению к GSH, оптимум рН для фермента, а также характер влияния на его активность различных концентраций цитрата, глюкозо-6-фосфата и ионов Fe^{2+} . По-видимому, наблюдаемые изменения каталитических и регуляторных свойств ГП происходили вследствие нормализации состояния оксидативного статуса в

ткани печени под действием ДГХ1. Полученные данные свидетельствуют, что дигидрохинолиновые производные, помимо влияния на интенсивность свободнорадикального окисления и транскрипцию генов антиоксидантных белков, могут оказывать модулирующее действие на АОС через изменение свойств молекул ферментов данной системы.

Как показали наши исследования, моделирование ТПП у крыс сопровождалось возрастанием активности НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ в печени и сыворотке крови. Введение ДГХ1 и ДГХ2 на фоне патологии обеспечивало снижение активности НАДФН-генерирующих ферментов, что, по-видимому, было связано с уменьшением нагрузки на АОС клеток печени и снижением потребности в НАДФН.

На основании полученных данных установлено, что по отношению к ряду исследуемых показателей тестируемые дигидрохинолиновые производные проявляли дозозависимый эффект. При этом, ДГХ1 оказывал более выраженное действие в дозировке 50 мг/кг, тогда как ДГХ2 был более эффективен в большинстве случаев при использовании в дозе 25 мг/кг. По результатам работы предложена гипотетическая схема воздействия дигидрохинолиновых производных на основные патогенетические механизмы развития ТПП и регуляцию функционирования АОС (рис. 24).

Таким образом, проведённое исследование показало, что тестируемые дигидрохинолиновые производные оказывают гепатопротекторный эффект при ТПП посредством ингибирования активности свободнорадикальных, воспалительных и апоптотических процессов, а также регуляции функционирования АОС у лабораторных животных. По отношению к большинству анализируемых параметров ДГХ1 и ДГХ2 оказывали более выраженное воздействие по сравнению с карсилом.

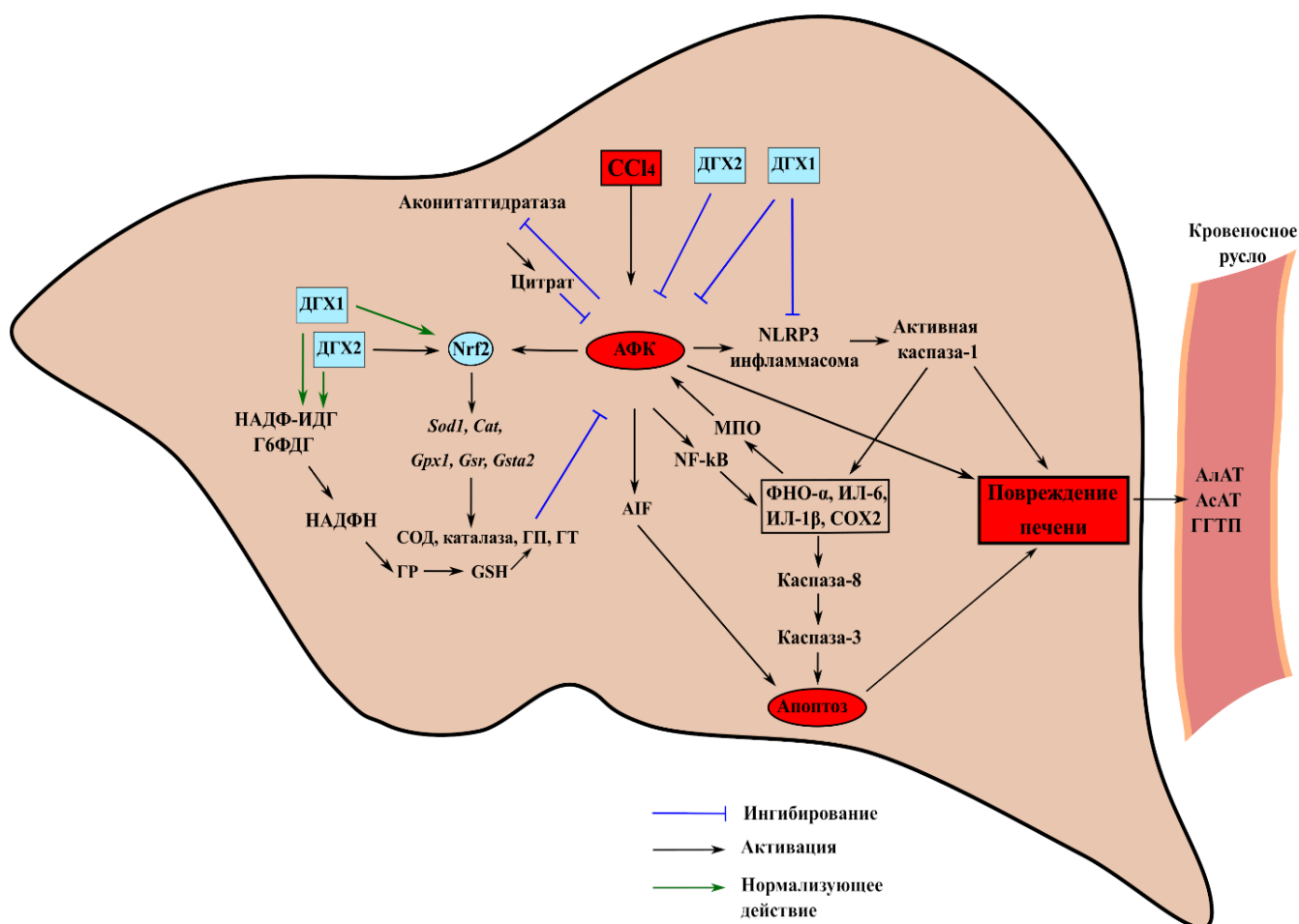


Рисунок 24. Гипотетическая схема воздействия дигидрохинолиновых производных на основные патогенетические механизмы развития токсического поражения печени и регуляцию функционирования антиоксидантной системы.

Введение крысам 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ2) на фоне токсического поражения печени способствовало снижению интенсивности свободнорадикального окисления, что сопровождалось торможением воспалительного ответа, регулируемого редокс-чувствительным фактором NF-kB и NLRP3-инфламмосомой, а также активности процессов апоптоза. Происходящие изменения отражались в нормализации морфологии паренхимы печени и уровня ферментативной активности маркеров цитолиза гепатоцитов. Под действием

дигидрохинолиновых производных происходило уменьшение выраженности дисбаланса в функционировании антиоксидантной системы, что могло быть связано со способностью тестируемых соединений регулировать активность генов антиоксидантов и транскрипционных факторов Nrf2 и Foxo1, а также их модулирующим воздействием на молекулы антиоксидантных ферментов.

ВЫВОДЫ

1. Отобранные на основе компьютерного прогнозирования биологической активности соединения – ДГХ1 и его структурный аналог ДГХ2 – оказывали значительно более выраженное гепатопротекторное действие при тетрахлорметановом поражении печени у крыс по сравнению с карсилом, что выражалась в более существенном снижении активности маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов и степени гистопатологических изменений в ткани печени.

2. ДГХ1 и ДГХ2 проявляли антиоксидантное действие при токсическом поражении печени, о чём свидетельствовало уменьшение параметров биохемилюминесценции, содержания первичных продуктов пероксидного окисления липидов и уровня карбонильных остатков аминокислот в белках, а также восстановление активности аконитатгидратазы.

3. Тестируемые дигидрохинолиновые производные тормозили развитие воспалительного ответа в условиях токсического поражения печени у крыс посредством уменьшения уровня транскриптов гена фактора NF- κ B и экспрессии NLRP3-инфламмосомы, что сопровождалось снижением содержания мРНК провоспалительных цитокинов и активности миелопероксидазы.

4. ДГХ1 снижал активность каспаз и содержание мРНК апоптоз-индуцибельного фактора AIF у животных с патологией, что говорит о наличии у тестируемого соединения способности регулировать интенсивность апоптоза.

5. Введение дигидрохинолиновых производных крысам с ТПП способствовало нормализации активности ферментов антиокислительной защиты и концентрации неферментативных антиоксидантов. Наблюдалось

изменение активности НАДФН-генерирующих ферментов в направлении контроля под действием ДГХ1 и ДГХ2, что могло вносить существенный вклад в снижение выраженности дисбаланса в функционировании глутатионовой АОС.

6. Применение ДГХ1 и ДГХ2 на фоне ТПП приводило к сдвигу в направлении значений контрольной группы уровня транскриптов генов ферментов АОС, а также содержания мРНК транскрипционных факторов Nrf2 и Foxo1. ДГХ2 оказывал дополнительное стимулирующее воздействие на экспрессию генов *Sod1*, *Gpx1* и *Gsta2*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агарков А.А., Попова Т.Н., Матасова Л.В., Попов С.С., Искусных И.Ю., Склярова Е.И. Оценка степени фрагментации ДНК, активности аконитатгидратазы и уровня цитрата при сахарном диабете 2 типа у крыс и введении мелатонина // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2012. – Т. 20, № 3. – С. 21-26.
2. Азизова О.А., Пирязев А.П., Москвина С.Н., Асейчев А.В. Метод определения окисляемости белков сыворотки и плазмы крови // Биомед химия. – 2007. – Т. 53, № 1. – С. 99-106.
3. Веб-сервер для прогнозирования токсичности химических веществ [Электронный ресурс] / режим доступа: http://tox.charite.de/protox_II/index.php?site=home
4. Венгеровский А.И., Хазанов В.А. Влияние силимарина и его комбинации с янтарной кислотой на биоэнергетику головного мозга при экспериментальном ингибировании бета-окисления жирных кислот // Экспер клин фармакол. – 2007. – Т. 70, №2. – С. 51-55.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика // М.: Практика, 1998. – 459 с.
6. Горбенко М.В., Попова Т.Н., Шульгин К.К., Попов С.С. Влияние мелаксена и вальдоксана на активность глутатионовой антиоксидантной системы и НАДФН-генерирующих ферментов в сердце крыс при экспериментальном гипертиреозе // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 10. – С. 12-15.
7. Котович И.В., Елисейкин Д.В. Биохимия гетероциклических соединений // Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 28 с.
8. Логинов А.Ф., Буторова Л.И., Логинов В.А. Лекарственные поражения печени: диагностика, лечение // РМЖ. Гастроэнтерология. – 2016. – № 11. – С. 721-727.

