

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения РФ

На правах рукописи

**ПОПОВ**

**Сергей Сергеевич**

**ОЦЕНКА И КОРРЕКЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА И  
АПОПТОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ С ДИФФУЗНЫМИ  
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПЕЧЕНИ**

14.01.04 – внутренние болезни

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Пашков Александр Николаевич

Воронеж 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ	
Список сокращений	6
Введение	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Общая характеристика и механизмы развития диффузных заболеваний печени	18
1.2 Алкогольная болезнь печени патогенез, клиническая картина, диагностика	20
1.3. Лекарственный гепатит, патогенез, клиническая картина, диагностика	28
1.4. Патогенез, клиническая картина и диагностика при неалкогольном стеатогепатите	32
1.5. Свободнорадикальное окисление в норме и при патологии	35
1.6. Антиоксидантная система организма	41
1.7. Роль свободнорадикального окисления в развитии диффузных заболеваний печени	49
1.8. Роль апоптоза в развитии патологических процессов	52
1.9. Антиоксидантные препараты, применяемые при диффузных заболеваниях печени	65
1.10. Мелатонин: функции и свойства	68
1.10.1. Антиоксидантная активность мелатонина	70
1.10.2. Перспективы применения мелатонина в клинической практике	72

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	78
<b>2.1. Материалы и методы исследований</b>	<b>78</b>
<b>2.1.1. Материалы и объекты исследования</b>	<b>78</b>
2.1.1.1. Характеристика используемых препаратов	79
2.1.1.1.1. Характеристика препарата «Эпифамин»	79
2.1.1.1.2. Характеристика препарата «Мелаксен»	79
2.1.1.1.3. Характеристика выборки больных с алкогольным гепатитом	80
2.1.1.1.4. Характеристика выборки больных с неалкогольным стеатогепатитом	81
2.1.1.1.5. Характеристика выборки больных с лекарственным поражением печени	83
2.1.1.1.6. Характеристика контрольной группы	84
2.1.1.1.7. Критерии оценки эффективности лечения	85
<b>2.1.2. Методы исследования</b>	<b>86</b>
2.1.2.1. Клинические и инструментальные методы	86
2.1.2.2. Биохимические методы исследования	87
2.1.2.3. Определение содержания б-сульфатоксимелатонина	89
<b>2.1.2.4. Оценка интенсивности свободнорадикальных процессов</b>	<b>90</b>
2.1.2.4.1. Определение параметров биохемилюминесценции	90
2.1.2.4.2. Определение содержания диеновых конъюгатов	92

2.1.2.4.3. Определение активности аконитатгидратазы	93
<b>2.1.2.5. Определение активности антиоксидантной системы</b>	<b>94</b>
2.1.2.5.1. Определение активности ферментативного звена антиоксидантной системы	94
2.1.2.5.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы	94
2.1.2.5.1.2. Определение активности глутатионредуктазы	95
2.1.2.5.1.3. Определение активности глутатион-S-трансферазы	95
2.1.2.5.1.4. Определение активности НАДФ – специфичной изоцитратдегидрогеназы	96
2.1.2.5.1.5. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	96
2.1.2.5.1.6. Определение активности каталазы	96
2.1.2.5.1.7. Определение активности супероксиддисмутазы	97
2.1.2.5.2. Определение активности неферментативного звена антиоксидантной системы	98
2.1.2.5.2.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона	98
2.1.2.5.2.2. Определение содержания цитрата	99
2.1.2.5.2.3. Определение содержания $\alpha$ -токоферола	100
<b>2.1.2.6. Определение интенсивности апоптотических процессов</b>	<b>101</b>
2.1.2.6.1. Исследование степени фрагментации ДНК	101
2.1.2.6.2. Определение активности каспаз	103
2.1.2.7. Унифицированный метод определения содержания общего	104

белка по биуретовой реакции	
2.1.2.8. Статистическая обработка данных	106
ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ И АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БОЛЬНЫХ С АЛКОГОЛЬНЫМ ГЕПАТИТОМ	109
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛИНИЧЕСКУЮ КАРТИНУ, СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БОЛЬНЫХ С НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ	185
ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛИНИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ, АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БОЛЬНЫХ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ГЕПАТИТОМ	272
Заключение	354
Выводы	383
Практические рекомендации	387
Список литературы	388

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ –алкогольный стеатогепатит

АДГ – алкогольдегидрогеназа

АкГ – аконитатгидратаза

АлАт – аланинаминотрансфераза

АОЗ – антиоксидантная защита

АОС – антиоксидантная система

АсАт – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

БХЛ – биохемилюминесценция

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГГТП – гамма – глутамилтранспептидаза

ГП – глутатионпероксидаза

ГР – глутатионредуктаза

ДЗП – диффузные заболевания печени

ДК – диеновые конъюгаты

ЛГ – лекарственный гепатит

ЛПВП – липопротеиды высокой плотности

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

КоА – кофермент А

НАДФ-ИДГ – НАДФ-изоцитратдегидрогеназа

НАСГ – неалкогольный стеатогепатит

ОХ – общий холестерин

ПОЛ – пероксидное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

СО – свободнорадикальное окисление

СР – свободные радикалы

6- СМ –6-сульфатоксимелатонин (6-гидроксимелатонинсульфат)

ХЭ – холинэстераза

ЩФ – щелочная фосфатаза

АТР (АТФ) – аденозинтрифосфат

GSH – глутатион восстановленный

GSSG – глутатион окисленный

NAD (НАД)– никотинамидадениндинуклеотид

NADP (НАДФ) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

NADH(НАДН) – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

NADPH (НАДФН) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** В последнее время в сфере изучения заболеваний внутренних органов, происходят значительные изменения, сопряженные с расширением представлений об этиологии и патогенетических основах нарушений функции печени [32; 40; 148]. Разработка новых подходов восстановительно-корректирующей терапии, диагностики и прогноза течения диффузных заболеваний печени (ДЗП) относится к приоритетным направлениям развития современной медицины, что обусловлено их широким распространением, ростом заболеваемости среди лиц трудоспособного возраста, негативными последствиями, включая частую трансформацию в цирроз печени. Заболеваниями печени страдает 15-30% людей, но это та часть, которая обращается за медицинской помощью. Этиология токсического гепатита может быть связана с хроническим и чрезмерным употреблением алкоголя, приемом лекарственных препаратов, нарушениями липидного и углеводного обмена и другими факторами. В настоящее время значимой медико-социальной проблемой является алкогольный гепатит (АГ), развивающийся в 12-20 % случаев хронического алкоголизма, которым страдает в России, согласно имеющимся данным около 10 млн. человек [100]. Известно, что около 90% принимаемого алкоголя метаболизируется в печени с образованием ацетальдегида, который обладает гепатотоксическим действием, проявляющимся в результате усиления процессов пероксидного окисления липидов (ПОЛ), нарушения структурно-функционального состояния белков, нуклеиновых кислот, повреждения клеточных мембран [108]. Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) характеризуется воспалительными изменениями, индуцируемыми повышенным поступлением свободных жирных кислот в печень, вызывающим дисфункцию гепатоцитов с развитием жировой дистрофии. Гипергликемия и гиперлипидемия относятся к основным факторам развития НАСГ [96]. Повышенное образование свободных жирных кислот происходит при сахарном диабете 2 типа (СД2), которым



согласно данным Международной диабетической федерации в мире страдает свыше 170 млн. человек. Ожирение, часто сопутствующее СД2, в 20—47% случаев связано с развитием НАСГ [57]. В России НАСГ страдают примерно 27% взрослого населения [148]. Одной из важнейших проблем здравоохранения является также лекарственный гепатит (ЛГ). С применением фармпрепаратов связано возникновение до 25% случаев токсического гепатита [37;185]. У пациентов, находящихся на противотуберкулезной полихимиотерапии, часто отмечается лекарственное поражение печени (до 67% случаев), что связано с образованием гепатотоксинов, оказывающих прямое повреждающее действие на клетки печени [54; 501].

Значительные успехи достигнуты в плане разработки подходов к лечению алкогольных и неалкогольных стеатогепатитов [41, 56, 97, 166], применению эффективных методов этиотропной терапии, что позволяет существенно облегчить течение болезни и улучшить качество жизни пациентов [42, 148, 196, 221]. Вместе с тем, многие вопросы патогенеза, диагностики и лечения диффузных поражений печени требуют дальнейших исследований, в особенности их молекулярных основ, а также действия соединений способных оказывать выраженный гепатопротекторный эффект.

Следует подчеркнуть, что с развитием современных представлений об окислительном стрессе, возникающем в результате дисбаланса между чрезмерным усилением свободнорадикальных процессов и недостаточной функциональной активностью антиоксидантной системой (АОС) организма, как об универсальном патогенетическом механизме повреждения клеток и тканей связано формирование новых подходов в диагностике и лечении ряда заболеваний. Постоянный уровень свободнорадикального окисления (СО) поддерживается за счет согласованной системы антиоксидантной защиты, включающей ферментативное и неферментативное звенья и осуществляющей главным образом контроль за содержанием активных форм кислорода (АФК) и связыванием ионов  $Fe^{2+}$ . Однако при усилении СО и/или ослаблении АОС может

развиваться окислительный стресс, ведущий к повреждению клеточных структур, нарушению метаболизма и жизнедеятельности клеток и их апоптотической гибели. Коррекция дисбаланса прооксидантно-антиоксидантного равновесия при патологии может быть достигнута с помощью антиоксидантной терапии.

В настоящее время представляют особый интерес средства антиоксидантной защиты (АОЗ), основой которых служат естественные метаболиты клеток. В этой связи актуальным является исследование действия препаратов, способных осуществлять коррекцию в организме уровня мелатонина – нейrogормона, продуцируемого эпифизом, а также экстрапинеальными тканями. Помимо классических эффектов своего действия (участие в синхронизации биоритмов, регуляции репродуктивной и иммунной систем) [4, 116, 161, 270], данный гормон способен обеспечивать нейтрализацию ряда АФК [588, 597, 599, 601], усиление синтеза *de novo* антиоксидантных ферментов [598]. Данные, полученные в эксперименте на животных, свидетельствуют, что мелатонин обладает гепатопротекторным действием, проявляющимся при обтурации желчных протоков, развитии токсического гепатита, индуцированного введением тетрахлорметана [525].

В связи с вышесказанным представляет интерес исследование эффектов действия эпифамина, являющегося пептидным биорегулятором, тропным к эпиталамо-эпифизарной области и относящимся к классу цитомединов, способных обеспечивать коррекцию содержания мелатонина в организме за счет стимуляции синтеза и секреции данного гормона [211, 254], и мелаксена – лекарственного препарата, имеющего в своем составе мелатонин, при АГ, НАСГ, и ЛГ.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы – исследование клинической эффективности мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина и мелаксена, с учетом оценки антиоксидантного статуса и апоптотических процессов, при лечении диффузных заболеваний печени.

**Для достижения цели были поставлены следующие задачи:**

1. Сравнительная оценка клинической картины заболевания, показателей лабораторных и инструментальных исследований, активностей маркерных ферментов, характеризующих состояние печени – аланинаминотрансферазы (АлАт), аспартатаминотрансферазы (АсАт), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), холинэстеразы (ХЭ), у пациентов с АГ, НАСГ, развивающимся при СД2 и ЛГ, возникающем при противотуберкулезной полихимиотерапии, после базисного лечения и комбинированной терапии с использованием эпифамина или мелаксена.
2. Оценка показателей иммунного статуса организма – содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG), при ДЗП при осуществлении базисной терапии и комбинированного лечения с применением препаратов, корригирующих уровень мелатонина.
3. Исследование воздействия эпифамина и мелаксена на содержание в моче пациентов с АГ, НАСГ и ЛГ 6-сульфатоксимелатонина (6-СМ), являющегося основным продуктом превращения мелатонина и выступающего в качестве объективного критерия содержания данного гормона в организме.
4. Анализ влияния базисной и комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном на показатели, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов: параметры биохемилюминесценции (БХЛ), содержание диеновых конъюгатов (ДК), активность аконитатгидратазы (АкГ) – критической мишени действия АФК, при лечении больных АГ, НАСГ, развивающимся при СД2 и ЛГ, возникшем на фоне приема противотуберкулезных препаратов.
5. Оценка интенсивности процессов апоптоза в организме пациентов с АГ, НАСГ, ЛГ и изменений их уровня на фоне базисного лечения и при применении комбинированной терапии с использованием эпифамина и мелаксена на основе анализа степени фрагментации ДНК и активности каспаз.
6. Исследование активности ферментативного и неферментативного компонентов АОС, а также НАДФН-генерирующих ферментов в крови больных ДЗП и их

модификаций при проведении базисной терапии и комбинированного лечения с применением препаратов, корригирующих уровень мелатонина.

7. Корреляционный анализ показателей цитолиза гепатоцитов и функции печени, иммунного статуса, уровня мелатонина, параметров, характеризующих состояние свободнорадикального гомеостаза и степень развития апоптоза, в организме больных с ДЗП.

**Научная новизна.** Впервые осуществлено комплексное исследование воздействия мелатонин-корригирующих препаратов – эпифамина и мелаксена, на клиническую картину, иммунный статус, интенсивность СО биомолекул и процессов апоптоза, активность ферментативных и неферментативных компонентов АОС, ряда ферментов окислительного метаболизма в организме больных АГ, НАСГ, развивающимся при СД2, и ЛГ, возникающем на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии. Показана эффективность применения препаратов, корригирующих уровень мелатонина, как в плане торможения развития окислительного стресса, так и купирования основных клинических признаков при данных патологических состояниях. Выявлено, что благодаря иммуномодулирующей активности мелатонина происходит нормализация иммунного статуса больных. Впервые установлено, что повышение уровня мелатонина в организме пациентов при приеме как эпифамина, так и мелаксена сопряжено с существенным снижением интенсивности свободнорадикальных процессов и улучшением функционального состояния АОС организма при ДЗП. Выявлено, что при исследуемых патологических состояниях происходит развитие апоптотических процессов в организме пациентов, о чем свидетельствуют результаты исследования степени фрагментации ДНК и активности каспаз – цистеиновых протеиназ, участвующих в ключевых механизмах апоптоза. Установлено, что прием эпифамина и мелаксена способствует значительному торможению процессов апоптоза. Исследовано воздействие мелатонин-корригирующих препаратов на ферменты, продуцирующие НАДФН, необходимый для функционирования глутатионовой АОС, и показана

зависимость степени реверсии восстановленного глутатиона (GSH) от активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ). Впервые исследована активность аконитатгидратазы (АкГ) при ДЗП и обнаружены ее изменения в зависимости от эффективности проводимого лечения. Впервые выявлены корреляционные взаимосвязи между выраженностью основных клинических признаков заболеваний печени, отражающих степень цитолитического синдрома гепатоцитов, уровнем мелатонина в организме, показателями липидного и углеводного обмена, иммунного статуса, состояния свободнорадикального гомеостаза и процессов апоптоза. Результаты работы расширяют и углубляют фундаментальные представления о клинко-патогенетическом значении процессов свободнорадикального окисления и апоптоза в развитии заболеваний внутренних органов и способствуют внедрению новых методов диагностики и лечения, включающих антиоксидантную терапию, обеспечивающую высокую клиническую эффективность. Полученные результаты являются решением крупной проблемы, имеющей медико-социальное значение, и в совокупности представляют новое перспективное направление исследований – разработка антиоксидантной терапии при заболеваниях внутренних органов.