9. Мартимьянова М.А. Методы определения активности ферментов. – М.: Издательство РХТУ, 1996. – 203 с.
10. Матасова Л.В., Попова Т.Н. Аконитаза млекопитающих при окислительном стрессе // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 9. – С. 1189 - 1198.
11. Матюшин Б.Н., Логинов А.С., Ткачѳв В.Д. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16 - 19.
12. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
13. Мешкова Н. П., Северин С.Е. Практикум по биохимии / под ред. Мешковой Н.П. и Северина С.Е. – М.: Издательство МГУ. – 1979. – 429 с.
14. Попов С.С., Пашков А.И., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Рахманова Т.И., Семенихина А.В. Активность глутатионовой антиоксидантной системы при гипертиреозе и при действии мелатонина // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т. 54, № 3. – С. 47-50.
15. Попов С.С., Пашков А.Н., Агарков А.А., Шульгин К.К. Интенсивность процессов апоптоза, активность аконитатгидратазы и уровень цитрата у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, осложненным стеатогепатитом, при применении эпифамина на фоне базисного лечения // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 3. – С. 400-406.
16. Попов С.С., Пашков А.Н., Золоедов В.И., Шведов Г.И. Применение мелатонина в комбинированной терапии при лечении лекарственного гепатита // Клиническая медицина. – 2013. – Т. 91, № 3. – С. 50-53.
17. Попов С.С., Пашков А.Н., Попова Т.Н., Золоедов В.И., Семенихина А.В., Рахманова Т.И. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при тиреотоксикозе // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, № 1. – С. 114-121.

18. Попова Т.Н. Исоитратдегидрогеназы: формы, локализация, свойства и регуляция // Биохимия. – 1993. – Т. 58. – С. 1861-1879.
19. Попова Т.Н., Рахманова Т.И., Попов С.С. Медицинская энзимология / учебное пособие // Воронеж: Издательство ВГУ, 2008. – 63 с.
20. Программный пакет для прогнозирования спектра биологической активности органических соединений Online [Электронный ресурс] / режим доступа: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline>
21. Рахманова Т.И., Матасова Л.В., Семенихина А.В., Сафонова О.А., Макеева А.В., Попова Т.Н. Методы оценки оксидативного статуса / учебное пособие // Воронеж: Издательство ВГУ, 2009. – 61 с.
22. Сафонова О.А., Шульгин К.К., Агарков А.А., Попова Т.Н., Саиди Л. Применение различных видов хроматографии для очистки глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы из патологически измененной печени крыс // Сорб и хром процессы. – 2011. – Т. 11. № 6. – С. 934-941.
23. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. – 1977. – М.: Медицина. – С. 63-64.
24. Титова Н.М., Замай Т. Н., Субботина Т. Н., Савченко А.А. Оценка структурно-функционального состояния клетки. – Красноярск: ИПК СФУ. – 2009. – 61 с.
25. Шульгин К.К. Регуляция активности глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени крыс и действии веществ-протекторов: дисс. канд. биол. наук.: 03.00.04 / Шульгин Константин Константинович. – Воронеж. – 173 с.
26. Шульгин К.К., Попов С.С., Рахманова Т.И., Попова Т.Н., Сафонова О.А., Вережкин А.Н., Семенихина А.В., Гончарова Е.И. Активность глутатионпероксидазы при нарушении функции печени и выделение фермента с использованием хроматографических методов для исследования

- регуляторных свойств // Сорб и хром процессы. – 2016. – Т. 16. № 6. – С. 916-923.
27. Abboud G., Kaplowitz N. Drug-induced liver injury // *Drug Saf.* – 2007. – V.30, No 4. – P. 277-294.
28. Abdel-Salam O.M., Youness E.R., Mohammed N.A., Yassen N.N., Khadrawy Y.A., El-Toukhy S.E., Sleem A.A. Novel neuroprotective and hepatoprotective effects of citric acid in acute malathion intoxication // *Asian Pac J Trop Med.* – 2016. – V. 9, No 12. – P. 1181-1194.
29. Almasio P., Pagliaro L. Ademetionine: the state of the art and future prospects // *Ann Ital Med Int.* – 1993. – Suppl:52S-55S.
30. Ansari J.A. Therapeutic Approaches in Management of Drug-induced Hepatotoxicity // *J of Biological Sciences.* – 2010. – V. 10. – P. 386 – 395.
31. Ashkenazi A., Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms // *Annu Rev Cell Dev Biol.* – 2014. – V. 30. – P. 337-356.
32. Bagautdinov A.M., Baymatov V., Farkhutdinov R.R., Gizatullin T.R., Zinatullin R.M. Method for preventing liver pathology in pigs // Patent RU2483695 C1. 2013. Bulletin № 16.
33. Bampidis V., Azimonti G., Bastos M.L., Christensen H., Dusemund B., Fasmon Durjava M., Kouba M., Lopez-Alonso M., Lopez Puente S., Marcon F., Mayo B., Pechova A., Petkova M., Ramos F., Sanz Y., Villa R.E., Woutersen R., Finizio A., Teodorovic I., Aquilina G., Bories G., Gropp J., Nebbia C., Tarres-Call J., Innocenti M. Safety and efficacy of ethoxyquin (6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) for all animal species // *EFSA Journal.* – 2015. – V. 13, No 11:4272.
34. Banu S., Bollu R., Nagarapu L., Nanubolu J.B., Yogeswari P., Sriram D., Gunda S.K., Vardhan D. Design, Synthesis, and in vitro antitubercular activity of 1,2,3-triazolyl-dihydroquinoline derivatives. Design, synthesis, and in vitro antitubercular activity of 1,2,3-triazolyl-dihydroquinoline derivatives // *Chem Biol Drug Des.* – 2018. – V. 92, No 1. – P. 1315-1323.

35. Bechynska K., Kosek V., Fenclova M., Muchova L., Smid V., Suk J., Chalupsky K., Sticova E., Hurkova K., Hajslova J., Vitek L., Stranska M. The Effect of Mycotoxins and Silymarin on Liver Lipidome of Mice with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11, No 11. – 5723 p.
36. Belfieldm K., Tichy E. Review and drug therapy implications of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency // *Am J Health Syst Pharm*. – 2018. – V. 75, No 3. – P. 97-104.
37. Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation // *Nat Rev Microbiol*. – 2009. – V. 7, No 2. – P. 99-109.
38. Beus M., Fontinha D., Held J., Rajic Z., Uzelac L., Kralj M., Prudencio M., Zorc B. Primaquine and Chloroquine Fumardiamides as Promising Antiplasmodial Agents // *Molecules*. – 2019. – V.24, No 15. – 2812 p.
39. Beutler, E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective // *Blood*. – 2008. – V. 111, No 1. – P.16 – 24.
40. Blaszczyk A. DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes // *Toxicol Lett*. – 2006. – V. 163. – P.77-83.
41. Blaszczyk A., Augustyniak A., Skolimowski J. Ethoxyquin: An Antioxidant Used in Animal Feed // *Int. J. Food Sci*. – 2013. – V. 2013, No 2013: 585931.
42. Boyle S.P., Dobson V.L., Duthie S.J., Hinselwood D.C., Kyle J.A., Collins A.R. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study // *Eur J Clin Nutr*. – 2000. – V. 54, No 10. – P. 774-782.
43. Burka L.T., Sanders J.M., Matthews H.B. Comparative metabolism and disposition of ethoxyquin in rat and mouse. II. Metabolism // *Xenobiotica*. – 1996. – V. 26, No 6. – P. 597-611.
44. Bywaters H.W. One hundred years ago in Science Progress // *Sci Prog*. – 2015. – Vol. 98, No 2. – P. 210-215.
45. Cai D., Brickey W.J., Ting J.P., Sad S. Isolates of *Salmonella typhimurium* circumvent NLRP3 inflammasome recognition in macrophages during the chronic phase of infection // *J Biol Chem*. – 2022. – V. 298, No 1. – 101461 p.

46. Calabrese E. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment // *Hum Exp Toxicol.* – 2010. – V.29, No 4. – P. 249-261.
47. Celebioglu A., Uyar T. Antioxidant Vitamin E/Cyclodextrin Inclusion Complex Electrospun Nanofibers: Enhanced Water Solubility, Prolonged Shelf Life, and Photostability of Vitamin E // *J Agric Food Chem.* – 2017. – V. 65, No 26. – P. 5404-5412.
48. Cha Y.N., Heine H.S., Ansher S. Comparative effects of dietary administration of antioxidants and inducers on the activities of several hepatic enzymes in mice // *Drug Nutr Interact.* – 1983. – V. 2, No 1. – P.35-44.
49. Chacko S., Samanta S. A novel approach towards design, synthesis and evaluation of some Schiff base analogues of 2-aminopyridine and 2-aminobenzothiazole against hepatocellular carcinoma // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – V. 89. – P. 162-176.
50. Chand N., Naz S., Rehman Z., Khan R.U. Blood biochemical profile of four fast-growing broiler strains under high ambient temperature // *Environ Sci Pollut Res. Int.* – 2017. – V. 24, No 34. – P. 26851-26857.
51. Chen D., Ni H.M., Wang L., Ma X., Yu J., Ding W.X., Zhang L. p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis Induction Mediates Acetaminophen-Induced Necrosis and Liver Injury in Mice // *Hepatology.* – 2019. – V. 69, No 5. – P. 2164-2179.
52. Chen H., Smith G.J., Li K.S., Wang J., Fan X.H., Rayner J.M., Vijaykrishna D., Zhang J.X., Zhang L.J., Guo C.T., Cheung C.L., Xu K.M., Duan L., Huang K., Qin K., Leung Y.H., Wu W.L., Lu H.R., Chen Y., Xia N.S., Naipospos T.S., Yuen K.Y., Hassan S.S., Bahri S., Nguyen T.D., Webster R.G., Peiris J.S., Guan Y. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – V. 103, No 8. – P. 2845-50.

53. Chen L., Li S., Guo X., Xie P., Chen J. The role of GSH in microcystin-induced apoptosis in rat liver: Involvement of oxidative stress and NF- κ B // *Environmental Toxicology*. – 2016. – V. 31. – P. 552-560.
54. Chen Y.L., Xu G., Liang X., Wei J., Luo J., Chen G.N., Yan X.D., Wen X.P., Zhong M., Lv X. Inhibition of hepatic cells pyroptosis attenuates CLP-induced acute liver injury // *Am J Transl Res*. – 2016. – V. 8, No 12. – P. 5685-5695.
55. Cheng G., Zielonka M., Dranka B., Kumar S.N., Myers C.R., Bennett B., Garces A.M., Dias Duarte Machado L.G., Thiebaut D., Ouari O., Hardy M., Zielonka J., Kalyanaraman B. Detection of mitochondria-generated reactive oxygen species in cells using multiple probes and methods: potentials, pitfalls, and the future // *Biol Chem*. – 2018. – V. 10, No 26. – P. 1098-1108.
56. Creagh E.M., Conroy H., Martin S.J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity // *Immunol Rev*. – 2003. – V. 193. – P. 10-21.
57. Dara L., Han D., Kaplowitz N. Mechanisms of Cell Death and Relevance to Drug Toxicity // In: *Drug-Induced Liver Disease 3rd ed.* – Cambridge, MA, USA: Academic Press (an imprint of Elsevier). – 2013. – P. 101-122.
58. Deisseroth A., Dounce A.L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role // *Physiological Reviews*. – 1970. – V. 50, No 3. – P. 319-375.
59. Desai I.D., Martinez F.E. Bilirubin interference in the colorimetric assay of plasma vitamin E // *Clin Chim Acta*. – 1986. – V. 154. – P. 247-250.
60. Dey A., Lakshmanan J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver // *Food Funct*. – 2013. – V. 4, No 8. – P. 1148-1184.
61. Di Costanzo, A., Angelico R. Formulation Strategies for Enhancing the Bioavailability of Silymarin: The State of the Art // *Molecules*. – 2019. – V. 24, No 11: 2155.

62. Di Mascio P., Murphy M.E., Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols // *Am J Clin Nutr.* – 1991. – V. 53 (1 Suppl.) :194S-200S.
63. Dimayuga F.O., Wang C., Clark J.M., Dimayuga E.R., Dimayuga V.M., Bruce-Keller A.J. SOD1 overexpression alters ROS production and reduces neurotoxic inflammatory signaling in microglial cells // *Neuroimmunol.* – 2007. – V. 187, No 2. – P. 89-99.
64. Dutta S., Chakraborty A.K., Dey P., Kar P., Guha P., Sen S., Kumar A., Sen A., Chaudhuri T.K. Amelioration of CCl₄ induced liver injury in swiss albino mice by antioxidant rich leaf extract of *Croton bonplandianus* Baill // *PLoS One.* – 2018. – V. 13, No 4: e0196411.
65. El Bakkali M., Ismaili L., Tomassoli I., Nicod L., Pudlo M., Refouvelet B. Pharmacophore modelling and synthesis of quinoline-3-carbohydrazide as antioxidants // *Int J Med Chem.* – 2011. – V. 2011: 592879.
66. El Shehry M.F., Ghorab M.M., Abbas S.Y., Fayed E.A., Shedid S.A., Ammar Y.A. Quinoline derivatives bearing pyrazole moiety: Synthesis and biological evaluation as possible antibacterial and antifungal agents // *Eur J Med Chem.* – 2018. – V. 143. – P. 1463-1473.
67. Elgawish R.A.R., Rahman H.G.A., Abdelrazek H.M.A. Green tea extract attenuates CCl₄-induced hepatic injury in male hamsters via inhibition of lipid peroxidation and p53-mediated apoptosis // *Toxicology Reports.* – 2015. – V. 2. – P. 1149-1156.
68. Engel K.M., Schiller J., Galuska C.E., Fuchs B. Phospholipases and Reactive Oxygen Species Derived Lipid Biomarkers in Healthy and Diseased Humans and Animals - A Focus on Lysophosphatidylcholine // *Front Physiol.* – 2021. – V. 12: 732319.
69. Fedorova M., Bollineni R.C., Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies // *Inc Mass Spec Rev.* – 2014. – V. 33, No 2. – P. 79 – 97

70. Feher J., Bar-Pollak Z., Sreter L., Feher E., Toncsev H. Biochemical markers in carbon-tetrachloride- and galactosamine-induced acute liver injuries: the effects of dihydroquinoline-type antioxidants // *Br J Exp Pathol.* – 1982. – V. 63, No 4. – P. 394-400.
71. Fernández-Bachiller M.I., Perez C., Gonzalez-Munoz G.C., Conde S., Lopez M.G., Villarroya M., Garcia A.G., Rodriguez-Franco M.I. Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties // *J Med Chem* – 2010. – V. 53, No 13. – P. 4927-4937.
72. Fernando D.H., Forbes J.M., Angus P.W., Herath C.B. Development and Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Advanced Glycation End Products // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20, No 20. – 5037 p.
73. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs // *Cell Death Differ.* – 2015. – V. 22, No 3. – P. 377-388.
74. Fiorito J., Saeed F., Zhang H., Staniszewski A., Feng Y., Francis Y.I., Rao S., Thakkar D.M., Deng S.X., Landry D.W., Arancio O. Synthesis of quinoline derivatives: discovery of a potent and selective phosphodiesterase 5 inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease // *Eur J Med Chem.* – 2013. – V. 60. – P. 285-294.
75. Franchi L., Eigenbrod T., Munoz-Planillo R., Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis // *Nat Immunol.* – 2009. – V. 10. – P. 241-247.
76. Glorieux C., Calderon P.B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach // *Biol Chem.* – 2017. – V. 398, No 10. – P. 1095-1108.
77. Gobbo M.G., Costa C.F., Silva D.G., de Almeida E.A., Goes R.M. Effect of Melatonin Intake on Oxidative Stress Biomarkers in Male Reproductive Organs

- of Rats under Experimental Diabetes // *Oxid Med Cell Longev.* – V. 2015, No 2015: 614579.
78. Gros Lambert M., Py B.F. Regulation of the NLRP3 inflammasome // *Med Sci (Paris).* – 2018. – V.34, No 1. – P. 47-53.
79. Guicciardi M.E., Gores G.J. Life and death by death receptors // *FASEB J.* – 2009. – V. 23, No 6. – P. 1625-1637.
80. Gunathilaka M.L., Niriella M.A., Luke N.V., Piyarathna C.L., Siriwardena R.C., De Silva A.P., de Silva H.J. Possible gasoline-induced chronic liver injury due to occupational malpractice in a motor mechanic: a case report // *J Med Case Reports.* – 2017. – V. 11, No 1. – 179 p.
81. Gundermann K.J., Gundermann S., Drozdzik M., Mohan Prasad V.G. Essential phospholipids in fatty liver: a scientific update // *Clin Exp Gastroenterol.* – 2016. – V. 9. – P. 105-117.
82. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics // *Nature medicine.* – 2015. – V. 21, No 7. – 677 p.
83. Halliwell B., Gutteridge J.M. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death // *Free Radicals in Biology and Medicine*, Chapter 2. 3rd. – 1999. – P. 36-104.
84. Harris T.R., Kodani S., Rand A.A., Yang J., Imai D., Hwang S.H., Hammock B.D. Celecoxib Does Not Protect against Fibrosis and Inflammation in a Carbon Tetrachloride-Induced Model of Liver Injury // *Molecular Pharmacology.* – 2018. – V. 94, No 2. – P. 834-841.
85. Harvey C.J. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress // *Free Radic Biol Med.* – 2009. – V. 46. – P. 443-453.
86. Hayes J.D., McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer // *Trends Biochem. Sci.* – 2009. – V. 34, No 4. – P. 176-188.

87. He Y., Hara H., Nunez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation // *Trends Biochem Sci.* – 2016. – V. 41, No 12. – P. 1012-1021.
88. Herrera B., Alvarez A.M., Sanchez A., Fernandez M., Roncero C., Benito M., Fabregat I. Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes // *FASEB J.* – 2001. – V. 15, No 3. – P. 741-751.
89. Ho H.Y., Cheng M.L., Chiu D.T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases // *Redox Rep.* – 2007. – V. 12, No 3. – P. 109-118.
90. Hoffmann A., Natoli G., Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module // *Oncogene.* – 2016. – V. 25, No 51. – P. 6706-6716.
91. Houben – Weyl E. Oxidants // Stuttgart: Tieme Verlag. – 2003. — 189 p.
92. Hua K.F. Cyclooxygenase-2 regulates NLRP3 inflammasome-derived IL-1 β production // *J Cell Physiol.* – 2015. – V. 230, No 4. – P. 863-874.
93. Ikram M., Park H.Y., Ali T., Kim M.O. Melatonin as a Potential Regulator of Oxidative Stress, and Neuroinflammation: Mechanisms and Implications for the Management of Brain Injury-Induced Neurodegeneration // *J. Inflamm. Res.* – 2020. – V. 27, No 14. – P. 6251-6264.
94. Iqbal S., Heller S. Managing hypoglycaemia // *Nutrition.* – 2015. – V. 31, No 8. – P. 901-907.
95. Irita K., Okabe H., Koga A., Yamakawa M., Yoshitake J., Takahashi S. The effects of dichloroacetate on liver damage and circulating fuels in rats exposed to carbon tetrachloride // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2014. – V. 9, No 1. – P. 26-29.
96. Isazadeh M., Amandadi M., Haghdoost F., Lotfollazadeh S., Orzaez M., Hosseinkhani S. Split-luciferase complementary assay of NLRP3 PYD-PYD interaction indicates inflammasome formation during inflammation // *Anal Biochem.* – 2022. – V. 638. – 114510 p.
97. Iskusnykh I.Y., Kryl'skii E.D., Brazhnikova D.A., Popova T.N., Shulgin K.K., Matasova L.V., Zhaglin D.A., Shikhaliev K.S., Popov S.S., Zakharova A.A.,

- Popova N.R., Fattakhov N. Novel antioxidant, deethylated ethoxyquin, protects against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats by inhibiting nlrp3 inflammasome activation and apoptosis // *Antioxidants*. – 2021. – V. 10, No 1. – P. 1-19.
98. Itsumi M., Inoue S., Elia A.J., Murakami K., Sasaki M., Lind E.F., Brenner D., Harris I.S., Chio I.I., Afzal S., Cairns R.A., Cescon D.W., Elford A.R., Ye J., Lang P.A., Li W.Y., Wakeham A., Duncan G.S., Haight J., You-Ten A., Snow B., Yamamoto K., Ohashi P.S., Mak T.W. Iidh1 protects murine hepatocytes from endotoxin-induced oxidative stress by regulating the intracellular NADP (+) / NADPH ratio // *Cell Death Differ.* – 2015. – V. 22, No 11. – P. 1837-1845.
99. Jarup L., Akesson L. Current status of cadmium as an environmental health problem // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2009. – V. 238. – P. 201
100. Jeong T.B., Kwon D., Son S.W., Kim S.H., Lee Y.H., Seo M.S., Kim K.S., Jung Y.S. W. Mice and Adult Mice Exhibit Differential Carbon Tetrachloride-Induced Acute Hepatotoxicity // *J Antioxidants (Basel)*. – 2020. – V. 9, No 3. – 201 p.
101. Jia C., Zhang J., Chen H., Zhuge Y., Chen H., Qian F., Zhou K., Niu C., Wang F., Qiu H., Wang Z., Xiao J., Rong X., Chu M. Endothelial cell pyroptosis plays an important role in Kawasaki disease via HMGB1/RAGE/cathepsin B signaling pathway and NLRP3 inflammasome activation // *Cell Death Dis.* – 2019. – V. 10, No 10: 778.
102. Jiang Y., Yan F., Feng Z., Lazarovici P., Zheng W. Signaling Network of Forkhead Family of Transcription Factors (FOXO) in Dietary Restriction // *Cells*. – 2019. – V. 9, No 1. – 100 p.
103. Jin X., Jin H., Shi Y., Guo Y., Zhang H. Pyroptosis, a novel mechanism implicated in cataracts // *Mol Med Rep.* – 2018. – V. 18, № 2. – P. 2277 – 2285.
104. Jin Y., Li C., Xu D., Zhu J., Wei S., Zhong A., Sheng M., Duarte S., Coito A.J., Busuttill R.W., Xia Q., Kupiec-Weglinski J.W., Ke B. Jagged1-mediated myeloid Notch1 signaling activates HSF1/Snail and controls NLRP3