**Практическая значимость.** Полученные данные вносят вклад в решение проблемы по выявлению молекулярных механизмов нарушений метаболизма при ДЗП и способствуют выбору оптимальных путей их коррекции. Комплексная оценка клинической картины, биохимических маркеров воспалительных изменений в печени, показателей интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов, иммунного и антиоксидантного статуса у больных с ДЗП раскрывает возможности выявления наиболее чувствительных звеньев метаболизма для обоснования научного планирования мероприятий по коррекции данных нарушений в ходе лечения с целью оптимизации терапевтических подходов и улучшения качества жизни пациентов. Данные о позитивном воздействии мелатонин-корректирующих препаратов на свободнорадикальный гомеостаз, а также на основные клинические признаки заболеваний

свидетельствуют о целесообразности применения эпифамина и мелаксена в антиоксидантной терапии при лечении АГ, НАСГ и ЛГ и дают основу для рекомендаций по их применению. Показано, что курс антиоксидантной терапии с применением эпифамина или мелаксена у больных с ДЗП позволяет достоверно уменьшить степень проявления клинических симптомов, приводит к улучшению биохимических и иммунологических показателей, параметров, характеризующих состояние свободнорадикального гомеостаза и апоптотических процессов, стабилизации и снижению степени проявления воспалительных процессов в печени. Результаты проведенного исследования могут найти применение в клинической лабораторной диагностике. Разработанные схемы лабораторной оценки могут быть использованы в диагностике ДЗП в качестве дополнительного критерия, способствуя обеспечению объективного мониторинга показателей состояния пациентов, определяющих течение болезни и прогноз. Выявленные изменения параметров СО и АОС при АГ, НАСГ и ЛГ могут служить основой для создания тест-систем, характеризующих степень выраженности оксидативного стресса и развития апоптоза в организме, применение которых значительно расширит возможности клинической лабораторной диагностики. Доказана целесообразность при лечении ДЗП использовать антиоксидантную терапию с применением мелатонин-корректирующих препаратов, что значительно повышает эффективность лечения, что имеет важное социально-экономическое значение. На основании результатов проведенных исследований разработаны и внедрены в клиническую практику новые методы лечения ДЗП, подтвержденные актами внедрения и патентами. Исследования были выполнены при поддержке грантов «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К.) и президента РФ для молодых кандидатов наук, стипендией президента РФ для молодых ученых.

**На защиту выносятся следующие положения:**

1. Мелатонин-корректирующие препараты – эпифамин и мелаксен, могут выступать в качестве протекторов при развитии оксидативного стресса при ДЗП. Коррекция

уровня мелатонина приводит к уменьшению выраженности клинических признаков заболеваний, маркерных показателей функции печени, улучшению иммунного статуса, параметров липидного и углеводного обмена.

2. Включение эпифамина и мелаксена в базисную терапию в течение стационарного лечения пациентов с ДЗП обеспечивает приближение большинства показателей АОЗ организма к контрольным значениям.
3. Мелатонин-корректирующие препараты способствуют снижению интенсивности СО и процессов апоптоза в организме больных, значительно возрастающей при ДЗП.
4. Под воздействием эпифамина и мелаксена происходит изменение в направлении нормы активности ряда ферментов окислительного метаболизма, способных оказывать лимитирующее действие на интенсивность СО биосубстратов.
5. Корреляционный анализ свидетельствует о тесных ассоциативных взаимосвязях между уровнем мелатонина в организме, выраженностью воспалительных и цитолитических процессов в печени, показателями иммунного и антиоксидантного статуса, а также параметрами состояния свободнорадикального гомеостаза у пациентов с ДЗП.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты исследования внедрены в диагностическую и лечебную тактику в эндокринологических отделениях БУЗ ВО «Воронежский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи» и БУЗ ВО «Воронежская городская клиническая больница скорой медицинской помощи №10», в терапевтических отделениях ГУЗ ВОКПД им. Н.С. Похвисневой и КУЗВО «Воронежский областной клинический психоневрологический диспансер». Материалы работы используются через организацию занятий, модернизацию лекционных курсов, самостоятельную работу студентов и клинических ординаторов на кафедрах госпитальной терапии и эндокринологии, поликлинической терапии и общей врачебной практики, биологии, патологической физиологии ВГМУ им Н.Н. Бурденко. Материалы работы нашли свое отражение в учебных пособиях «Ферментативная регуляция

метаболизма» и «Свободнорадикальные процессы в биосистемах» с грифом УМО по классическому университетскому образованию. Последнее было отмечено премией правительства Воронежской области среди ведущих ученых. По материалам исследований опубликован раздел в издании «Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects» (Nova Science Publishers, Inc, New York).

**Апробация диссертации.** Основные положения работы представлены на 4-ой Всероссийской научно-методической конференции с международным участием «Фармообразование – 2010» (Воронеж, 2010, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2010), VI научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Завадские чтения» (Ростов-на-Дону, 2011), 10 съезде кардиологов и терапевтов центрального федерального округа России «От профилактики к высоким технологиям» (Москва, 2011), региональной научно-практической конференции «Инновационные технологии на базе фундаментальных научных разработок» (Воронеж, 2011), Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2011, 2012, 2013), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медико-биологические и педагогические основы адаптации, спортивной деятельности и здорового образа жизни» (Воронеж, 2012, 2013), 7-й Международной конференции молодых ученых-медиков (Курск, 2013), Международной научно-практической конференции «Векторы развития современной науки» (Уфа, 2014), Международной научной конференции «Постгеномные технологии в медицине: от теории к практике» (Воронеж, 2015).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 68 работ, в том числе 23 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов докторской диссертации, получено 2 патента РФ.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 451 странице текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов исследования, 3-х глав с описанием и обсуждением результатов собственного



исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Результаты представлены в виде 43 таблиц, 56 рисунков. Библиографический указатель включает 672 источника: из них 273 – отечественные, 399 – зарубежные.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### 1.1. Общая характеристика и механизмы развития диффузных заболеваний печени

Известно, что печень – железистый жизненно важный орган, занимающий центральное место в обмене веществ организма. Особенности ее функциональной и физиолого-биохимической специализации, а также анатомических связей с другими органами дают возможность участвовать печени в регуляции и интеграции практически всех видов обмена веществ и поддерживать гомеостаз организма. Метаболические процессы в печени, с одной стороны, настроены на синтез различных веществ для других органов, а с другой – на обеспечение защиты этих органов от образующихся в них токсических веществ или поступающих в организм ксенобиотиков. Печень является крупной пищеварительной железой, которая вырабатывает желчь. Она обеспечивает химические превращения, хранение и перенос в кровь или лимфу аминокислот, липидов, углеводов, витаминов.

Токсические соединения, поступающие с пищей, а также токсические продукты метаболизма биотрансформируются и инактивируются в печени [70,221]. Следует отметить, что эндотелий печеночных капилляров и звездчатые ретикулоэндотелиоциты обладают фагоцитарными свойствами, что важно для противотоксического действия веществ, всасывающихся в кишечнике. Неинфекционное поражение печени случается при попадании в организм химических отравляющих веществ, кроме того, воспаление тканей печени может быть вызвано нарушениями метаболизма [197]. Клетки печени способны полностью регенерировать после их повреждения токсинами. Регенеративная функция печени при действии токсинов стимулируется некрозом гепатоцитов. В случае, если при некрозе соединительнотканый каркас органа не был поврежден, то вполне вероятно абсолютное восстановление структуры печени. Известно, что

даже при поражении 70% гепатоцитов печень может восстановиться до своего нормального объема [640].

В настоящее время, по сведениям Всемирной Организации Здравоохранения, в мире наблюдается значительный рост числа больных ДЗП, являющихся широкой группой патологических состояний, сопровождающихся развитием воспалительных изменений в паренхиме печени. К ДЗП относятся конституционный, или диабетический жировой гепатоз, хронические токсические и вирусные гепатиты, а также цирроз печени различной этиологии. В основе прогрессирования ДЗП лежит механизм повреждения клеточных мембран [10]. Как правило, изменениям подвержена практически вся паренхима печени, однако, могут встречаться отдельные участки неизменной паренхимы. ДЗП характеризуются интенсивным прогрессированием с нарастанием фиброза печени с формированием цирроза печени. Для определения степени фиброза печени, время от времени, применяется пункционная биопсия печени с последующей гистологической оценкой. Основное показание пункционной биопсии – это вирусный гепатит С. Необходимо подчеркнуть, что собственно биопсия печени считается инвазивным способом диагностики, что приводит к увеличению процента осложнений и получению ошибочных результатов у пациентов. Латентное течение ДЗП обуславливает отсутствие явных клинических симптомов. Для определения дальнейшей диагностической и лечебной тактики необходима интеграция данных лабораторных исследований. Одной из проблем является своевременная оценка тяжести и контроль эффективности лечения с учетом клинико-лабораторных данных [97].

Затяжное течение ДЗП приводит к потере трудоспособности пациентов и сопряжено с возможностью летального исхода. Данная патология является одной из насущных проблем современности, учитывая прогрессирование распространенности патологии, высокую частоту тяжелых поражений печени, возможность инвалидизации. Таким образом, ДЗП относятся к ряду социально значимых заболеваний.

Гепатит –поражение печени с признаками воспаления; этот термин употребляется, как для самостоятельного патологического состояния, так и компонента многосистемного или генерализованного заболевания. На основании продолжительности течения, морфологических и клинических признаков гепатит подразделяют на острый, подострый и хронический. Гепатиты по своей природе разнородны. Главными факторами в развитии гепатита являются инфицирование гепатотропными вирусами, действие ксенобиотиков, в первую очередь, алкоголя и лекарств, и метаболические нарушения, а именно гипергликемия и гиперлипидемия [32,70]. В настоящее время активно разрабатываются методы этиотропного лечения хронических диффузных заболеваний печени. Так, при алкогольном гепатите (АГ) основным методом лечения и профилактики прогрессирования является стойкая абстиненция. При лекарственном гепатите (ЛГ) лечение заключается в отмене фармацевтического препарата, который спровоцировал повреждение гепатоцитов. При неалкогольном стеатогепатите (НАСГ), основу патогенеза которого составляет дислипидемия и гипергликемия, применяют гиполипидемические и гипогликемические фармакологические препараты, которые, в свою очередь, повышают риск развития лекарственных поражений печени. В литературе, посвященной ДЗП, достаточно подробно рассмотрена этиология, патогенез, клиника и подходы к лечению.

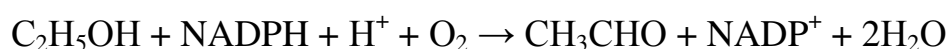
## **1.2 Алкогольная болезнь печени патогенез, клиническая картина, диагностика**

Алкогольная болезнь печени (АПБ) - поражение печени, в основе которого лежит прямое токсическое действие этанола на гепатоциты, и как следствие, поражения их продуктами его метаболизма. В 1793 году Мэтью Бэйли сообщил о связи цирроза печени с употреблением алкоголя. В течение последних 20 лет потребление алкоголя коррелирует с уровнем смертности от цирроза печени. Алкогольная болезнь печени включает в себя стеатоз печени,алкогольный стеатогепатит,острый или хронический гепатит и алкогольный цирроз печени.В

обычных условиях около 90% поступающего в организм алкоголя метаболизируется в печени, при этом основным путем биотрансформации экзогенного этанола является его окисление. Около 2-10% этанола выводится через почки и легкие, остальная часть метаболизируется в печени с помощью окислительных механизмов [108,221].

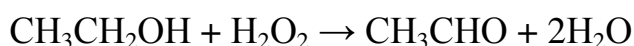
На первом этапе биотрансформации  $C_2H_5OH$  метаболизируется в ацетальдегид, что может осуществляться тремя путями. Основной путь реализуется с участием алкогольдегидрогеназы (АДГ). АДГ является цинк-содержащим ферментом, использующим в качестве кофермента NAD, основное место компартментализации – цитозоль гепатоцитов. Небольшая часть АДГ обнаружена в мозге и желудке (у мужчин). Основной функцией АДГ является окисление эндогенного и экзогенного этанола, а также ряда других спиртов [2, 18]. Фермент обладает выраженным полиморфизмом. В окислении этанола преимущественно принимают участие АДГ I и IV классов.

Другой путь метаболизации  $C_2H_5OH$  в ацетальдегид осуществляется под действием микросомальной этанолаксилирующей системы (МЭОС), компонентами которой являются цитохромы P-450[29]. В качестве кофермента при этом вместо NAD используется NADPH.



Роль МЭОС усиливается с возрастанием концентрации алкоголя в организме. Данная система включается в окисление  $C_2H_5OH$  тогда, когда его концентрация в крови становится выше 0,1‰ [292, 453].

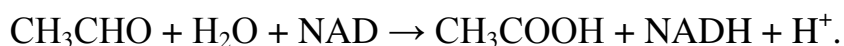
Третий путь биотрансформации этанола протекает под действием каталазы [29; 414]



Известно, что активность каталазы выше в 4-5 раз по сравнению с активностью АДГ. Превращение этанола, катализируемое каталазой, осуществляется, главным образом, в пероксисомах. Каталаза в норме окисляет от 2 до 10% этанола [356].