- inflammasome activation in liver inflammatory injury // *Cell Mol Immunol.* – 2019. – V. 17, No 2020. – P. 1245-1256.
105. Katagiri K., Matsuzawa A., Ichijo H. Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in redox signaling // *Methods Enzymol.* – 2010. – V. 474. – P. 277-288.
106. Kelley N., Jeltema D., Duan Y., He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20, No 13: 3328.
107. Khramtsova I.O., Derbak M.A., Ganich T.M., Boldizhar O.O., Lazur Y.V. The effectiveness of complex therapy with the inclusion of the ursodeoxycholic acid in patients with non-alcoholic fatty liver disease in combination with chronic obstructive pulmonary disease // *Wiad Lek.* – 2021. – V. 74, No 10. – P. 2575-2579.
108. Kim H.L., Anderson A.C., Herrig B.W., Jones L.P., Calhoun M.C. Protective effects of antioxidants on bitterweed (*Hymenoxys odorata* DC) toxicity in sheep // *Am J Vet Res.* – 1982. – V. 43, No 11. – P. 1945-1950.
109. Kim K.H., Lee M.S. H. Autophagy-a key player in cellular and body metabolism // *Nat Rev Endocrinol.* – 2014. – V. 10, No 6. – P. 322-337.
110. Koroleva L.R. Modern hepatoprotectors // *Russian Medical Journal.* – 2005. – V. 67, No 2. – P. 35-37.
111. Kryl'skii E.D., Popova T.N., Safonova O.A., Stolyarova A.O., Razuvaev G.A., de Carvalho M.A.P. Transcriptional regulation of antioxidant enzymes activity and modulation of oxidative stress by melatonin in rats under cerebral ischemia / reperfusion conditions // *Neuroscience.* – 2019. – V. 406. – P. 653-666.
112. Kucukkurt I., Ince S., Keles H., Akkol E.K., Avci G., Yesilada E., Bacak E. Beneficial effects of *Aesculus hippocastanum* L. seed extract on the body's own antioxidant defense system on subacute administration // *J Ethnopharmacol.* – 2010. – V. 129, No 1. – P. 18-22.

113. Kuehne A., Emmert H., Soehle J., Winnefeld M., Fischer F., Wenck H., Gallinat S., Terstegen L., Lucius R., Hildebrand J., Zamboni N. Acute activation of oxidative pentose phosphate pathway as first-line response to oxidative stress in human skin cells // *EMBO J.* – 2014. – V. 33, No 12. – P. 1304-1320.
114. Kuhn V., Diederich L., Keller T.C.S. 4th, Kramer C.M., Luckstadt W., Panknin C., Suvorava T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M. Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. – V. 26, No 13. – P. 718-742.
115. Kuloglu, N.A., Sonmez M.F. Biochemical and immunohistochemical study of the protective effects of carnosine for carbon tetrachloride induced liver injury in rats // *Biotech. Histochem.* – 2015. – V. 90, No 8. – P. 608-614.
116. Latz E. Activation and regulation of the inflammasomes // *Nat Rev Immunol.* – 2013. – V. 13, No 6. – P. 397-411.
117. Lee W.M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? // *J Hepatol.* – 2017. – V. 67, No 7. – P. 1324-1331.
118. Lee Y.S., Cho I.J., Kim J.W., Lee M.K., Ku S.K., Choi J.S., Lee H.J. Hepatoprotective effects of blue honeysuckle on CCl₄-induced acute liver damaged mice // *Food Sci Nutr.* – 2018. – V. 7, No 1. – P. 322-338.
119. Leng W., Wu M., Pan H., Lei X., Chen L., Wu Q., Ouyang X, Liang Z. The SGLT2 inhibitor dapagliflozin attenuates the activity of ROS-NLRP3 inflammasome axis in steatohepatitis with diabetes mellitus // *Ann Transl Med.* – 2019. – V.7, No 18:429.
120. Li R., Wang Y., Zhao E., Wu K., Li W., Shi L., Wang D., Xie G., Yin Y., Deng M., Zhang P., Tao K. Maresin 1, a Proresolving Lipid Mediator, Mitigates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury in Mice // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – V. 11. – P. 1-13.
121. Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang Z.J., Lao L., Wong C.W., Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases // *Int J Mol Sci.* – 2015. – V. 16, No 11. – P.26087-26124.

122. Li Z., Tuteja G., Schug J., Kaestner K.H. Foxa1 and Foxa2 are Essential for Sexual Dimorphism in Liver Cancer // *Cell*. – 2012. – V. 148, No 2. – P. 72-78.
123. Lim J.Y., Yun D.H., Lee J.H., Kwon Y.B., Lee Y.M., Lee D.H., Kim D.K. Extract of *Triticum aestivum* Sprouts Suppresses Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mice by Inhibiting Oxidative Stress // *Molecules*. – 2021. – V. 26, No 21. – 6336 p.
124. Lin C.F., Kuo Y.T., Chen T.Y., Chien C.T. Quercetin-Rich Guava (*Psidium guajava*) Juice in Combination with Trehalose Reduces Autophagy, Apoptosis and Pyroptosis Formation in the Kidney and Pancreas of Type II Diabetic Rats // *Molecules*. – 2016. – V. 21, No 3. – 334 p.
125. Liu Y., Wen P.H., Zhang H.H., Dai Y., He Q. Breviscapine ameliorates CCl₄-induced liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and ROS generation // *Int J Mol Med*. – 2018. – V. 42, No 2. – P. 755-768.
126. Lu M., Daret K. Regulation of Superoxide Dismutase Genes: Implications in Diseases // *Free Radic Biol Med*. – 2009. – V. 47, No 4. – P. 344-356.
127. Luedde T., Kaplowitz N., Schwabe R.F. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance // *Gastroenterology*. – 2014. – V. 174, No 4. – P. 765-783.
128. Ma J.Q., Ding J., Zhang L., Liu C.M. Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄ induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway // *Food Chem Toxicol*. – 2014. – V. 64. – P. 41-48.
129. Magna M., Pisetsky D.S. The Role of Cell Death in the Pathogenesis of SLE: Is Pyroptosis the Missing Link? // *Scand J Immunol*. – 2015. – V. 82, No 3. – P. 218-224.
130. Malhi H., Guicciardi M.E., Gores G.J. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger // *Physiological Reviews*. – 2010. – V. 90, No 3. – P. 1165-1194.
131. Mandel H.G., Manson M.M., Judah D.J., Simpson J.L., Green J.A., Forrester L.M., Wolf C.R., Neal G.E. Metabolic basis for the protective effect of the

- antioxidant ethoxyquin on aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in the rat // *Cancer Res.* – 1987. – V. 47, No 19. – P.5218-5223.
132. Marinkovic D., Zhang X., Yalcin S., Luciano J.P., Brugnara C., Huber T., Ghaffari S. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis // *J Clin. Invest.* – 2017. – V. 117, No 8. – P. 2133 – 2144.
133. Marino J.H., Cook P., Miller K.S. Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and realtime RT-PCR // *J Immunol Methods.* – 2003. – V. 283, No 2. – P. 291-306.
134. Martins R., Lithgow G.J., Link W. Long live FOXO: unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity // *Aging Cell.* – 2016. – V.15, No 2. – P.196 –207.
135. Mates J. M., Perez-Gomez C., Castro I.N. Antioxidant enzymes and human diseases // *Clin Biochem.* – 1999. – V. 32, No 8. – P. 595-603.
136. Matveev A.V., Konjaeva E.I. The use of silymarin in patients with toxic and viral liver diseases // *Eksp Klin Gastroenterol.* – 2011. – No 11. – P. 84-90.
137. Medvedeva L.V., Popova T.N., Artyukhov V.G., Matasova L.V., de Carvalho M.A.A.P. Intensity of free radical processes and regulation of cytoplasmic nadp-isocitrate dehydrogenase in rat cardiomyocytes under normal and ischemic conditions // *Biokhimiya.* –2002. – V. 67, No 6. – P. 838-849.
138. Meyer S.A. Overview of hepatotoxicity // *Curr Protoc Toxicol.* – 2001. – Chapter 14: Unit 14.1.
139. Miao E.A., Leaf I.A., Treuting P.M., Mao D.P., Dors M., Sarkar A., Warren S.E., Wewers M.D., Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria // *Nat Immunol.* – 2010. – V. 11, No 12. – P. 1136-1142.
140. Miao W., Hu L., Kandouz M., Hamilton D., Batist G. A cell-based system to identify and characterize the molecular mechanism of drug-metabolizing enzyme (DME) modulators // *Biochem Pharmacol.* – 2004. – V. 67. – P. 1897-1905.

141. Michalopoulos G.K., DeFrances M. Liver regeneration // *Adv Biochem Eng Biotechnol.* – 2005. – V. 93. – P. 101-134.
142. Miyauchi T., Uchida Y., Kadono K., Hirao H., Kawasoe J., Watanabe T., Ueda S., Okajima H., Terajima H., Uemoto S. Up-regulation of FOXO1 and reduced inflammation by β -hydroxybutyric acid are essential diet restriction benefits against liver injury // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019. – V. 116, №27. – P. 13533-13542.
143. Morelli M.B., Gambardella J., Castellanos V., Trimarco V. Vitamin C and Cardiovascular Disease: An Update // *J Microencapsul.* – 2018. – V. 35, No 3. – P. 1039-1052.
144. Mortezaee K., Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review // *J Cell Physiol.* – 2018. – V.233. – P. 4015-4032.
145. Mueller M., Castro R.E., Thorell A., Marschall H.U., Auer N., Herac M., Rodrigues C.M.P., Trauner M. Ursodeoxycholic acid: Effects on hepatic unfolded protein response, apoptosis and oxidative stress in morbidly obese patients // *Liver Int.* – 2018. – V. 38, No 3. – P. 523-531.
146. Muriel P., Rivera-Espinoza Y. Beneficial drugs for liver diseases // *J Appl Toxicol.* – 2008. – V. 28. – P. 93-103.
147. Musiol R., Serda M., Hensel-Bielowka S., Polanski J. Quinoline-based antifungals / R. Musiol [et al.] // *Curr Med Chem.* – 2010. – V. 17, No 18. – P. 1960-1973.
148. Natelson S. Response of citric acid levels to oral administration of glucose // *J Clin Invest.* – 1948. – V.27, No 4. – P. 446-449.
149. Navarro V.J., Barnhart H., Bonkovsky H.L., Davern T., Fontana R.J., Grant L., Reddy K.R., Seeff L.B., Serrano J., Sherker A.H., Stolz A., Talwalkar J., Vega M., Vuppalanchi R. Liver injury from herbals and dietary supplements in the U.S. Drug-Induced Liver Injury Network // *Hepatology.* – 2014. – V. 60, No 4. – P. 1399-1408.

150. Niedernhofer L.J., Daniels J.S., Rouzer C.A., Greene R.E., Marnett L.J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278, No 33. – P. 31426-31433.
151. Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276, No 42. – P. 38388-38393.
152. Otero-Albiol, D., Carnero A. Cellular senescence or stemness: hypoxia flips the coin // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2021. – V. 40, No 1. – 243 p.
153. Petrasek J., Iracheta-Vellve A., Csak T., Satishchandran A., Kodys K., Kurt-Jones E.A., Fitzgerald K.A., Szabo G. STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. – V. 110. – P. 16544-16549.
154. Ponugoti B., Xu F., Zhang C., Tian C., Pacios S., Graves D.T. FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF- β 1 and prevention of oxidative stress // *J Cell Biol.* – 2013. – V. 203, No 2. – P. 327-343.
155. Popov S.S., Shulgin K.K., Popova T.N., Agarkov A.A., Pashkov A.N., de Carvalho M.A.A.P. Effect of melatonin-aided therapy on the glutathione antioxidant system activity and liver protection // *J Biochem Mol Toxicol.* – 2015. – V. 29, No 10. – P. 449-457.
156. Postnikoff S.D., Malo M.E., Wong B., Harkness T.A. The yeast forkhead transcription factors fkh1 and fkh2 regulate lifespan and stress response together with the anaphase-promoting complex // *PLoS Genet.* – 2012. – V.8, No 3:e1002583.
157. Ramana K.V., Srivastava S., Singhal S.S. Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016 // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – V. 2017, No 2017: 2163285.
158. Raschi E., De Ponti F. Drug-induced liver injury: Towards early prediction and risk stratification // *World J Hepatol.* – 2017. – V. 9, No 1. – P. 30-37.

159. Raschi E., De Ponti F. Drug-induced liver injury: Towards early prediction and risk stratification // *World J Hepatol.* – 2017. – V. 9. – P. 30-37.
160. Raschi E., Ponti F. Drug- and herb-induced liver injury: Progress, current challenges and emerging signals of post-marketing risk // *World J Hepatol.* – 2015. – V. 7, No 13. – P. 1761-1771.
161. Rehm J., Samokhvalov A.V., Shield K.D. Global burden of alcoholic liver diseases // *J Hepatol.* – 2013. – V. 59, No 1. – P. 160-168.
162. Reitman S., Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases // *Amer J clin Path.* – 1957. – V. 28, No 1. – P. 56-63.
163. Reyes J.L., Hernandez M.E., Melendez E., Gomez-Lojero C. Inhibitory effect of the antioxidant ethoxyquin on electron transport in the mitochondrial respiratory chain // *Biochem Pharmacol.* – 1995. – V. 49. – P. 283-289.
164. Rojo A.I., Salinas M., Martin D., Perona R., Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB // *Neurosci.* – 2008. – V. 24, No 33. – P. 324-334.
165. Rotimi S.O., Rotimi O.A., Adelani I.B., Onuzulu C., Obi P., Okungbaye R. Stevioside modulates oxidative damage in the liver and kidney of high fat/low streptozocin diabetic rats // *Heliyon.* – 2018. – V. 4, No 5: e00640.
166. Rouzer C.A., Marnett L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights // *Enzymology.* – 2009. – V. 90. – P. 29-34.
167. Sacks D., Baxter B., Campbell B.C.V., Carpenter J.S., Cognard C., Dippel D., Eesa M., Fischer U., Hausegger K., Hirsch J.A., Shazam Hussain M., Jansen O., Jayaraman M.V., Khalessi A.A., Kluck B.W., Lavine S., Meyers P.M., Ramee S., Rufenacht D.A., Schirmer C.M., Vorwerk D. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke // *Int J Stroke.* – 2018. – V.13, No 6. – P. 612-632.

168. Sánchez A., Espinosa P., Garcia T., Mancilla R. The 19 kDa Mycobacterium tuberculosis Lipoprotein (LpqH) Induces Macrophage Apoptosis through Extrinsic and Intrinsic Pathways: A Role for the Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor // *Clin Dev Immunol.* – 2012. – V. 2012, No 2012: 950503.
169. Sborgi L., Ruhl S., Mulvihill E., Pipercevic J., Heilig R., Stahlberg H., Farady C.J., Muller D.J., Broz P., Hiller S. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death // *EMBO J.* – 2016. – V. 35, No 16. – P. 1766-1778.
170. Schenk A., Ghallab A., Hofmann U., Hassan R., Schwarz M., Schuppert A., Schwen L.O., Braeuning A., Teutonico D., Hengstler J.G., Kuepfer L. Physiologically-based modelling in mice suggests an aggravated loss of clearance capacity after toxic liver damage // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, No 1. – P. 224-228.
171. Sevrioukova I. F. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation // *Antioxid Redox Signal.* – 2011. – V. 14, No 12. – P. 2545-2579.
172. Shen Y., White E. p53-dependent apoptosis pathways // *Adv Cancer Res.* – 2001. – V. 82. – P. 55-84.
173. Shikhaliev Kh.S., Kasaikina O.T., Shmyreva Zh.V. Sulfuration of 2,2,4-trimethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines // *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR.* – 1983. – № 10. – P. 2214 -2218.
174. Shin S.W., Kil I.S., Park J.W. Silencing of mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances heat shock-induced apoptosis // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – V. 366, No 4. – P. 1012 – 1028.
175. Silvennoinen O., Saharinen P., Pauku K., Takaluoma K., Kovanen P. Cytokine receptor signal transduction through Jak tyrosine kinases and Stat transcription factors // *APMIS.* – 1997. – V. 105, No 7. – P. 497-509.

176. St Clair D.K., Porntadavity S., Xu Y., Kiningham K. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene // *Methods Enzymol.* – 2002. – V. 349. – P. 306-312.
177. Stanton R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival // *IUBMB Life.* – 2012. – V. 64, No 5. – P. 362-369.
178. Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling // *Ann NY Acad Sci.* – 2008. – V. 1147. – P. 37-52.
179. Stoeckelhuber M., Scherer M., Bracher F., Peschel O., Leibold E., Scherer G., Pluym N. Development of a human biomonitoring method for assessing the exposure to ethoxyquin in the general population // *Arch Toxicol.* – 2020. – V. 94. – P. 4209-4217.
180. Taherkhani S., Valaei K., Arazi H., Suzuki K. An Overview of Physical Exercise and Antioxidant Supplementation Influences on Skeletal Muscle Oxidative Stress // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – V. 10, No 10. – 1528 p.
181. Tan M.S., Tan L., Jiang T., Zhu X.C., Wang H.F., Jia C.D., Yu J.T. Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease // *Cell Death. Dis.* – 2014. – V. 5, No 8. – 1382 p.
182. Tereshchenko O.G., Nikolskaya E.D., Zhunina O.A. Formulation of perspective hepatoprotector polymeric forms based on silybin and ursodeoxycholic acid // *Russian Chemical Bulletin.* – 2018. – V. 67, No 12. – P. 2290-2296.
183. Thiele G.M., Duryee M.J., Willis M.S., Sorrell M.F., Freeman T.L., Tuma D.J., Klassen L.W. Malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) modified proteins induce pro-inflammatory and pro-fibrotic responses by liver endothelial cells // *Comp Hepatol.* – 2004. – Suppl.1: S25.
184. Thomas C., Wurzer L., Malle E., Ristow M., Madreiter-Sokolowski C.T. Modulation of Reactive Oxygen Species Homeostasis as a Pleiotropic Effect of Commonly Used Drugs // *Front Aging.* – 2022. – № 3:905261.

185. Tian R.D., Chen Y.Q., He Y.H., Tang Y.J., Chen G.M., Yang F.W., Li Y., Huang W.G., Chen H., Liu X., Lin S.D. Phosphorylation of eIF2 α mitigates endoplasmic reticulum stress and hepatocyte necroptosis in acute liver injury // *AMH*. – 2020. – V. 19, No 1. – P. 79 – 87.
186. Tian Z., Chen Y., Gao B. Natural killer cells in liver disease // *Hepatology*. – 2013. – V. 57, No 4. – P. 1654-1652.
187. Tong W.H., Rouault T.A. Metabolic regulation of citrate and iron by aconitases: role of iron-sulfur cluster biogenesis // *Biometals*. – 2007. – V. 20, No 3-4. – P. 549-564.
188. Trifunovic A., Hansson A., Wredenberg A., Rovio A.T., Dufour E., Khvorostov I., Spelbrink J.N., Wibom R., Jacobs H.T., Larsson N.G. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – V. 102, No 50. – P. 17993-17998.
189. Udut V.V., Vengerovsky A.I., Dygai A.M. Effects of phospholipid hepatoprotectors on apoptosis during experimental liver pathology induced by isoniazid and paracetamol // *Bull Exp Biol Med*. – 2013. – V. 154, No 5. – P. 614-617.
190. Ulicna O., Greksak M., Vancova O., Zlatos L., Galbavy S., Bozek P., Nakano M. Hepatoprotective effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on CCl₄-induced liver damage in rats // *Physiol Res*. – 2003. – V. 52. – P. 461-466.
191. Venditti P., Di Stefano L., Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species // *Mitochondrion*. – 2013. – V. 12, No 2. – P. 71-82.
192. Waldeck-Weiermair M., Yadav S., Spyropoulos F., Kruger C., Pandey A.K., Michel T. Dissecting in vivo and in vitro redox responses using chemogenetics // *Free Radic Biol Med*. – 2021. – V. 177. – P. 360-369.
193. Wang B., Tontonoz P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease // *Annu Rev Physiol*. – 2019. – V. 81. – P. 165-188.