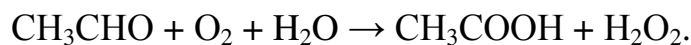
В некоторых исследованиях отмечается возможность утилизации с помощью каталазы до 83%  $C_2H_5OH$ . Значение превращений этанола, катализируемых каталазой, возрастает по мере повышения уровня алкоголя в крови [354, 355]. Роль данного фермента усиливается также при голодании в сочетании с присутствием жирных кислот [356]. Однако считается, что в физиологических условиях путь окисления этанола, катализируемый каталазой, малоактивен в связи с незначительной скоростью образования пероксида водорода. Полагают, что данный путь приобретает существенное значение при возрастании формирования  $H_2O_2$  [357].

Второй этап биотрансформации  $C_2H_5OH$  заключается в окислении ацетальдегида до уксусной кислоты. Реакция катализируется NAD-зависимой альдегиддегидрогеназой (АЛДГ).



В последующем ацетат, после превращения в ацетил-СоА, метаболизируется до  $CO_2$  и  $H_2O$ , что сопровождается образованием АТФ, или же играет роль предшественника в процессах синтеза жирных кислот, кетоновых тел, стероидов в зависимости от пропорции АТФ/АДФ и сосредоточения оксалоацетата в митохондриях гепатоцитов [378].

Ацетальдегид также может окисляться молибден-содержащими FAD-зависимыми ферментами: альдегидоксидазой и ксантинооксидазой в ходе следующей реакции:



В результате образуются пероксид водорода и свободные радикалы. Алкогольная болезнь печени проходит в форме острого или же приобретенного гепатита, также, возможно, развитие цирроза печени. Острый алкогольный гепатит развивается, как правило, впоследствии поступления в организм значимых доз этанола за достаточно короткий промежуток времени. При долговременном приеме спиртного имеется возможность развития АГ, который проходит по типу приобретенного персистирующего гепатита с постепенным

формированием цирроза печени. Развивающийся на фоне патологических нарушений цирроз имеет неблагоприятное течение, ведущее к утрате функции органа [108,221].

При каждодневном употреблении опасных доз спиртного в течение нескольких лет развивается алкогольная жировая дистрофия печени, которая затем трансформируется в алкогольный стеатогепатит [149,213]

К факторам риска развития АГ относят: высокие дозы употребляемого алкоголя; характер и продолжительность злоупотребления; генетический полиморфизм этанолметаболизирующих ферментов; пол (у женщин предрасположенность к развитию алкогольного гепатита выше); неполноценное питание (дефицит пищевых веществ); использование гепатотоксических фармацевтических веществ, метаболизирующихся в печени; заражение гепатотропными вирусами, иммунные факторы; нарушения обмена (метаболический синдром, ожирение, вредные пищевые привычки); эндокринные расстройства.

В настоящее время имеется рост заболевания алкоголизмом у женщин. Часто они обращаются за медицинской помощью уже на поздних стадиях заболевания. Чувствительность гепатоцитов к повреждению этанолом у них выше, чем у мужчин, также чаще могут развиваться рецидивы после компенсации заболевания. Большое содержание спиртного в крови вследствие употребления стандартной дозы у лиц женского пола, связано с низким объёмом распределения алкоголя. Из литературных данных известно, что в слизистой оболочке желудка у женщин снижена концентрация алкогольдегидрогеназы [129,265].

Имеются предположения, что в развитии гепатотоксического эффекта большую роль играет неполноценное питание. Очевидно, что при оптимальном питании с полноценным содержанием микроэлементов, вполне вероятно употребление определённого объема спиртного, который не оказывает вреда печени. Однако также возможно, что существует пороговая токсическая концентрация алкоголя, при превышении которой изменение питания не может

оказать защитного действия. Плохое питание и гепатотоксичность могут действовать как синергисты, утяжеляя течение заболевания. При приеме спиртосодержащих напитков повышается дневная потребность в холине, фолиевой кислоте и иных калорийных субстанциях. Особенно недостаток белков, ведёт к понижению содержания аминокислот и ферментов в печени, что может содействовать токсическому действию алкоголя [56, 108, 256].

Токсическое влияние этанола находится в прямой зависимости от содержания в крови ацетальдегида и ацетата. При окислении этанола происходит увеличение затрат кофермента NAD, повышение соотношения NADH/NAD, что играет весомую роль в формировании жировой дистрофии печени. Повышение содержания NADH приводит к нарушению окислительно-восстановительных процессов и возрастанию синтеза глицеро-3-фосфата, способствует эстерификации жирных кислот, синтезу триглицеридов. Эти процессы сопрягаются с пониженной скоростью  $\beta$ -окисления жирных кислот, усилением синтеза лактата из пирувата и  $\beta$ -гидроксипутирата из ацетоацетата, что ведет к накоплению их в печени. В целом все это приводит к первому этапу заболевания — жировому гепатозу [213,449]. Повышенный уровень восстановленных эквивалентов приводит к подавлению процессов окисления жирных кислот и активации кетогенеза. Возникают нарушения в обмене пуриновых нуклеотидов и развивается гиперурикемия [664].

Патологический процесс утяжеляется тем, что кроме этого, хроническое употребление спиртосодержащих напитков ведет к уменьшению скорости окисления ацетальдегида [93]. Вследствие этого при алкогольной интоксикации возникает излишняя концентрация ацетальдегида, оказывающая местное гепатотоксическое воздействие. При поступлении его в кровь развиваются функциональные и структурные нарушения в других тканях и органах. Повреждающие эффекты ацетальдегида связаны с его возможностью ковалентно связываться с сульфгидрильными и аминогруппами (особенно с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина) белков и иных соединений. Это приводит к нарушению активности



ферментов, трансформации белков. Ингибирование NADH-дегидрогеназы и ряда ферментов цикла трикарбоновых кислот приводит к подавлению процессов тканевого дыхания и понижению образования АТФ [292, 378]. Также замечена способность ацетальдегида *in vivo* создавать комплексы с цитохромом Р-450, гемоглобином, белками печени и сыворотки крови [664]. Возникающие комплексы белка с ацетальдегидом становятся антигенами и вызывают образование антител к данным комплексам, способствуют аутоиммунному разрушению тканей, содержащих модифицированные белки. Понижение толерантности к этанолу на поздних стадиях алкоголизма понимается как итог несогласованной деградации ферментов окисления этанола и ацетальдегида [281]. Гепатотоксичное воздействие ацетальдегида сопряжено с усилением процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), образованием соединений с другими белками, в том числе с ферментами, что приводит к нарушению функции фосфолипидов клеточных мембран [38].

Когда содержание этанола выше способности окисления АДГ, окисление происходит в микросомальной системе окисления этанола (МЭОС) с вовлечением изофермента цитохрома Р- 450 СYP 2E1 (СYP 2E1), который считается критичным изоферментом, появляющимся при хроническом употреблении чрезмерных доз алкоголя. Полиморфизм СYP 2E1 находится в зависимости от внешних причин и коррелирует с разными повреждениями печени. В процессе микросомального перекисного окисления образуются активные формы кислорода (АФК). Возникновение большого числа реактивных молекул кислорода приводит к повышенной затрате и истощению антиоксидантных систем печени, включающих глутатион, каталазу, супероксиддисмутазу, глутатионпероксидазу [487]. В последующем свободные радикалы взаимодействуют с липидами, провоцируя процессы ПОЛ. Следствием процесса считается образование АФК, утяжеляющих течение оксидативного стресса, что морфологически соответствует проявлениям гепатита [38].

Следует отметить, что в развитии алкогольной болезни печени значительная роль принадлежит гену ангиотензиногена (белок, синтезирующийся в печени) и ангиотензина II, которые обладают профиброгенным эффектом [2]. Избыточное отложение железа в гепатоцитах при алкогольном гепатите является усугубляющим фактором в нарушении функции печени. Это может быть обусловлено дефицитом фолиевой кислоты, увеличивающим абсорбцию железа. В свою очередь, окислительный стресс может также приводить к повышенному содержанию свободного железа в клетках печени [70, 268].

Иммунные механизмы также играют большую роль в патогенезе алкогольного гепатита. Так, наблюдается повышение содержания в крови сывороточных иммуноглобулинов, за счет их отложения в стенке печеночных синусоидов, образования в низких титрах антиядерных и антигладкомышечных антител. Повышенная концентрация в организме эндотоксинов и нарушение клеточного иммунитета связаны с гиперчувствительностью Т-клеток к ацетальдегиду, в результате чего происходит усиленное образование цитотоксических Т-лимфоцитов [38, 102, 531].

На основании морфологических признаков отмечается, что при алкогольном гепатите наблюдается баллонная дистрофия, при которой гепатоциты набухают, цитоплазма становится зернистой, ядра маленькие, гиперхромные. При наличии ацидофильных телец можно предполагать развитие апоптоза.

Возникновение телец Мэллори подтверждает наличие алкогольного гиалина и разрушение гепатоцитов. Тельца Мэллори представляют собой скопление органелл и промежуточных филаментов, состоящих из цитокератиновых белков. Гистологические признаки могут быть представлены картиной от минимального АГ до выраженных изменений, которые сопровождаются интенсивным некрозом клеток и формированием фиброзной рубцовой ткани. При микроскопическом исследовании возможно выявление отложения коллагена в пространстве Диссе, при этом количество клеток, которые выстилают печёночные синусоиды

уменьшается. Данные морфологические нарушения препятствуют обмену веществ между клеточной мембраной гепатоцита и плазмой крови, что способствует возникновению портальной гипертензии [45, 268]. АГ рассматривают как предшественник цирроза печени.

Наиболее частыми клиническими признаками являются чувство тяжести и дискомфорт в правом подреберье, диспепсические явления, кожный зуд, кровоточивость десен и спонтанные кровотечения, проявления энцефалопатии и полинейропатии, часто наблюдаются поражения сердца (алкогольная миокардиопатия – нарушение ритма сердца, артериальная гипертензия), нарушения в функционировании половой системы, психо-эмоциональный расстройство[100].

При биохимическом исследовании часто выявляются повышение активности аминотрансфераз (АлАт, АсАт), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), увеличение уровня общего холестерина. В сыворотке крови может быть заметно повышена активность щелочной фосфатазы, что может свидетельствовать об синдроме холестаза. Снижение уровня общего белка и альбумина, а также содержания общего холестерина и активности холинэстеразы чаще наблюдается при циррозе печени. Часто в крови может определяться повышенная концентрация мочевой кислоты и лактата, а также пониженный уровень глюкозы и магния. Гипофосфатемия связана с нарушением функции почечных канальцев независимо от негативных изменений функции печени [16, 97]. В общем анализе крови наблюдается гиперхромная анемия, тромбоцитопения, повышение СОЭ, признаки гипокоагуляции. При АГ повышается также активность лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы.

При исследовании иммунного статуса наблюдается возрастание уровня иммуноглобулинов, особенно сывороточного IgA, концентрации IgG и IgM повышаются умереннее [102].

При обследовании с помощью инструментальных методов, в частности, при проведении ультразвукового исследования (УЗИ) печени, отмечается

гепатомегалия, признаки портальной гипертензии, диффузные или очаговые изменения паранхимы различной степени выраженности, наличие свободной жидкости в брюшной полости. При фиброзофагогастродуоденоскопии (ФЭГДС) наблюдаются признаки эзофагита, атрофического гастрита, возможно варикозное расширение вен пищевода и кардиального отдела желудка. При биопсии печени наблюдается стеатоз, фиброз или цирроз печени, наличие алкогольного гиалина (телец Мэллори), перивенулярный фиброз [97, 98].

### **1.3. Лекарственный гепатит, патогенез, клиническая картина, диагностика**

В метаболизме фармакологических препаратов печень играет непосредственную роль. В норме детоксикация и выведение лекарств определяется активностью печеночных ферментов, клиренсом, кровотоком и степенью связывания лекарств с белками плазмы. Фармакологические препараты относятся к экзогенным токсинам [147]. Время от начала приема препаратов до развития лекарственного гепатита может колебаться от нескольких дней до нескольких лет. Негативное влияние фармпрепараты могут оказывать как токсически, воздействуя непосредственно на клетки печени, так и вызывая идиосинкразии и повреждение гепатоцитов у людей, обладающих индивидуальной непереносимостью данного лекарственного средства.

Основная физиолого-биохимическая система, метаболизирующая лекарства, расположена в микросомальной системе гепатоцитов. Она включает монооксигеназы со смешанной функцией, цитохром *b*-редуктазу и цитохром P450. Восстановителями этих цитохромов служат NADPH и NADH. Фармпрепараты подвергаются гидроксилированию или окислению. Нарушения метаболизма лекарственных препаратов могут быть вызваны различными факторами. Они могут индуцироваться при снижении кровотока в печени и уменьшении синтеза альбумина. Лекарственное поражение печени развивается на фоне терапии медикаментами в результате чрезмерного токсического воздействия лекарственного средства на гепатоциты [269]. Применение медикаментозных

препаратов приводит к развитию 10% всех побочных реакций организма больного. В настоящее время известно более 1000 лекарств, которые могут вызывать лекарственный гепатит. При длительном введении в значительных дозах любое лекарство может неблагоприятно влиять на структуру и функцию печени [94,242]. При назначении фармакологических препаратов гепатоциты являются наиболее уязвимыми в связи с конкуренцией их за метаболические пути, усиление или угнетение активности цитохрома P450 [106]. Гепатотоксическое действие лекарственных препаратов характеризуется нарушением функции печени от субклинических форм до фульминантного гепатита [185, 199]. На долю лекарственных гепатитов приходится до 25% всех случаев острого поражения печени [26]. Печень является мишенью для проявления токсичности ряда лекарственных препаратов, поскольку именно в этом органе происходит метаболизм ксенобиотиков. Биотрансформация лекарственных препаратов заключается в процессах конъюгации метаболитов с мелкими эндогенными молекулами, при этом конечные продукты экскретируются желчью или мочой. Метаболизм фармакологических веществ происходит, главным образом, в гладкой эндоплазматической сети гепатоцитов под действием системы цитохрома P450 (P450-1, P450-2, P450-3), при этом кофактором служит NADPH. При повышенной активности ферментов системы цитохрома P450 происходит усиленная продукция токсичных метаболитов. Повреждение гепатоцитов может быть вызвано сочетанным воздействием различных факторов.