194. Wang M., Lee R.J., Bi Y., Li L., Yan G., Lu J., Meng Q., Teng L., Xie J. Transferrin-conjugated liposomes loaded with novel dihydroquinoline derivatives as potential anticancer agents // PLoS One. – 2017. – V. 12, No 10: e0186821.
195. Wang Q., Wei S., Zhou S., Qiu J., Shi C., Liu R., Zhou H., Lu L. Hyperglycemia aggravates acute liver injury by promoting liver-resident macrophage NLRP3 inflammasome activation via the inhibition of AMPK/mTOR-mediated autophagy induction // Immunol Cell Biol. – 2020. – V. 98, No 1. – 54-66 p.
196. Wang R., Tang R., Li B., Ma X., Schnabl B., Tilg H. Gut microbiome, liver immunology, and liver diseases // Cell Mol Immunol. – 2021. – V. 18. – P. 4 - 17.
197. Wang W.Y., Tan M.S., Yu J.T., Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease // Ann Transl Med. – 2015. – V. 3, No 10: 136.
198. Wang Z., Xu G., Zhan X., Liu Y., Gao Y., Chen N., Guo Y., Li R., He S., Song T.X., Niu M., Wang J., Bai Z., Xiao X. Carbamazepine promotes specific stimuli-induced NLRP3 inflammasome activation and causes idiosyncratic liver injury in mice // Archives of Toxicology. – 2019. – V. 93. – P. 3585-3599.
199. Wei H.Y., Ma X. Tamoxifen reduces infiltration of inflammatory cells, apoptosis and inhibits IKK/NF- κ B pathway after spinal cord injury in rats // Neurological Sciences. – 2014. – V. 35. – P. 1763-1768.
200. Weismann D., Hartvigsen K., Lauer N., Bennett K.L., Scholl H.P., Issa P.H., Cano M., Brandstätter H., Tsimikas T., Skerka C., Superti-Furga G., Handa J.T., Zipfel P.T., Witztum J.L., Binder C.J. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress // Nature. – 2011. – V. 478, No 7367. – P. 76-81.

201. Wenjun C., Mingjin Z. Drug-induced hepatotoxicity linked to zoledronic acid in the treatment of an elderly man with primary osteoporosis // *Int J Clin Pharmacol Ther.* –2021. – V. 59, No 11. – P. 721–724.
202. Wu J., Lin S., Wan B., Velani B., Zhu Y. Pyroptosis in Liver Disease: New Insights into Disease Mechanisms // *Aging Dis.* – 2019. – V. 10, No 5. – P. 1094-1108.
203. Xu G., Han X., Yuan G., An L., Du P. Screening for the protective effect target of deproteinized extract of calf blood and its mechanisms in mice with CCl₄-induced acute liver injury // *PLoS On.* – 2017. – V. 12, No 7: e0180899.
204. Yamazaki Y., Takao T. Correlation of the distribution of antioxidant enzyme concentrations in blood serum and heart tissue in rats // *Anal Chem.* – 2008. – V. 80, No 21. – P. 8246-8252.
205. Yang C., Li L., Ma Z., Zhong Y., Pang W., Xiong M., Fang S., Li Y. Hepatoprotective effect of methyl ferulic acid against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats // *Exp The. Med.* – 2018. – V. 15, No 3. – P. 2228-2238.
206. Yang C.Y., Hung Y.L., Tang K.W., Wang S.C., Tseng C.H., Tzeng C.C., Liu P.L., Li C.Y., Chen Y.L. Discovery of 2-substituted 3-arylquinoline derivatives as potential anti-inflammatory agents through inhibition of LPS-induced inflammatory responses in macrophages // *Molecules.* – 2019. – V. 24, No 6. – P. 114-120.
207. Yang Y., Yang L., Han Y., Wu Z., Chen P., Zhang H., Zhou J. Protective effects of hepatocyte-specific glycyrrhetic derivatives against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice // *Bioorg Chem.* – 2017. – V. 72, No 4. – P. 42-50.
208. Yu P., Zhang X., Liu N., Tang L., Peng C., Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – V. 6, No 1:128.

209. Yu Y., Cai J., She Z., Li H. Insights into the Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutics of Nonalcoholic Fatty Liver Diseases. // *Adv Sci (Weinh)*. – 2019. – V. 6: 1801585.
210. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. Jr. Statistical analysis of real-time PCR data // *BMC Bioinformatics*. – 2006. – V. 22, No 7. – 85 p.
211. Zhan J., Qin W., Zhang Y., Jiang J., Ma H., Li Q., Luo Y. Upregulation of neuronal zinc finger protein A20 expression is required for electroacupuncture to attenuate the cerebral inflammatory injury mediated by the nuclear factor- κ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats // *J Neuroinflammation*. – 2016. – V. 13, No 1. – 258 p.
212. Zhang L., Cao R., Li D., Sun Y., Zhang J., Wang X., Khan A., Liu Z., Niu B., Xu J., Xie J. Ethionine-mediated reduction of S-adenosylmethionine is responsible for the neural tube defects in the developing mouse embryo-mediated m6A modification and is involved in neural tube defects via modulating Wnt/ β -catenin signaling pathway // *Epigenetics Chromatin*. – 2021. – V. 14, No 1. – 52 p.
213. Zhang P., Wang W., Mao M., Gao R., Shi W., Li D., Calderone R., Sui B., Tian X., Meng X. Similarities and Differences: A Comparative Review of the Molecular Mechanisms and Effectors of NAFLD and AFLD // *Front Physiol Sec Gastrointestinal Sciences*. – 2021. – V. 12:710285.
214. Zheng Q., Ren Y., Reinach P.S., She Y., Xiao B., Hua S., Qu J., Chen W. Reactive oxygen species activated NLRP3 inflammasomes prime environment-induced murine dry eye // *Exp Eye Res*. – 2014. – V. 125. – P. 1-8.
215. Zhu M., Wang J., Xie J., Chen L., Wei X., Jiang X., Bao M., Qiu Y., Chen Q., Li W., Jiang C., Zhou X., Jiang L., Qiu P., Wu D. Design, synthesis, and evaluation of chalcone analogues incorporate α , β -Unsaturated ketone functionality as anti-lung cancer agents via evoking ROS to induce pyroptosis // *Eur J Med Chem*. – 2018. – V. 157. – P. 1395-1405.

216. Zuccarello E., Acquarone E., Calcagno E., Argyrousi E.K., Deng S.X., Landry D.W., Arancio O., Fiorito J. Development of novel phosphodiesterase 5 inhibitors for the therapy of Alzheimer's disease // *Biochem Pharmacol.* – 2020. – V. 176: 113818.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1. Состав корма для лабораторных животных. Корм для лабораторных животных, полнорационный. Состав: ячмень, овёс, отруби пшеничные, мука мясокостная, соль поваренная, известняковая мука.

Показатели качества	
Наименование	Содержание, %
Сырой протеин	14,71
Сырой жир	4,74
Сырая клетчатка	9,42
Лизин	0,53
Метионин+цистин	0,39
Треонин	0,37
Триптофан	0,19
Кальций	0,87
Фосфор	0,94
Фосфор усвояемый	0,39
Натрий	0,25
Хлорид натрия	0,62

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

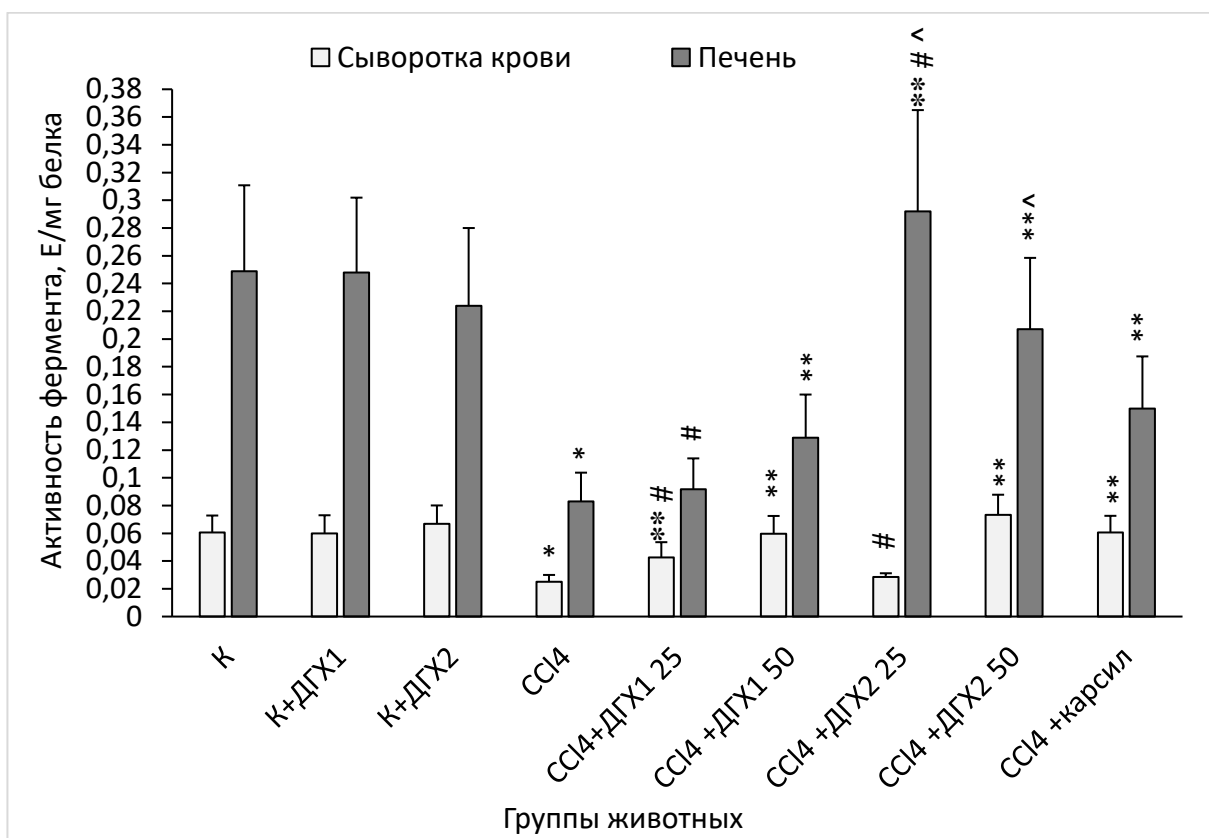


Рисунок 1. Удельная активность аконитатгидратазы в сыворотке крови и печени крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-