Биотрансформация ксенобиотиков может сопровождаться генерированием АФК. Если это будет происходить в течение достаточно длительного периода, то потенциал АОЗ может истощаться, что приведет к повреждению клетки [482]. Лекарственные гепатиты, развивающиеся на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии, принято относить к категории токсических побочных реакций. Значительная гепатотоксичность характерна для таких противотуберкулезных препаратов как изониазид, рифампицин, пиразинамид. Этамбутол, микобутин и другие препараты обладают меньшей токсичностью

[252, 588]. Различные химические вещества по-разному действуют на клетки печени. Так, после ацелирования изониазид превращается в гидразин. Гидразин, в свою очередь, под действием лизирующих ферментов образует ацелирующее вещество, которое ведет к некрозу клеток печени. При комплексном и постоянном приеме противотуберкулезных препаратов, их метаболизм осуществляется, как правило, с помощью системы цитохрома P – 450 2E1 [26].

Лекарственные поражения печени включают в себя следующие патоморфологические процессы: некроз зоны III и I; жировая дистрофия; фиброз [56, 371]. Некроз гепатоцитов III зоны ацинуса может возникать при воздействии четыреххлористого углерода, толуола, изониазида, трихлористого этилена, парацетамола и т.д. Причиной является чрезмерная высокая концентрация ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, при этом давление кислорода в крови синусоида минимальное [106]. Выраженность некроза зоны III может усиливаться при повышенной дозе принятого лекарства.

В клетках печени III зоны ацинуса выявляется гидропическая дистрофия в виде прозрачной цитоплазмы и пикнотического ядра, может наблюдаться незначительная инфильтрация портальных зон полиморфноядерными лейкоцитами. При приеме больших доз препаратов, содержащих железо, а также фосфорорганических соединений возникает некроз гепатоцитов I зоны ацинуса. При микроскопии в клетках печени наблюдаются некрозы в зоне III, может выявляться выраженный перипортальный фиброз. В печени обнаруживается мелкокапельная жировая дистрофия, а также имеет место воспалительный процесс. Лекарственно-индуцированный фиброз печени характеризуется признаками фиброза печени в перисинусоидальных пространствах. У больных развивается нецирротическая портальная гипертензия [401, 427] .

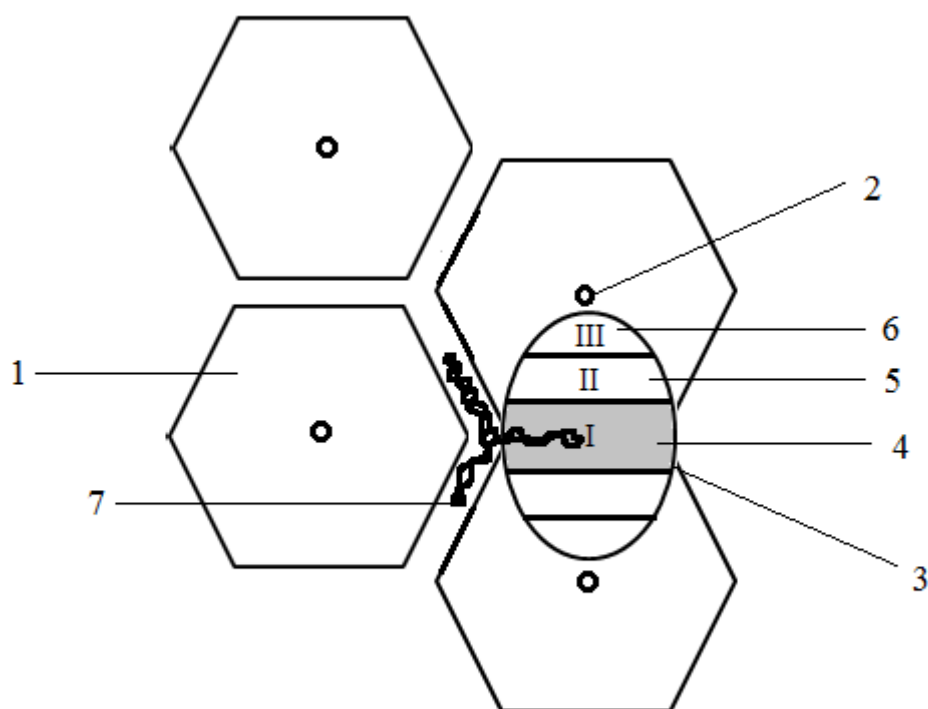


Рисунок 1. Схема строения печеночной дольки.

1 – печеночная долька; 2 – центральная вена; 3 – печеночный ацинус; 4– I зона ацинуса; 5 –II зона ацинуса; 6 – III зона ацинуса; 7 – портальная триада.

Лекарственный гепатит умеренной степени может протекать бессимптомно или со скудными клиническими проявлениями и выявляться при лабораторном обследовании. Обычно на фоне интоксикации лекарственными препаратами появляются общая слабость, тошнота. В основном характерными клиническими признаками лекарственного гепатита являются симптомы холестаза (желтушность кожных покровов и слизистых, кожный зуд). Однако, могут проявляться также дискомфорт в животе или тяжесть, гепатомегалия, геморрагические осложнения, а также печеночная энцефалопатия и печеночная кома[117].

При лабораторном исследовании наблюдаются признаки цитолиза (повышение активностей АлАт, АсАт, ГГТП, гипербилирубинемия, эозинофилия. При УЗИ печени выявляются диффузные изменения печени [37, 97,255].

#### **1.4. Патогенез, клиническая картина и диагностика при неалкогольном стеатогепатите**

По данным представленным в литературе частота встречаемости неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) в странах Западной Европы и США составляет 7—9%. Обследование больных с циррозом печени позволило предположить, что в 60-80% случаев цирроз неясной этиологии формируется на фоне НАСГ [96, 295, 550, 601]. Вопрос о частоте НАСГ в России остается не освещенным. Можно предполагать, что из более, чем 2,5 млн. человек, болеющих сахарным диабетом 2 типа (СД2), около двух третей страдают данной патологией. Для НАСГ характерно латентное течение. Выделяют первичный и вторичный НАСГ. Этиологическими факторами первичного НАСГ являются эндогенные нарушения углеводного и липидного обмена. К вторичному относятся метаболические нарушения и прием лекарственных препаратов. НАСГ развивается при нарушении жирового обмена, обусловленном врожденным дефектом гепатоцитов или чрезмерным поступлением в них жиров, жирных кислот или углеводов, превышающим способность гепатоцитов к секреции липидов. Наиболее частыми факторами в развитии жировой дистрофии печени являются ожирение, дислипидемия и СД2 [40, 96, 530]. Жировой дистрофией печени, принято считать ее состояние, когда более 5% массы составляет жир, преимущественно в виде триглицеридов.

У больных НАСГ выраженность жирового стеатоза соответствует увеличению массы тела [268]. У 75% пациентов с неалкогольным стеатогепатитом индекс массы тела (ИМТ) повышен на 10—40% по сравнению с нормой. Ожирение (ИМТ > 30 кг/м<sup>2</sup>) в 95—100% случаев связано с развитием стеатоза печени и в 20—47% — с неалкогольным стеатогепатитом. Особенно с риском развития НАСГ связано висцеральное ожирение, степень развития которого повышается с возрастом. Известно, что при чрезмерном отложении жира значительно усиливается липолиз, при этом в печень поступает большее



количество жирных кислот. Это приводит к несоответствию синтеза и секреции триглицеридов. Кроме того, нарушается метаболизм белков [530].

Увеличение содержания липидов в гепатоцитах может иметь место в результате повышения поступления свободных жирных кислот (СЖК), снижения скорости бета-окисления СЖК в митохондриях печени, повышенного синтеза жирных кислот, уменьшения синтеза или секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП).

СД2 характерен для 60% больных с жировой дистрофией печени. Гиперлипидемия бывает у 20—80% больных с НАСГ. ИМТ является независимым фактором для оценки степени жировой инфильтрации печени [166]. Большинство полученных данных указывает, что развитие НАСГ обусловлено доминированием одного или группы взаимодействующих между собой генов, которые могут одновременно стимулировать все компоненты метаболического синдрома. В ходе генетических исследований выделены 4 группы генов, ответственных за склонность к инсулинорезистентности и НАСГ: гены, ответственные за окисление жирных кислот, окислительное равновесие в клетке и экспрессию фактора некроза опухоли альфа. При СД2 в печени повышается содержание глюкозо-6-фосфатазы, в связи с чем, облегчается выделение глюкозы в кровь. Избыточное поступление свободных жирных кислот в печень, образование из них триглицеридов, снижение скорости бета-окисления свободных жирных кислот, а также секреция липидов в кровоток способствуют формированию жировой дистрофии печени. При этом гепатоциты активно захватывают свободные жирные кислоты. В печени усиливаются разрушение гликогена и глюконеогенез, в то же время поглощение глюкозы подавляется. При кетоацидозе липолиз усиливается. Все эти факторы при СД2 приводят к формированию жировой печени [469, 610].

Характерным патоморфологическим признаком при НАСГ являются признаки жировой дистрофии гепатоцитов, стеатонекроза и долькового воспаления. Гистологически реакция при НАСГ напоминает острый алкогольный гепатит. Ультраструктура телец Меллори схожа с соответствующей картиной при

алкогольном гепатите. При электронной микроскопии выявляют признаки фосфолипидоза лизосом. Фокальные центрилобулярные некрозы чаще развиваются при мелкокапельном стеатозе. Воспалительный инфильтрат содержит лимфоциты, мононуклеарные клетки, преобладают нейтрофилы [40, 96]. Особенностью некроза гепатоцитов при НАСГ является формирование мелких гранул либо из одних макрофагов, либо, что чаще, инфильтрат носит смешанный характер. Этот вариант определяют как «липогранулема». Внутридольковые некрозы и липогранулемы рассматривают как первые признаки стеатогепатита, а нарастание их количества и увеличение размера как усиление активности и ухудшение прогноза. Стеатоз смешанного типа сопровождается фибротическими и цирротическими изменениями которые могут выявляться при первом исследовании, однако частота заболевания отмечена в 40% случаев у женщин, страдающих ожирением. Накопление коллагена в пространстве Диссе может развиваться при СД и быть обусловлено теми же причинами, что и диабетическое поражение периферических капилляров. При этом возможно развитие цирроза печени [550].

Первыми клиническими проявлениями заболеваний, сопровождающихся мелкокапельным ожирением, часто бывают утомляемость, тошнота, рвота, желтуха разной интенсивности, нарушения сознания, кома и судорожные припадки. У 75% больных с НАСГ обнаруживается гепатомегалия. Увеличение селезенки имеет место в 25% случаев. Желтуха, асцит, «печеночные знаки» выявляются редко. Возможно развитие осложнений: почечной недостаточности и ДВС-синдрома. Поражается не только печень; триглицериды могут накапливаться в почках, сердце, поджелудочной железе и головном мозге. Печёночная недостаточность обычно не является причиной смерти. Кома может быть связана с накоплением в крови аммиака или отёком мозга.

При диагностике НАСГ в биохимическом анализе крови отмечается повышение показателей активности аминотрансфераз, ГГТП, общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП, ЛПОНП и снижение ЛПВП. По данным УЗИ

выявляется жировая дистрофия печени. Также важными признаками являются повышенный индекс массы тела (ИМТ), т.е. наличие ожирения и синдром инсулинорезистентности. При диагностике НАСГ важно исключить признаки злоупотребления алкоголем и хронического вирусного гепатита [148, 295]. На современном этапе в диагностике НАСГ широко используются новые биопрогностические технологии [605]. При повышенной активности цитолитических ферментов и при отсутствии других биохимических или серологических нарушений можно диагностировать патологическое состояние с помощью биопсии. Однако, как было отмечено выше, проведение биопсии ведет к высокому проценту осложнений и получению ошибочных результатов у пациентов. Латентное течение ДЗП обуславливает отсутствие явных клинических симптомов. Для определения дальнейшей диагностической и лечебной тактики необходима интеграция данных лабораторных исследований.

### **1.5. Свободнорадикальное окисление в норме и при патологии**

Свободные радикалы, на образование которых в организме здорового человека расходуются около 5-6% поступающего кислорода, являются необходимыми компонентами метаболических путей, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность организма. Свободнорадикальное окисление (СО) биомолекул представляет собой совокупность реакций оксигеназного типа окисления, индуцированных свободными радикалами [46, 47, 48]. СО выступает в качестве одного из универсальных механизмов в патогенезе различных заболеваний. Вместе с тем, этот процесс необходим для нормального функционирования биомембран [60]. Свободные радикалы играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза организма, участвуя в жизненно важных физиологических и метаболических процессах. В частности, они могут обеспечивать модификацию активности ряда ферментов и иммуноглобулинов [49]. Установлено, что свободные радикалы принимают участие в переносе

электронов флавинами, играют важную роль в обновлении фосфолипидного слоя клеточных мембран, они являются неотъемлемыми компонентами реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях, митогенезе, необходимы для передачи сигнала в процессах межклеточного взаимодействия и в процессах ПОЛ. Они необходимы для реализации естественных цитотоксических реакций, более того, некоторые из свободных радикалов, в частности, супероксид и NO обладают бактерицидным и противоопухолевым действием [79, 80].

Количество свободных радикалов в организме увеличивается с возрастом, оно повышается при физической нагрузке, причем у лиц преклонного возраста при физической нагрузке их образование происходит более интенсивно, чем у молодых людей. Повышение уровня свободных радикалов в плазме у здоровых людей наблюдается также на фоне гипергликемии, избытка свободных жирных кислот и гиперинсулинемии [21; 582].

В то же время, чрезмерное генерирование свободных радикалов ассоциировано с развитием многих патологических состояний. В настоящее время убедительно доказано, что интенсификация свободнорадикальных процессов характерна для заболеваний различной этиологии. Это свидетельствует в пользу общебиологического характера свободнорадикального повреждения клеток. Показано, что сахарный диабет, астма, артриты, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, злокачественные новообразования и другие патологические состояния сопряжены с активацией СО [80, 110, 143]. Инициация СО биомолекул может быть обусловлена различными причинами, но первостепенную роль в этом процессе играют промежуточные продукты восстановления кислорода. В свою очередь АФК могут образовываться интрацеллюлярно в сфере действия оксидазных энзимов, а также экстрацеллюлярно – при участии лейкоцитов [262].