триметил-1,2-дигидрохинолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

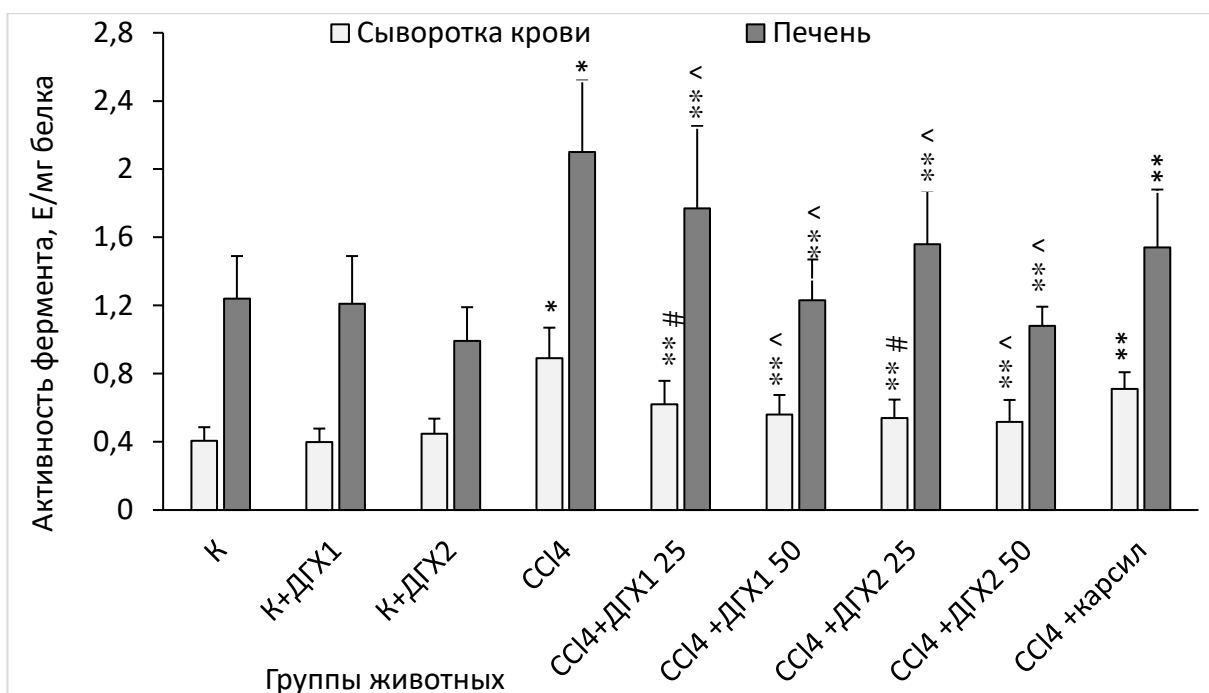


Рисунок 2. Удельная активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС1₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС1₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС1₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС1₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС1₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС1₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

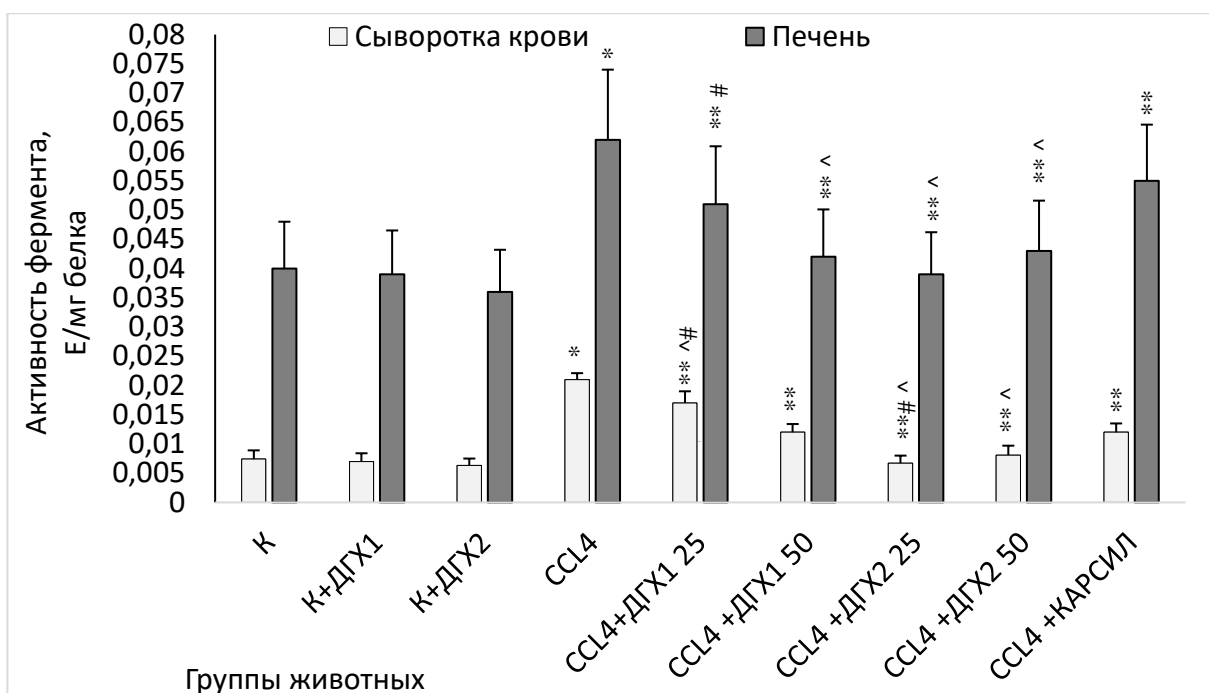


Рисунок 3. Удельная активность каталазы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

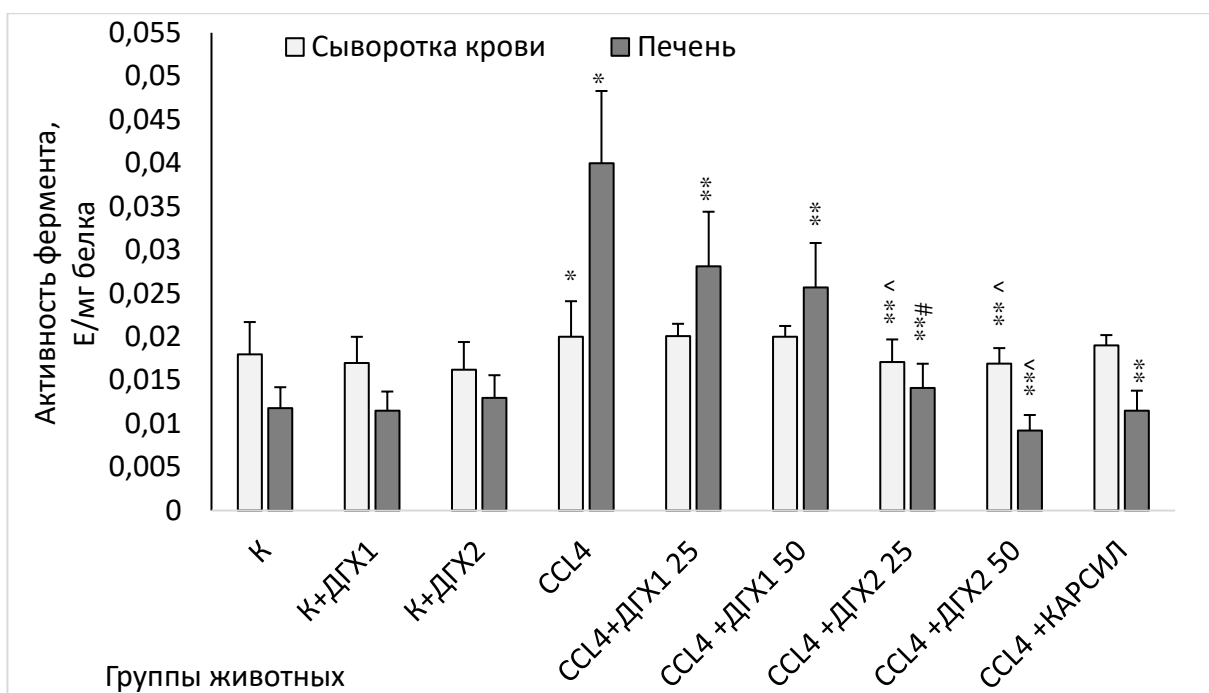


Рисунок 4. Удельная активность глутатионпероксидазы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлолметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлолметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

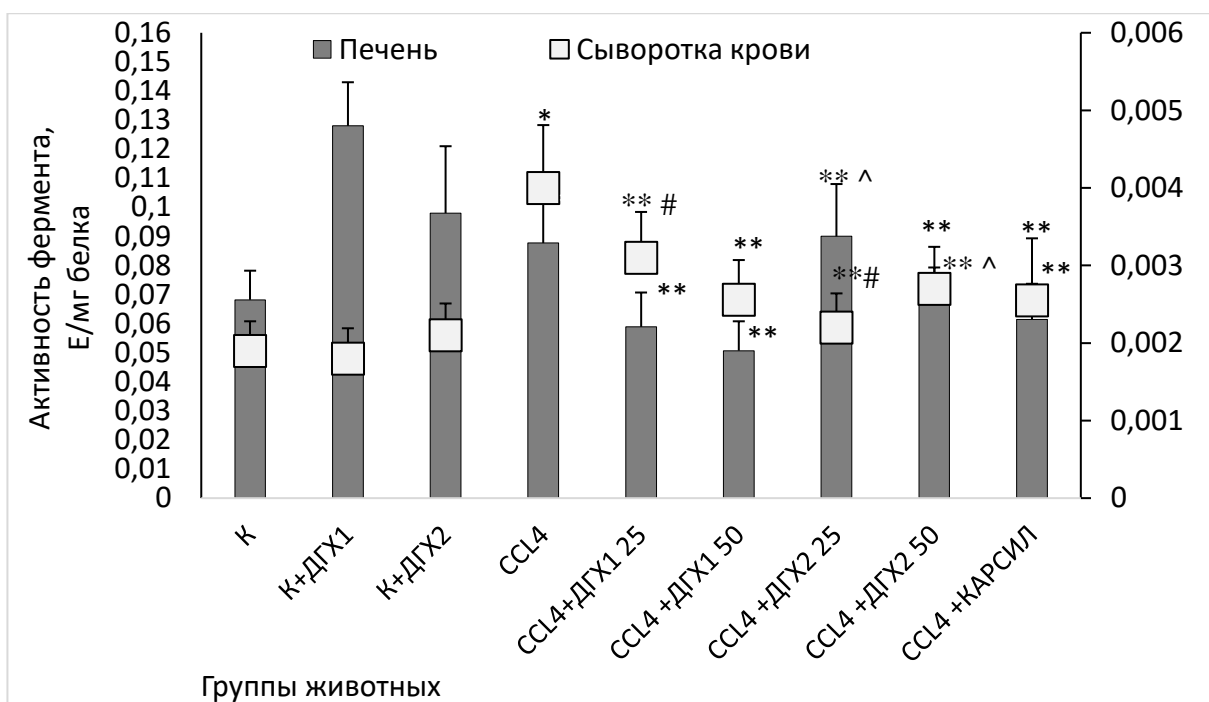


Рисунок 5. Удельная активность глутатионредуктазы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