Постоянное повышенное образование АФК в процессе старения человека приводит, по крайней мере, частично, к снижению функциональной активности органов, а в тканях с высоким содержанием триглицеридов такого рода процессы

ускорены. Наиболее подвержены развитию патологических изменений в результате развития оксидативного стресса структуры клеток в тканях, функционирование которых требует больших энергетических затрат, с небольшими компенсаторными возможностями антиоксидантных систем: эндотелиальные клетки и гладкомышечные элементы сосудистой стенки, в которых субэндотелиальное окисление липопротеинов низкой плотности приводит к нарушению функции эндотелия и развитию в последующем различных тяжелых осложнений, таких как ретинопатия и микроальбуминурия [20, 311].

Накопление АФК в чрезмерных количествах может сопровождаться нарушением жидкокристаллической структуры липопротеидов мембран, уменьшением прочности биологических мембран, набуханием и разрушением митохондрий, структурно-функциональными нарушениями ферментных систем дыхания, окислением сульфгидрильных групп ферментов, ослаблением биосинтеза АТФ, дезорганизацией транспортных механизмов переноса ионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), различных метаболитов между цитозолем, митохондриями и рибосомами, снижением биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, повреждением лизосом с выходом гидролитических ферментов, разрушением мембран эритроцитов, ослаблением процессов дыхания, накоплением молочной кислоты, окси- и кето кислот и развитием ацидоза, инактивацией компонентов АОС.

Мишенью для АФК могут быть аминокислоты, белки, липиды, нуклеиновые кислоты. Воздействуя на ДНК и РНК, вызывая изменения наследственной информации, свободные радикалы могут выступать также как мутагены [22, 24]. Образование АФК связано с их взаимодействием с белками в процессе гликирования белков и, в гораздо большей степени – с трансформацией липидов в реакциях пероксидного окисления [21]. Таким образом, СО липидов играет важнейшую роль в организме человека. Очевидно, что для активных форм кислорода характерна весьма высокая константа взаимодействия с ненасыщенными жирными кислотами, которые служат основными компонентами

фосфолипидной структуры мембран [46]. Причем мембранные липиды наряду со структурными и барьерными функциями могут участвовать в регуляции метаболических процессов в клетке [180, 226]. В процессе пероксидного окисления липидов происходит непосредственный перенос кислорода на субстрат, что сопровождается возникновением перекисей, кетонов, альдегидов. Продукты ПОЛ могут выступать как регуляторы проницаемости клеточных мембран, стабильности липопротеиновых комплексов. К важнейшим физиологическим функциям ПОЛ относятся: обновление фосфолипидного состава клеточных мембран, регуляция ряда ферментов, индукция биоэнергетических процессов, влияние на состояние окислительного фосфорилирования [5, 228]. Процесс пероксидного окисления липидов, реализующийся по принципу цепной реакции, включает несколько стадий: «иницирование», «продолжение», «разветвление» и «обрыв» цепи [23; 50; 112; 124].

В настоящее время известно более 8000 реактивных соединений, принимающих участие в процессах переноса электронов в организме. Их реактивность обусловлена наличием на внешней орбите молекулы неспаренного электрона, тогда как молекула остается стабильной только при наличии четного числа электронов на внешней орбите. Выделяют реактивные радикальные и реактивные нерадикальные соединения, среди которых наиболее активными являются соединения кислорода, азота и хлора [44, 438]. Следует отметить, что сам по себе  $O_2$  в организме не вступает в неконтролируемые реакции. Негативные эффекты кислорода взаимосвязаны не с его действием, а различных кислородных радикалов, образующихся в клетках.

Супероксиды образуются с участием клеточных оксидазных систем, ксантиноксидазы и NADPH-оксидазы. После образования супероксиды принимают участие в многочисленных реакциях с образованием различных реактивных соединений, таких как пероксид водорода, пероксинитрит, окисленный липопротеин низкой плотности или гипохлорная кислота [112,506].

Генерация АФК в клетке происходит в результате побочных реакций  $O_2$  с ферментами и коферментами определенных участков электронтранспортной цепи. Другой источник – ферментативные реакции, сопровождающиеся окислением субстратов посредством молекулярного кислорода с образованием АФК [12]. Фагоциты для уничтожения чужеродных клеток используют АФК, в связи с чем, при стимуляции их функционирования происходит резкий подъем дыхательной активности, сопровождающийся возрастанием потребления кислорода в 50 раз [222]. При этом имеет место метаболизация глюкозы через пентозофосфатный путь, что приводит к образованию NADPH. Благодаря этому, фермент - мембраносвязанная NADPH-оксидаза плазмы, обеспечивает катализ одноэлектронного восстановления кислорода за счет переноса электронов от NADPH к FAD и затем, по-видимому, к цитохрому *b*. Продуктом данной реакции является супероксидный анионрадикал ( $O_2^{\bullet-}$ ).

В определенных условиях работы электронтранспортной цепи возможно также одно-электронное восстановление кислорода, взаимосвязанное с его более высоким сродством к убихинону по сравнению с цитохромоксидазой. Это сопровождается образованием супероксиданионрадикала. Образование  $O_2^{\bullet-}$  может также происходить в результате действия ксантиноксидазы. Генерирование супероксиданионрадикала имеет существенное значение, являясь высокореакционным соединением не способным из-за высокой гидрофильности покидать клетку данная АФК накапливается в цитоплазме. Благодаря способности супероксиданиона легко мигрировать, а также протеканию определенных кислородпотребляющих ферментативных и неферментативных реакций, он обнаружен практически во всех клеточных структурах [79]. В результате дисмутации  $O_2^{\bullet-}$  образуется  $H_2O_2$ , и эти АФК служат предшественниками для генерирования еще более токсичных кислородных метаболитов, таких, например, как гидроксильный радикал  $OH^{\bullet}$  [251]. В результате активации под действием  $O_2^{\bullet-}$  NO-синтазы в тканях образуется NO-радикал, обладающий свойствами вторичного мессенджера. Вместе с тем,

супероксиданионрадикал может уменьшать уровень  $\text{NO}^\bullet$  – радикала за счет превращения его в пероксинитрит. Последний может способствовать индукции апоптоза, а в ходе своего спонтанного распада превращаться в  $\text{OH}^\bullet$ . Гидроксильный радикал может также образовываться из гипохлорит-аниона в присутствии ионов железа. Супероксидный анионрадикал генерируется во всех аэробных клетках в ходе присоединения одного электрона к молекуле кислорода. Он служит родоначальником других активных форм кислорода [79, 109]. Образование  $\text{H}_2\text{O}_2$  происходит при передаче на кислород двух электронов, а также в результате реакции дисмутации двух молекул  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Пероксид водорода – достаточно стабильная АФК. Он может легко проникать через клеточные мембраны.  $\text{H}_2\text{O}_2$  обнаруживается при фагоцитозе, его генерирование также взаимосвязано с работой митохондрий и микросом. Пероксид водорода может проявлять сосудосуживающий и цитотоксический эффекты, он участвует в подавлении пролиферации лимфоцитов. Уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  уменьшается под действием глутатионпероксидазы, церулоплазмينا и внутриклеточной каталазы [67, 232]. Пероксид водорода может выступать источником образования  $\text{OH}^\bullet$  в присутствии двухвалентного железа или превращаться в гипохлорит-анион ( $\text{OCl}^-$ ) ферментом миелопероксидазой [179]. Рекомбинация  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{Fe}^{2+}$ , лежащая в основе реакции Фентона, является главным механизмом образования  $\text{OH}^\bullet$ .

При взаимодействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (реакция Хабера-Вайса) в присутствии металлов с переменной валентностью также образуется  $\text{OH}^\bullet$ , являющийся одной из наиболее агрессивных форм восстановленного кислорода.

Таким образом, интенсификация выработки различных форм активного кислорода приводит к нарушению метаболизма и гибели клеток организма. Ответом на чрезмерное образование АФК и СО биомолекул является активизация АОС организма.

## 1.6. Антиоксидантная система организма



Регуляция свободнорадикального гомеостаза организма обеспечивается многокомпонентной АОС, в состав которой входят гидрофильные и гидрофобные соединения, обладающие редуцирующими свойствами, а также ферменты, способные оказывать антиоксидантное действие или поддерживать содержание веществ, определяющих антиоксидантный потенциал, на должном уровне [90;165]. Считают, что для компонентов АОЗ характерна иерархическая соподчиненность, и их включение регулируется на уровне генома [24]. Среди химических веществ и физических факторов принято выделять прооксиданты и антиоксиданты, оказывающие соответственно стимулирующий и тормозящий эффекты на СО. Выделяют антиоксиданты природного (биоантиоксиданты) и синтетического происхождения [31, 114, 165, 457]. Антиоксиданты, в своем составе имеют подвижный атом водорода, с помощью которого реагируют с АФК. Такие подвижные атомы водорода имеют место в связи с наличием нестойкой связи с атомами серы или углерода. При взаимодействии молекулы антиоксиданта со свободными радикалами возникают радикалы самого антиоксиданта, но они малоактивны и не способны к продолжению цепных свободнорадикальных процессов. Некоторые из антиоксидантов не обрывают цепь свободнорадикальных превращений, а замедляют их, т.е. обладают пролонгирующим действием. Кроме того, они могут образовывать комплексоны с металлами переменной валентности. Антиоксиданты обладают способностью нейтрализовывать АФК еще до развития эффекта повреждения биомолекул [84, 262, 420, 429]. АОС действует против всех свободных радикалов, образующихся в организме.

Система антиоксидантной защиты организма включает два звена – ферментативное и неферментативное.

В ферментативное звено входят антирадикальные ферменты, обеспечивающие инактивацию супероксиданионрадикала - супероксиддисмутаза (СОД) и ферроксидаза (церулоплазмин), а также ферменты, детоксицирующие неорганические и органические перекиси – пероксидазы и каталаза. К данному

звену относится также глутатионредуктаза, катализирующая восстановление компонента неферментативного звена АОС – глутатиона [484, 488].

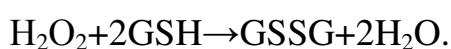
СОД занимает одно из главных мест в первичном ферментативном звене АОС. По своей четвертичной структуре СОД высших животных и человека представляет собой димер, каждая из субъединиц которого содержит по одному атому меди и цинка. Фермент катализирует реакцию дисмутации супероксиданионрадикала с образованием воды и молекулярного кислорода. Существуют различные типы СОД. Mn –содержащая СОД находится в митохондриях; Cu, Zn – содержащая СОД локализована в цитоплазме клеток [634]. Главное регулирующее воздействие на активность СОД оказывает уровень супероксиданионрадикала, выступающего в качестве индуктора синтеза фермента *de novo*. Активаторами данного фермента часто служат соединения, содержащие SH- группы (глутатион, цистеин) [353]. Скорость супероксиддисмутазной реакции чрезвычайно высока и ограничивается в основном скоростью диффузии супероксиданионрадикала. СОД осуществляет нейтрализацию АФК, генерируемых в результате сбоев в работе электронтранспортной цепи, при действии металлов переменной валентности, радиоактивного излучения и влиянии других негативных факторов [245, 276, 626].

Вторым ферментативным звеном, обеспечивающим защиту от АФК, служат каталаза и пероксидазы, осуществляющие детоксикацию пероксидов.

Молекула каталазы по субъединичной структуре является гомотетрамером, содержащим 4 гемовых группы. Каталаза (КФ 1.11.1.6) обнаружена во многих тканях организма, но, наибольшая активность фермента характерна для печени, почек, эритроцитов. Данный фермент в эритроцитах присутствует в виде комплекса с NADPH, который способствует предотвращению инактивации фермента, но при этом не является фактором, необходимым для проявления ферментативной активности. Каталаза обеспечивает предохранение клетки от накопления пероксида водорода, который в присутствии ионов двухвалентного железа выступает в качестве источника гидроксильного радикала – наиболее

опасной и агрессивной АФК. Этот фермент способен длительно сохранять высокую активность, и скорость катализируемой реакции ограничивается только скоростью диффузии субстрата к активному центру [354, 355].

Среди пероксидаз следует, прежде всего, отметить глутатионпероксидазу (ГП, КФ 1.11.1.9.) - селеносодержащий фермент, который обеспечивает превращение  $H_2O_2$  и органических гидроперекисей в гидросоединения, которые затем могут мобилизоваться клеточными системами. Данный фермент катализирует реакции:



Установлено, что фермент является тетрамером, состоящим из одинаковых субъединиц. Молекулярная масса каждой из 4-х субъединиц ГП печени составляет около 21кДа, и их активные центры содержат атом селена. В печени данный фермент локализован в цитозоле клеток и митохондриальном матриксе [430]. Таким образом, пероксид водорода в пероксисомах удаляется в основном каталазой, а в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме с помощью ГП. Поскольку ГП имеет в тысячу раз более высокое сродство по отношению к перекиси водорода по сравнению с каталазой, то ГП считают антиоксидантным ферментом, имеющим первостепенное значение в плане детоксикации  $H_2O_2$ . Вместе с тем, ГП может восстанавливать гидроперекиси жирных кислот, пероксиды белкового и нуклеиновокислотного происхождения. Кроме селеносодержащей ГП существует также ГП, не содержащая селена – глутатионтрансфераза, характеризующаяся другими каталитическими свойствами [123]. Молекулярная масса данного фермента равна 39–46 кДа. Он обеспечивает катализ восстановления гидроперекисей органических соединений, включая полиненасыщенные жирные кислоты. Эффективность данного фермента в отношении  $H_2O_2$  чрезвычайно низка [386]. Активность селено-содержащей ГП взаимосвязана с уровнем селена в организме. Недостаточность селена приводит к снижению количества мРНК данного фермента и падению его активности [135;

318]. Функционирование ГП зависит от активности ГР – фермента, восстанавливающего глутатион за счет использования восстановительных эквивалентов NADPH. Восстановленный глутатион (GSH), -  $\gamma$  - глутамилцистеинилглицин, служит в качестве восстановленного кофактора в реакции, катализируемой ГП. При этом SH- группы 2-х молекул GSH взаимодействуют, что приводит к образованию дисульфида (GSSG). Для реверсии в восстановленную форму необходим NADPH:

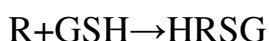


Таким образом, активность ГП зависит от уровня восстановленного глутатиона, и соответственно, от активности ГР и содержания NADPH в клетке. ГР – это флавопротеид, являющийся по четвертичной структуре гомодимером. Каждая из субъединиц фермента имеет четыре структурных домена и включает FAD и NAD(P)H-связывающие участки. S–S-связь, служащая центром симметрии молекулы ГР, обеспечивает ассоциацию субъединиц фермента [263]. Наибольшая ферментативная активность характерна для тонкого кишечника, почек, эритроцитов [194]. В основном ГР содержится в цитоплазме клеток, но также присутствует и в ядре. Предполагается, что в печени часть ГР находится в мембраносвязанном виде [117]. Выявлено, что активность ГР в сыворотке крови человека повышается при различных заболеваниях: инфаркте миокарда, раке, в эритроцитах - при наследственном дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, что позволяет использовать уровень активности этого фермента в диагностических целях [429]. Очищенные препараты ГР используются также для количественного определения окисленного и восстановленного глутатиона [389]. ГР выделена из источников животного и растительного происхождения: из эритроцитов, печени, дрожжей и бактерий. Её биологическое значение заключается в обеспечении клеток восстановленным глутатионом без повышения его синтеза. ГР восстанавливает  $\text{H}_2\text{O}_2$  и органические гидроперекиси (ROOH) СЖК, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и т.д. Глутатионтрансферазы

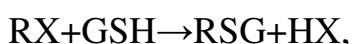
катализируют восстановление только ROOH. Но, следует подчеркнуть, что один из изоферментов локализован в хроматине и восстанавливает ROOH ДНК в ядре.

Глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) – семейство мультифункциональных белков, использующих восстановленный глутатион в ходе реакций конъюгации с гидрофобными веществами, для их восстановления и изомеризации. Они катализируют реакции четырех основных типов:

1. Присоединение к субстрату (R) молекулы восстановленного глутатиона:

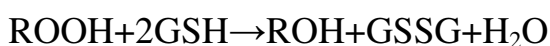


2. Нуклеофильное замещение:



где уходящая группа представлена  $X^-$ :  $Hal^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $HSO_4^-$ ,  $RO^-$ ,  $RS^-$ ,  $CN^-$

3. Восстановление органических пероксидов до спиртов:



4. Изомеризация. Данный механизм реакции включает промежуточное присоединение GSH.

Г-S-T вступает в ряд реакций, характерных для других ферментов: восстанавливает органические гидропероксиды, некоторые дисульфиды, осуществляет изомеризацию или образует сложные тиоэфиры [61, 165]. Различные виды Г-S-T выделены из многих источников. Глутатионтрансферазная активность обнаруживается в различных тканях животных и человека. Г-S-T является одним из ключевых ферментов второй фазы детоксикации ксенобиотиков, а также лекарственных веществ.

Г-S-T высокоспецифичны к GSH, но не специфичны к субстрату. Обязательно, чтобы субстрат был гидрофобным или чтобы в нем были гидрофобные зоны. Ингибиторами Г-S-T служат N – алкилмалеимиды, тяжелые металлы, S- алкилы глутатиона, полифенолы, некоторые гербициды. Ингибируют Г-S-T и некоторые лекарства *invitro* и *invivo*: пропилтиоуроцил, гиполипидемические средства, пролифераторы пероксисом, некоторые мочегонные препараты, порфирины. Одна из основных функций Г-S-T –

биотрансформация ксенобиотиков [114]. Все эти функции Г-S-T способствуют предохранению ДНК, митохондрий и других жизненно важных центров клетки от вредных веществ и в результате значительно увеличивают устойчивость клетки и целого организма [332].

Помимо ферментативного звена АОС включает неферментативное звено. Оно играет важную роль в обезвреживании свободных радикалов и состоит из низкомолекулярных антиоксидантов. Одно из главных мест принадлежит токоферолам. Среди токоферолов наибольшей биоактивностью обладает  $\alpha$ -токоферол – витамин Е, выступающий одним из основных жирорастворимых антиоксидантов.  $\alpha$ -Токоферол локализуется во внутренних мембранах митохондрий и обеспечивает детоксикацию АФК в липидах клеточных мембран. Имеются данные о существовании прямой взаимосвязи между уровнем  $\alpha$ -токоферола и тканевого дыхания и обратной связи между содержанием данного антиоксиданта и степенью окисления липидов [439; 637]. Свою антиоксидантную активность он проявляет за счет способности создавать компактную мембранную архитектуру, предохраняющую от негативного влияния АФК, а также эффективно инактивировать свободные радикалы. Кроме того,  $\alpha$ -токоферол обладает способностью прерывать цепные процессы перекисления ненасыщенных жирных кислот, предупреждая атерогенные изменения липидов [78, 120].  $\alpha$ -Токоферол выступает в качестве эффективного «тушителя» синглетного кислорода, акцептора супероксидного анионрадикала и «перехватчика» свободных радикалов, реагируя с ними на стадии обрыва цепей. Следует отметить, что эффективно реагировать с радикалами может только восстановленная (фенольная) форма  $\alpha$ -токоферола, имеющая свободную гидроксильную группу [339].

К неферментативным компонентам АОС могут быть отнесены вещества, служащие хелаторами ионов металлов переменной валентности. К такому роду веществ – комплексонов может быть отнесен цитрат. Цитрат (лимонная кислота, окситрикарболлиловая или 2-оксипропан 1,2,3-трикарбоновая кислота) –

трехосновная органическая оксикислота. В настоящее время актуальной проблемой является исследование антиоксидантных свойств цитрата, способного хелатировать ионы двухвалентного железа, участвующие в реакции Фентона. Как известно, в ходе данной происходит образование одной из наиболее агрессивных АФК – гидроксильного радикала [312]. Аконитатгидратаза (КФ 4.2.1.3; аконитаза; АкГ) обеспечивает катализ превращения цитрата в изоцитрат. Молекула данного фермента легко разрушается под действием АФК, в связи с чем, АкГ можно рассматривать в качестве критической мишени действия свободных радикалов. Этот фермент катализирует одну из начальных реакций цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). АкГ принадлежит основная роль в регуляции накопления лимонной кислоты. Данный фермент способен катализировать присоединение воды по двойной связи цис-аконитата с образованием лимонной кислоты или изолимонной кислоты [619]. АкГ обнаружена во многих видах живых организмов: грибах, водораслях, бактериях, высших растениях, а также в различных органах и тканях животных и человека. Показано, что существует как цитоплазматическая форма АкГ, так и митохондриальная форма фермента. Для них характерны различные физико-химические свойства. Однако и тот, и другой изоферменты АкГ содержат  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  кластер, связанный с остатками цистеина Cys437, Cys503 и Cys506. Большее количество (80%) АкГ сосредоточено в цитоплазматической фракции. У человека цитоплазматическая и митохондриальная АкГ встречается во всех тканях, наибольшая ферментативная активность характерна для печени, почек и сердца [663]. Считается, что различно локализованные изоферменты АкГ выполняют разные физиологические функции в клеточном метаболизме, отражающие функционирование фермента в биодegradативных и анаболических процессах. Так, митохондриальная АкГ катализирует одну из начальных реакций цикла Кребса, тогда как работа цитоплазматической АкГ направлена, главным образом, на регуляцию накопления и утилизации цитрата в ряде биосинтетических процессов [672]. В зависимости от величины и продолжительности окислительного стресса, АкГ может подвергаться

обратимому ингибированию вследствие окисления остатков цистеина, а в дальнейшем необратимой инактивации через разборку  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  - кластера, карбонилирование и АТФ-зависимую деградацию. При этом из Fe-S кластера высвобождается ион  $\text{Fe}^{2+}$ , являющийся прооксидантом. Накапливающийся при ингибировании АкГ цитрат, связывая ионы железа, лимитирует образование  $\text{OH}^{\bullet}$  - радикала в реакции Фентона и обеспечивает при этом защиту молекулы АкГ от инактивации [426].

Важная роль в неферментативном звене АОС принадлежит водорастворимым низкомолекулярным тиоловым соединениям, к которым относится глутатион. Глутатион – трипептид, образованный цистеином, глутаминовой кислотой и глицином. Он представляет собой основной клеточный фонд тиоловых групп. Глутатион, являясь нуклеофильным тиолом, способен взаимодействовать не- и энзиматически с АФК. Кроме того, он участвует в транспорте аминокислот, обмене дисульфидов и поддержании SH-групп белков в восстановленном состоянии. Данный метаболит синтезируется в печени, откуда транспортируется в различные органы и ткани, обеспечивая восстановление дисульфидных групп белков, дигидроаскорбиновой кислоты, с участием Г-S-T, образуя конъюгаты в печени с электрофильными соединениями с последующим выведением их с мочой [389]. Эффективность образования восстановленного глутатиона в реакции, катализируемой ГР, находится в зависимости от содержания NADPH. Считают, что основным поставщиком восстановительных эквивалентов в форме NADPH для ГР-реакции служит пентозофосфатный путь, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ, которая катализирует реакцию превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон [134, 474]. Кроме того, альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая НАДФ-ИДГ, в ходе которой происходит окислительное декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата [135]. НАДФ-специфичная форма фермента имеет универсальное распространение в тканях, наибольшая ферментативная активность выявлена в печени, скелетной мускулатуре, сердце. Повышенная



активность ИДГ может служить показателем поражения паренхимы печени. Определяемая в сыворотке активность фермента обусловлена, в основном, его цитоплазматической НАДФ-специфичной формой. Восстановленный глутатион также участвует в транспорте аминокислот и обмене дисульфидов [502].

Особенности работы АОС в различных тканях определяются генотипом, а также зависят от действия факторов, индуцирующих свободнорадикальные процессы, обеспеченности биоантиоксидантами.

В результате длительной, а также часто повторяющейся интенсификации свободнорадикальных процессов происходит истощение АОС. Антиоксидантные комплексы восстанавливают фонд антиоксидантов в организме, активно расходуемых при патологии [20, 46, 237].

Проблемой, сопряженной с действием всех антиоксидантов, является тот факт, что они окисляются и теряют свою активность в процессе взаимодействия со свободными радикалами. В этой связи следует подчеркнуть, что антиоксиданты часто работают парами или даже группами, в которых различные вещества с антиоксидантной активностью поддерживают и восстанавливают друг друга.

### **1.7. Роль свободнорадикального окисления в развитии диффузных заболеваний печени**

Согласно ряду литературных данных, в основе развития воспалительных процессов и повреждения клеток печени при гепатитах различной этиологии лежат универсальные механизмы, включающие чрезмерное образование свободных радикалов и реактивных метаболитов. В повреждение гепатоцитов могут быть вовлечены супероксидный анионрадикал, перекись водорода, гидроксильный радикал, синглетный кислород, гипохлорит и другие АФК. В этом плане особо следует отметить гидроксильный радикал, обладающий способностью повреждать ДНК, что может служить фактором индуцирующим

гепатоканцерогенез [51, 136, 555, 543]. Образование АФК происходит при стимуляции клеток Купфера и секвестрации полиморфноядерных нейтрофилов. При истощении резервов АТФ или окислительном стрессе ксантиноксидаза цитозоля способна продуцировать  $O_2^{\cdot-}$ . Так, доказано, что в процессе биосинтеза лейкотриенов и простаноидов липоксигеназа и циклооксигеназа способны генерировать синглетный кислород и  $O_2^{\cdot-}$  [381]. Свободные жирные кислоты, относящиеся к высокореакционноспособным соединениям, служат субстратами ПОЛ. Следствием ПОЛ является нарушение целостности клеточных мембран, набухание митохондрий, ломкость лизосом, стимуляция коллагенообразования, образование телец Мэллори (отложений перекрестносвязанных мономеров цитокератина) [36, 97]. Следует также отметить, что в процессах, сопряженных с окислительным стрессом, и механизмах защиты от реактивных метаболитов при патологии печени может принимать участие  $NO^{\cdot}$ , образующийся в гепатоцитах, клетках Купфера и эндотелиальных клетках [264]. Оксид азота способен действовать как перехватчик АФК, но, в то же время, может усиливать негативное действие супероксиданионрадикала, приводить к формированию пероксинитритов с последующим образованием гидроксильного радикала. При реализации данного механизма  $NO^{\cdot}$  и  $H_2O_2$  проявляют свою цитотоксичность [450, 671].

Имеются данные, что активация СО имеет место на фоне острой и хронической интоксикации лекарственными препаратами и алкоголем. Особое значение в патогенезе токсического поражения печени принадлежит цитохрому P450 2E1, индуцируемого под влиянием негативных факторов. Скорость синтеза цитохрома P450 2E1 зависит от интенсивности ПОЛ. При приеме этанола усиливается способность эндотоксинов проникать через кишечную стенку в кровотоки. В печени эндотоксины стимулируют купферовские клетки, высвобождающие цитокины. В клетках Купфера, при употреблении этанола, содержание цитохрома P450 2E1 повышается в 7 раз, что дополнительно активирует высвобождение цитокинов и приводит к прогрессированию гепатита

[382]. Возрастание потребления  $O_2$  гепатоцитами сопряжено с чрезмерным генерированием АФК и интенсификацией ПОЛ. При этом происходит истощение многих компонентов АОС клеток печени, снижается степень репарации ДНК [55]. Повреждение гепатоцитов происходит также под действием высоких концентраций лекарственных препаратов, которые могут быть токсичными в нативной форме или же становиться таковыми в результате биотрансформации. Часто лекарственные препараты оказывают прямое токсическое влияние на гепатоциты, нарушая работу детоксикационной системы и ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. В ходе детоксикации ксенобиотиков реализуются реакции, сопряженные с введением полярных групп с участием цитохром Р450-гидроксилазной системы и конъюгацией молекул с водорастворимыми метаболитами [569]. При биотрансформации лекарственных веществ имеет место активация микросомальных цитохром-Р-450 систем, что часто сопряжено с образованием активных метаболитов, в том числе с формированием АФК. Таким образом, инициация образования АФК в митохондриях является важным процессом, приводящим к некротическим процессам в гепатоцитах. Активные кислородные метаболиты значительно повышают риск повреждения клеток печени и нарушения ее функционирования. Они оказывают негативное воздействие на мембраны клеток, митохондрии, вызывая, в конечном итоге, гибель гепатоцитов [482; 666].