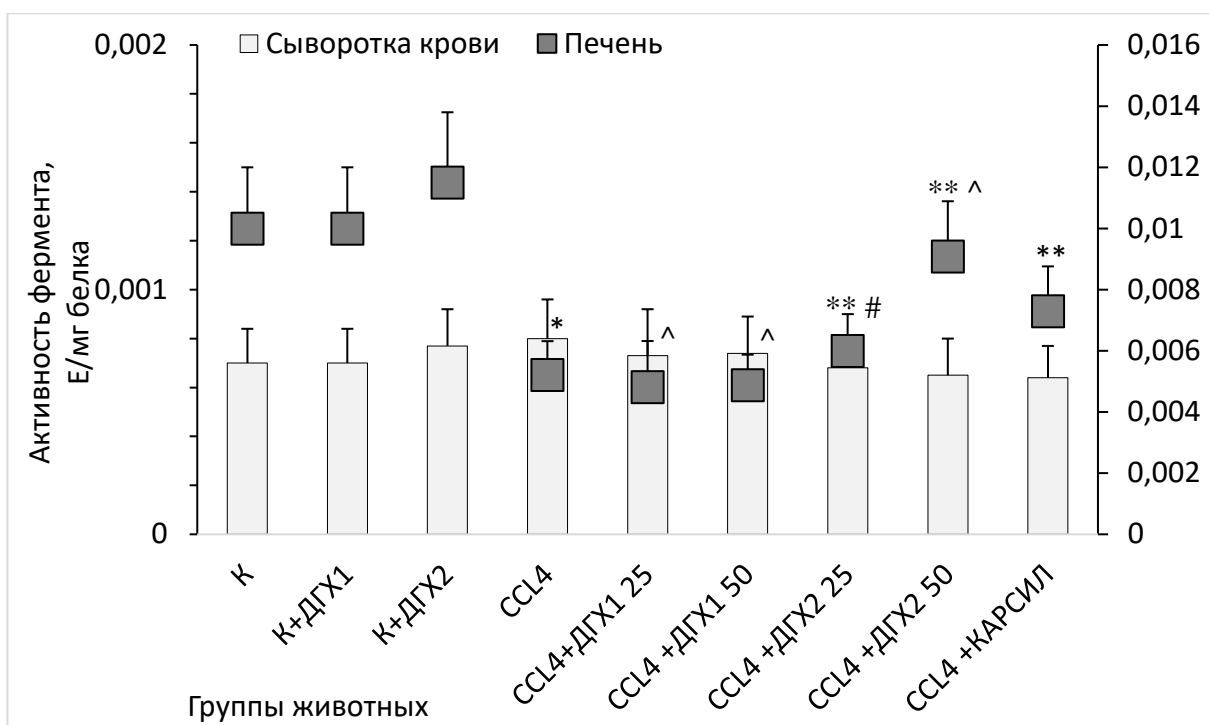


Рисунок 6. Удельная активность глутатионтрансферазы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССL₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССL₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССL₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССL₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССL₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССL₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

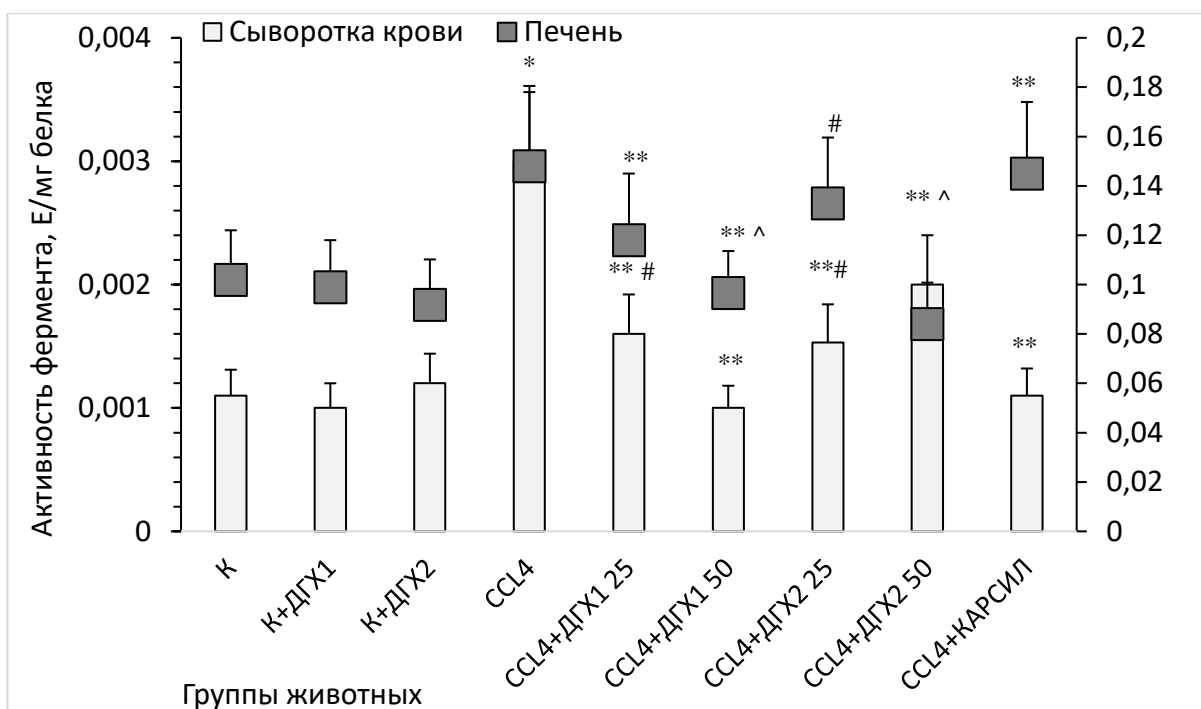


Рисунок 7. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (СС14), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (СС14+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (СС14+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (СС14+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.

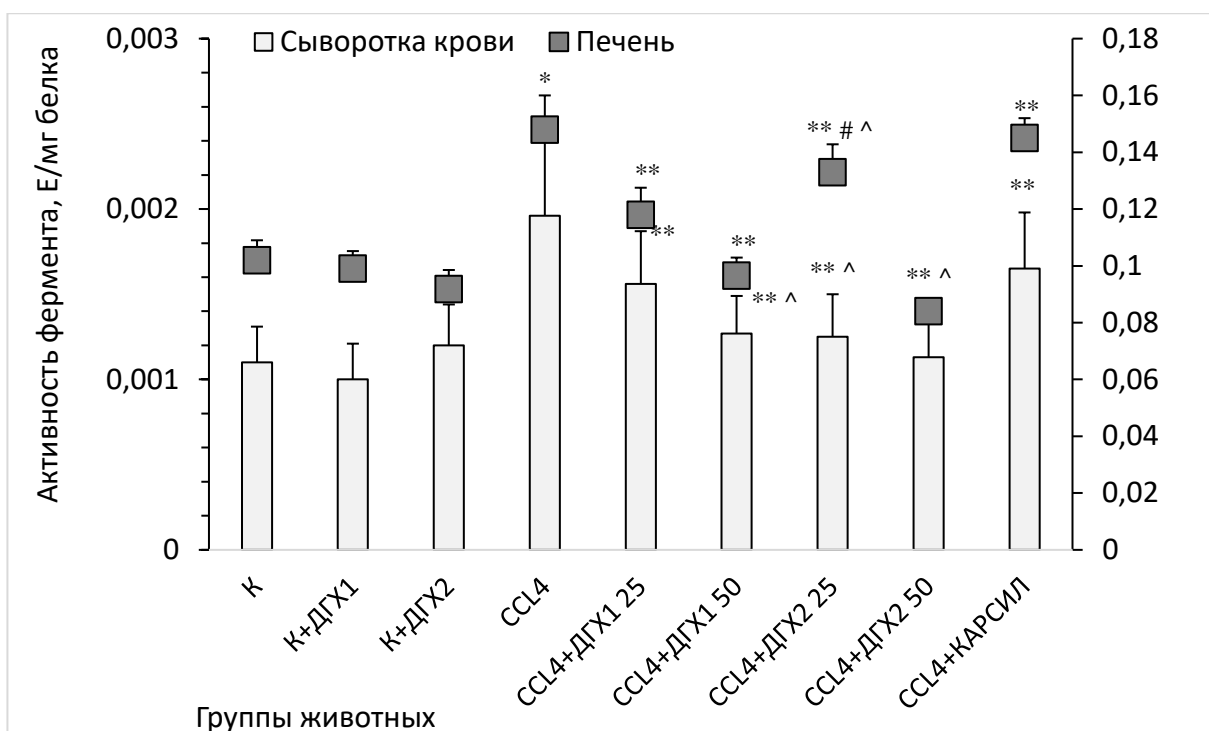


Рисунок 8. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в сыворотке крови (А) и печени (Б) крыс крыс контрольной группы (К), животных с тетрахлорметановым поражением печени (ССl₄), крыс с патологией, получавших 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ1 50), животных с патологией, получавших 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолин в дозе 25 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 25) и 50 мг/кг (ССl₄+ДГХ2 50), крыс с повреждением печени, которым вводили карсил в дозе 50 мг/кг (ССl₄+карсил), а также контрольных животных, подверженных введению в дозе 50 мг/кг 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ1) и 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина (К+ДГХ2).

* - отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$; ** - отличия от группы животных с патологией достоверны, $p < 0,05$; # - отличия в группах животных, получавших на фоне патологии разные дозы 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина или 1-бензоил-6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохиолина достоверны, $p < 0,05$; ^ - отличия от группы крыс с тетрахлорметановым повреждением печени, которым вводили карсил, достоверны, $p < 0,05$.