Согласно данным, полученным при проведении исследований на животных, на фоне экспериментального воспроизведения токсического гепатита происходит интенсификация СО. Так, при введении животным  $CCl_4$  происходит активация ПОЛ под действием метаболитов – радикалов повреждающего агента [201, 203]. При этом наряду с возрастанием активности аминотрансфераз имеет место падение активности АсГ, повышение активности НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ [189, 190]. Наблюдающееся на фоне этого возрастание активностей ГП, ГР, каталазы и СОД можно оценивать как адаптивную реакцию АОС на чрезмерное образование АФК. Поражение печени в эксперименте с использованием сульфата гидразина также

сопровождалось усилением свободнорадикальных процессов, сопряженных с окислительной модификацией белков, а также с возрастанием активности Г6ФДГ, поставляющей NADPH для ГП-ГР – системы [225].

Имеются данные и об изменении активности ферментов аминокислотного обмена при интенсификации СО. Так, выявлено повышение активности тирозинаминотрансферазы печени, участвующей в катаболизме тирозина и включении данной аминокислоты в процессы глюконеогенеза при окислительном стрессе, индуцированном введением экспериментальным животным хлоридов ртути или кобальта. Установлено, что возрастание ферментативной активности происходило как путем индукции синтеза фермента, так и за счет торможения деградации апофермента [168, 186].

Таким образом, на основе анализа данных литературы, можно сделать предположение, что токсическое поражение печени сопровождается изменениями функционирования АОС организма, а также некоторых ферментов ряда метаболических путей под действием избыточной генерации свободных радикалов.

### **1.8. Роль апоптоза в развитии патологических процессов**

Апоптоз – это гибель клеток путем самоликвидации, происходящая в нормальных и патологически измененных тканях. В переводе с греческого, этот термин означает «опадение» (листьев с деревьев, лепестков с цветов; греч. apo – отделение + ptosis – падение). Синонимами термина «апоптоз» являются «активная гибель клетки», «программированная гибель клетки». Термин «апоптоз» был предложен Дж. Керром с соавторами в 1972 году для обозначения активного процесса разрушения клетки, характеризующегося специфическими морфологическими изменениями.

Апоптоз универсально распространенное явление в мире многоклеточных организмов, ему подвержены все виды тканей. Он составляет основу таких важнейших процессов как позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов,

гибель лимфоцитов, индуцированная глюкокортикоидами, интерфазная гибель тимоцитов при облучении, гибель при дефиците ростовых факторов [246]. Апоптоз необходим для формирования и функционирования иммунной системы, развития нервной системы [241]. Реализация апоптоза обеспечивает защиту организма от вирусных инфекций, благодаря чему элиминируются клетки, пораженные вирусом. Иммунодефицит при ВИЧ-инфекции определяется нарушениями в контроле апоптоза [294, 303].

Это явление играет важную роль в развитии многих заболеваний: инфекционных, нейродегенеративных, онкологических и других.

Сигнальные пути передачи апоптотического сигнала другим программам жизнедеятельности клеток часто переплетаются между собой, создавая сложную картину внутри- и межклеточных взаимодействий, составляющих основу регуляции клеточного роста, дифференцировки и гибели клеток.

Апоптоз необходим для удаления из организма клеток, утративших свои функции. При этом не развивается воспаление и не нарушается нормальное функционирование соседних клеток, а также не происходит соединительнотканного замещения, что позволяет сохранить структуру органа. Функциональные элементы апоптотической клетки не разрушаются, а поглощаются другими клетками. Особонно значительную роль апоптоз имеет в ходе эмбриогенеза в связи с необходимостью элиминирования клеток, выполнивших свою функцию. Следует отметить, что уничтожение таких клеток путем фагоцитирования с развитием реакции воспаления могло бы нарушить созревание плода. В качестве примера значимости апоптоза в онтогенезе высших позвоночных животных на стадии эмбриогенеза могут служить образование первичной полости в бластуле, гибель невостребованных клеток при развитии периферической нервной системы, разделение пальцев, сопровождающееся отмиранием межпальцевых перепонки, формирование различных органов [273, 554, 583, 631, 654]. Примером проявления программируемой клеточной смерти у низших позвоночных являются утрата хвоста зародышами амфибий или атрофия

у них гипохорды, у беспозвоночных — метаморфоз насекомых. Во взрослом организме апоптоз выступает как механизм регуляции тканевого гомеостаза за счет контроля количества и качества клеток. Элиминации подвергаются клетки, функции которых оказались нарушены. Причем, в первую очередь уничтожаются клетки, представляющие потенциальную угрозу для организма. Так, например, при нарушении структурно-функционального состояния ДНК, происходит включение программы клеточной смерти путем реализации различных механизмов, один из которых зависит от белка p53. Путь апоптоза, зависящий от данного белка, может выступать как противораковый механизм, противодействующий размножению клеток с дефектной ДНК, что обеспечивает предотвращение появления мутантных клеток [653]. Клетки, которые вышли из сферы межклеточного взаимодействия также подвергаются апоптозу.

Существует мнение, что старение организма может быть следствием активации группы генов апоптоза и постепенной убыли функционально активных клеток. Старение многих типов клеток ассоциировано с изменением их чувствительности к апоптозу. Так, с возрастом происходит повышение чувствительности к индукции апоптоза в таких клетках как гепатоциты, Т-клетки, ооциты, мегакариоциты, макрофаги, хондроциты, эндотелиоциты, нейроны, кардиомиоциты. В стареющих кардиомиоцитах накапливаются ионы  $Ca^{2+}$  и повышается активность ДНКазы I. Кальций активирует апоптоз, зависящий от ДНКазы I, что сопровождается межнуклеосомным расщеплением ДНК. Раннее старение, вызванное окислительным стрессом, коррелирует с увеличением образования ДНК-фрагментов в мозге мышей, что является свидетельством повышения чувствительности к апоптозу по сравнению с молодыми животными. В то же время показано, что чувствительность к апоптозу для кератиноцитов не изменяется, а для фибробластов даже снижается [241].

Таким образом, основными физиологическими функциями программируемой клеточной смерти являются: 1) обеспечение программы

индивидуального развития организма (онтогенеза) и дифференцировки клеток, 2) поддержание тканевого гомеостаза, 3) защита от патогенов.

В развитии апоптоза можно выделить 3 стадии: индукторную, эффекторную и стадию деградации. Две последние едины для всех разновидностей апоптоза, тогда как первая стадия проявляется весьма разнообразно в зависимости от типа клеток и индукторных факторов. Апоптоз могут вызывать как внутриклеточные сигналы, так и внешние, опосредующие свое действие через рецепторные системы [207].

Круг причин, вызывающих включение программы апоптоза, широк, но условно их можно разбить на две группы:

- 1) «неудовлетворительное» состояние самой клетки (развивается «апоптоз изнутри»);
- 2) «негативная» сигнализация снаружи, поступающая в клетку через рецепторы («апоптоз по команде»)

Различные эндо- и экзогенные факторы, воздействующие на клетки, могут модифицировать структуру ДНК. Может происходить окисление, алкилирование азотистых оснований, одно- и двухцепочечные разрывы нитей ДНК, поперечные сшивки и образование комплексов ДНК с низкомолекулярными соединениями (в частности, с противоопухолевыми препаратами). Нарушения структуры ДНК вызывают запуск процессов, составляющих ответ клетки на генотоксическое воздействие. В принципе повреждения могут быть устранены и процессы переноса генетической информации восстановлены, соответственно жизнеспособность клетки сохранена. Но при неэффективности программы репарации активируются программы гибели клетки – апоптоз [11]. В молекулярном плане апоптоз представляет собой многоэтапный (каскадный) процесс, который начинается с приема определенного сигнала с помощью специфических рецепторов, передачи его молекулам-посредникам (адаптерам, мессенджерам), в большинстве случаев, активирующих литические ферменты (протеазы, нуклеазы и др.), и заканчивается деструкцией клеточных молекул и

структур под их действием [346]. При передаче сигнала извне он воспринимается рецептором и передается молекулам – посредникам; в результате развивается «апоптоз по команде». «Апоптоз изнутри» развивается при повреждениях клетки, сопряженных с нарушениями структуры ДНК.

Существуют два важнейших пути передачи сигнала от поврежденного генетического аппарата к другим внутриклеточным структурам: в первом, ведущими факторами являются белки АТМ р53; во втором – белки ядрышек. Белок АТМ (белок, мутированный при атаксии-телеангиэктазии) – протенкиназа, один из наиболее ранних сенсоров двунитевых разрывов ДНК. АТМ, фосфорилирует транскрипционный фактор р53 и таким образом активирует многочисленные р53-зависимые процессы. Основная роль р53 состоит в индукции экспрессии генов, продукты которых стимулируют гибель, а также в репрессии антиапоптозных генов. Это оказывается возможным благодаря посттрансляционным модификациям, активирующим транскрипционную функцию р53, например, АТМ-зависимому фосфорилированию. Таким образом, р53 приобретает функциональную активность при нарушении целостности ДНК и оказывается способным регулировать экспрессию генов, кодирующих интегральные белки митохондрий и белки, взаимодействующие с митохондриями при апоптозе. Наряду с активацией р53, при повреждении ДНК клетки включаются и р53-независимые механизмы, в частности, сегрегация ядрышек и высвобождение ядрышковых белков-шаперонов. Эти шапероны взаимодействуют с цитозольными белками, способствуя их перемещению в митохондрии. Так, ядрышковый белок нуклеофосмин может связываться с С-концевым участком проапоптотического белка Вах, что вызывает его конформационные изменения и последующую транслокацию этого белка в митохондрии. В конечном итоге активируются ферменты, называемые каспазами [11].

В настоящее время идентифицированы четыре основные функциональные группы молекул, вовлеченные в процесс апоптоза: протеолитические ферменты (каспазы); адаптерные белки, контролирующие активацию каспаз; белки



суперсемейства рецепторов факторов некроза опухолей (TNF) и белки-регуляторы, подавляющие или, напротив, стимулирующие разрушительное воздействие каспаз первого эшелона [390].

Каспазы — группа эволюционно консервативных цистеиновых протеиназ, расщепляющих белки после остатков аспарагиновой кислоты (Asp). У млекопитающих идентифицировано 14 каспаз: каспаза-1, каспаза-2 и т.д. (в хронологическом порядке открытия этих каспаз). Они распознают определенные тетрапептидные блоки (мотивы) в полипептидных цепях белков и расщепляют пептидную связь, образованную карбоксильной группой остатка Asp. Каспаза (от англ. *caspase*), где буква *c* соответствует цистеину (*cysteine*), корень *asp* — аспартату (*aspartate*), *ase* — суффиксу в названиях ферментов. Общей отличительной чертой каспаз, именно благодаря которой они получили свое название, является наличие аминокислотного остатка цистеина в активном центре фермента и специфическое расщепление полипептидной цепи после остатка аспарагиновой кислоты. Каспазы синтезируются в виде проферментов с очень низкой активностью. Наряду с апоптозными имеются каспазы, которые активируют цитокины, участвующие в воспалительных процессах, — низкомолекулярные белки, посредники межклеточных взаимодействий (интерлейкины,  $\gamma$ -интерферон) [141, 368, 473, 652].

Принято выделять два подсемейства каспаз. CED-3 (непосредственно участвуют в апоптозе) и ICE (обеспечивают процессинг провоспалительных цитокинов). Однако следует отметить, что, хотя каспаза-1 и подобные ей по структуре каспаза-4, -5 и -13 отнесены в группу каспаз, участвующих в процессинге цитокинов, нельзя исключить их участие в апоптотической гибели клеток [11]. В подсемействе CED-3 в зависимости от субстратной специфичности каспазы разделяют на иницирующие и эффекторные или соответственно каспазы первого и второго эшелонов. Стимуляция неактивных иницирующих каспаз - прокаспаз, происходит с помощью белков-адаптеров. В структуре прокаспаз (молекулярная масса до 50 кДа) можно выделить три участка: N-концевой участок

или, так называемый, продомен, промежуточный домен (предшественник большой субъединицы (20 кДа)) и С-концевой домен (предшественник малой субъединицы (10 кДа) зрелого функционально активного фермента). Продомены инициирующих прокаспаз ответственны за взаимодействие с белками-адаптерами, что сопровождается активацией каспазы, заключающемся в протеолитическом элиминировании продомена, разрыве связи между большой и малой субъединицами и последующей сборке из них гетеродимера. При связывании двух гетеродимеров друг с другом образуется тетрамер — активная форма каспазы, обладающая двумя идентичными каталитическими центрами [297, 435, 652].

Функция продоменов эффекторных прокаспаз заключается в ингибировании активации прокаспаз. Существуют белки (их обозначают IAP), блокирующие отщепление продомена эффекторных прокаспаз и таким образом подавляющие их стимуляцию, что способствует предотвращению развития апоптоза. Следует подчеркнуть, что на стадии активации эффекторных каспаз гибель клетки становится неизбежной [321, 453, 473, 478].

Субстраты каспаз первого эшелона (к ним относятся каспазы-2, -8, -9, -10 и -12) — латентные формы каспаз второго эшелона — прокаспазы-3, -6, и -7. Субстратами эффекторных каспаз являются свыше 60 различных белков, среди которых выделяют: ингибитор ДНКазы – CAD (caspase-activatedDNase — ДНКаза, активируемая каспазой), ответственной за фрагментацию ДНК; белки, участвующие в репарации ДНК, сплайсинге мРНК, репликации ДНК; белки цитоскелета: ламины (структурные белки, выстилающие изнутри поверхность внутренней ядерной мембраны), актин, фодрин, кератины, а также фермент гельдолин, катализирующий деполимеризацию актина; белки - регуляторы клеточного деления; антиапоптозные белки семейства Bcl-2, проапоптозный белок Bid, белки IAP; белки, участвующие в межклеточной сигнализации, ядерные факторы транскрипции и т.д. Таким образом, разрушение структурных и

функциональных белков клетки и активация нуклеаз в результате функционирования каспазного каскада приводят к гибели клетки [258].

Ведущим проявлением апоптоза является деградация хроматина в результате ферментативного расщепления ДНК. Данный процесс происходит поэтапно. Сначала образуются фрагменты, включающие 700, 200-250, 50-70 тыс. пар оснований, затем – фрагменты, содержащие 30-50 тыс. пар оснований. На последней стадии наблюдается конденсация хроматина, инвагинации ядерной мембраны и процесс становится необратимым. Очередным этапом деградации, который обычно используют как маркер апоптоза, является межнуклеосомная дезинтеграция ДНК, т. е. разрывы нитей ДНК, находящихся между нуклеосомами. Это приводит к образованию фрагментов, кратных по величине 180-190 пар оснований, что соответствует протяженности цепи ДНК в пределах нуклеосомы. Такая деградация, как правило, завершается в течение суток. Однако процесс расщепления может ограничиться образованием и более крупных фрагментов [635]. На степень деградации хроматина при апоптозе может влиять ряд факторов: температура, источники энергии, интенсивность синтеза РНК и белка *denovo*. На различных этапах деградации ДНК функционируют разные формы эндонуклеаз, которые отличаются субстратной специфичностью и регуляторными свойствами. Следует отметить, что, несмотря на ключевую роль деградации ДНК в реализации апоптоза, эти процессы не считаются равнозначными. Во-первых, морфологические и физиолого-биохимические модификации в клеточных мембранах и цитоплазме, которые являются характерными для апоптоза (снижение трансмембранного потенциала митохондрий, накопление активных форм кислорода и т. д.), могут иметь место в энуклеированных клетках, т. е. тогда, когда деградация хроматина не возможна в связи с его отсутствием. Во-вторых, причиной смерти клетки при апоптозе служат не деградация ДНК и прекращение функционирования генов. Считают, что основной причиной гибели клетки является энергетический голод, вызванный расходом АТФ на репарацию поврежденной ДНК [478].

В настоящее время очевидно, что апоптоз сопряжен с продуцированием АФК, и токсичные формы кислорода способны прямо или опосредованно воздействовать на процесс программируемой клеточной смерти. Переносчики ЭТЦ при определенных условиях способны генерировать АФК, что приводит к изменению проницаемости мембраны, образованию пор и т.д. В результате данных процессов происходит набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной митохондриальной мембраны и выход растворимых белков межмембранного пространства в цитоплазму. Среди этих белков присутствует ряд апоптозных факторов: цитохром с, прокаспазы-2, -3, -9, белок AIF (apoptosis inducing factor - фактор, вызывающий апоптоз). Прокаспаза-3 присутствует как в межмембранном пространстве митохондрий, так и в цитоплазме. В активации каспазы-9 принимает участие цитохром с, высвобождающийся из митохондрий, совместно с фактором APAF-1 (apoptosis protease activating factor-1 — фактор-1, активирующий апоптозную протеазу), локализованным в цитоплазме клетки [390, 476, 638, 648].

Другой важнейший путь программируемой клеточной гибели – апоптоз, включаемый митохондриальными белками. Следует подчеркнуть, что в настоящее время митохондрии рассматриваются как ведущее звено в реализации запрограммированной смерти клетки. Эта ключевая роль митохондрий в контроле апоптоза связана не с утратой их функции, а с активным участием в регуляции механизмов апоптоза. Весьма широкий круг ключевых событий программируемой гибели клетки взаимосвязан с митохондриями: высвобождение активаторов каспаз (например, цитохрома с); изменение транспорта электронов; снижение митохондриального трансмембранного потенциала; дефицит энергоснабжения; участие белков про- и антиапоптотического семейства Bcl-2 [322].

Митохондриальный путь апоптоза Bcl-2-зависим. Основная функция белков семейства Bcl-2 – регуляция проницаемости митохондриальной мембраны, т.е., контроль высвобождения апоптозных факторов из внутреннего пространства

митохондрий в цитоплазму. Это семейство включает более 20 белков. Когда клетки подвергнуты действию индукторов апоптоза, проапоптозные Bcl-2- белки активируются путем посттрансляционной модификации или за счет изменения конформации. В результате активации p53 индуцируется экспрессия генов проапоптозных белков и подавляется экспрессия антиапоптозных. Главным местом действия проапоптозных белков Bcl-2 являются митохондрии, где эти белки индуцируют высвобождение других проапоптозных белков, включая цитохром с, из межмембранного пространства. Как было отмечено выше, цитохром с вместе с фактором АРАФ-1 обеспечивает активацию каспазы-9. Данный цитоплазматический фактор представляет собой белок с молекулярной массой 130 кДа, содержащий так называемый CARD-домен (caspase recruitment domain — домен рекрутирования каспазы) на N-конце. На С-конце АРАФ-1 имеется 12 повторяющихся WD-40-последовательностей (WD – дипептид из триптофана и аспартата, терминирующий последовательность из 40 остатков аминокислот). Такие WD-повторяющиеся последовательности характерны для белков, участвующих в регуляции деления и дифференцировки эукариотных клеток, транскрипции генов[287]. АРАФ-1 играет роль арматуры, из которой происходит активация каспазы-9. За счет электростатических взаимодействий он связывает две молекулы цитохрома с. Затем происходит олигомеризация комплексов АРАФ-1 – цитохром с, что сопровождается гидролизом дезоксиАТФ. В результате образуется апоптосома. Формирование апоптосомы включает, помимо связывания белком АРАФ-1 двух молекул цитохрома с, дальнейшую олигомеризацию 8 субъединиц АРАФ-1. Молекулярная масса апоптосомы составляет более 1300 кДа. С АРАФ-1, входящем в состав апоптосомы, в эквимолярном соотношении связывается прокаспаза-9, что обеспечивает реализацию межмолекулярного протеолитического процессинга прокаспазы-9 с образованием активной каспазы-9. Вместе с тем, при связывании прокаспазы-9 с апоптосомой, данная протеаза изменяет свою конформацию, что сопровождается

самоактивацией в результате внутримолекулярного процессинга. Каспаза-9 затем путем протеолитического расщепления активирует прокаспазу-3 [296].

Примером другого белка, участвующего в инициации апоптотических процессов может служить белок межмембранного пространства митохондрий – AIF. Этот флавопротеин, высвобождаясь в цитоплазму, транслоцируется в ядро клетки и обеспечивает стимуляцию нуклеазы, которая расщепляет ядерную ДНК на фрагменты длиной 50 т. п. нуклеотидов и более. Следует отметить, что апоптоз, индуцированный AIF, осуществляется без участия каспаз [635]. Другой проапоптотический белок митохондрий — SMAC (second mitochondrial apoptosis activating factor, в переводе на русский язык— второй митохондриальный фактор, активирующий апоптоз) активирует каспазы-3 и -9, связываясь со специфическими белками и снимая их ингибирующий эффект на каспазы [652].

Таким образом, массовое разрушение митохондрий в клетке (митоптоз) за счет избыточной генерации АФК, сопровождающееся высвобождением ряда белков межмембранного пространства, приводит к апоптозу клетки. В результате из ткани удаляются клетки, митохондрии которых образуют слишком много АФК. Наряду с АФК образование гигантской поры в наружной мембране митохондрий могут вызвать стрессорные воздействия, вызванные цитотоксическими соединениями, дефицит ростовых факторов и нарушение структуры ДНК. Необходимо отметить, что дисфункция митохондрий сама по себе может вызвать гибель клетки, если эта клетка поддерживает свою энергетику за счет дыхания. Однако, апоптоз, вызываемый смертоносными белками межмембранного пространства, активируется гораздо раньше, чем происходит истощение внутриклеточного АТФ. Более того, дезоксиАТФ, находящийся в равновесии с АТФ, необходим для действия апоптосом. АТФ нужен также для работы протеинкиназ, которые участвуют в ряде типов апоптоза [572,592].

Таким образом, апоптоз является результатом действия отдельной функциональной системы, включающей в себя гены-индукторы апоптоза (гены "клеточной смерти"), с реализацией через цитотоксические сигналы,

цитотоксические рецепторы при сохранности специфических клеточных протеаз. При этом реализуется следующий механизм гибели клетки: 1) поступление индукторного сигнала; 2) активация каспазного каскада, определенных генов и синтез специфических протеаз; 3) разрушение цитоскелета; 4) формирование и отпочковывание везикул, окруженных мембраной; 5) фрагментация ДНК, затем сморщивание ядра; 6) поглощение везикул и остатков клетки соседними клетками и тканевыми макрофагами без развития воспаления и соединительнотканного замещения.

Исследования последних лет свидетельствуют, что патогенез многих болезней человека связан с неспособностью клеток контролировать механизмы апоптоза. Усиление или торможение апоптотической гибели клеток по сравнению с нормальным физиологическим уровнем может приводить к развитию патологических состояний. Так, подавление апоптоза может быть сопряжено с онкологическими и аутоиммунными заболеваниями. Существует предположение, что ключевым событием, приводящим к образованию злокачественных опухолей, особенно гематогенного происхождения, выступают мутации гена p53. Белок p53 трансформирует сигнал о наличии нерепарированных разрывов нитей ДНК в сигнал к инициации программируемой клеточной смерти. Это обеспечивает элиминацию клеток с поврежденным генетическим аппаратом. Если в норме фактор p53 не выявляется, то при наличии злокачественных опухолей экспрессию его мутантной формы могут осуществлять до 70% трансформированных клеток [253]. Некоторые вирусные инфекции могут сопровождаться длительным поддержанием инфекционного возбудителя в организме за счет того, что эти вирусы способны предотвращать программируемую клеточную гибель с помощью содержащихся в них ингибиторов каспаз или гомологов апоптотического белка Bcl-2 [230,621].

Интенсификация апоптотических процессов может сопровождаться развитием патологических состояний печени. Так, усиленная экспрессия фактора Fas при вирусном гепатите приводит к гибели гепатоцитов в результате действия

цитотоксических Т-лимфоцитов. Один из путей индукции апоптоза в гепатоцитах взаимосвязан с выделением из Т-клеток белка перфорина, образующего поры в плазматических мембранах гепатоцитов. Через эти поры в гепатоциты проникают гранзимы, катализирующие протеолитическое расщепление ряда ферментов, включая каспазы, что приводит запуску апоптозных каскадных процессов [219, 417]. На изолированных гепатоцитах было продемонстрировано, что повреждающий эффект этанола взаимосвязан с возрастанием активности проапоптотических факторов, и в особенности, с цитотоксическим действием фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ТНФ $\alpha$ ) [358]. Присутствие алкоголя приводит к окислительному повреждению и ТНФ $\alpha$  – опосредуемой гибели гепатоцитов [302]. Ранее нами было показано, что введение экспериментальным животным ТНФ $\alpha$  приводит к значительному возрастанию интенсивности СО биомолекул [202].

Введение алкоголя также усиливает апоптоз за счет возрастания экспрессии белка Fas в гепатоцитах [413]. Это имеет важнейшее значение в формировании апоптосомы и активации каспазного каскада. Мониторинг протеазной активности со специфическими флуоресцентными субстратами для каспазы-1 и каспазы-3 показал, что во время Fas-опосредованного апоптоза активности данных протеаз возрастают. Последовательная активация каспазы - 1 и каспазы -3 подобных протеаз при передаче сигнала во время Fas-опосредованного апоптоза была подтверждена с помощью ингибиторного анализа [615].

В настоящее время доказана прямая связь между нарушениями регуляции апоптоза и заболеваниями иммунной системы. При системной красной волчанке, ревматоидном артрите в сыворотке крови часто обнаруживаются растворимые формы белка sFas, что связано с индукцией апоптоза, достаточной для развития системного аутоиммунного процесса [241].

Апоптоз лимфоцитов рассматривается как один из механизмов специфической иммунотерапии atopических заболеваний, таких как бронхиальная астма. При этом под влиянием терапии вначале наблюдается



активация иммунной системы с повышением выработки Ig E, после чего запускается процесс апоптоза лимфоцитов и снижение выработки Ig E.

Усиление программируемой клеточной смерти характерно для нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), ишемических повреждений (инсульт, инфаркт миокарда, реперфузионные осложнения), ряда заболеваний крови, синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) и ряда других заболеваний [230, 309, 479, 621, 622, 657, 669].

Многообещающий подход к лечению инфаркта и инсульта состоит в блокировании апоптоза тотчас после события. Уже показано весьма благоприятное терапевтическое действие на экспериментальных животных пептидных ингибиторов апоптоза на уровне каспаз при инфаркте и инсульте [308, 309, 362, 462], а также травматическом повреждении мозга [669]. Данные ингибиторы прерывают передачу апоптозного сигнала на средних или конечных ее стадиях. Есть ряд наблюдений, что подобный эффект имеет блокада возникновения сигнала к самоубийству клеток, т.е. на стадии активации рецепторов плазматической мембраны [3, 230, 298, 314, 652].

Апоптоз не является обязательной составляющей воспалительной реакции. Хотя для воспаления характерно повреждение тканей, гибель клеток при этом происходит преимущественно по механизму некроза и сопровождается выходом содержимого клеток в межклеточное пространство, что может стать причиной гибели соседних клеток. Однако на завершающих этапах воспаления апоптозу принадлежит важная роль, так как в этот период происходит устранение активированных клеток иммунной системы, выполнивших свои функции.

### **1.9. Антиоксидантные препараты, применяемые при диффузных заболеваниях печени**

Имеется достаточно большое число экспериментальных исследований, свидетельствующих о наличии взаимосвязи между степенью выраженности патологических изменений печени и уровнем антиоксидантов в организме животных. Вместе с тем, многие вопросы, касающиеся применения антиоксидантной терапии в клинической практике, остаются во многом неясными и носят часто дискуссионный характер. Исследования в данной сфере осложнены тем, что препараты, обладающие антиоксидантным потенциалом, должны применяться как составная часть схемы лечения. Тем не менее, в клинической практике при лечении патологии печени используется ряд препаратов, обладающих прямым или косвенным антиоксидантным действием. К таким препаратам относится адеметионин. Функциями адеметионина в организме являются защита клеток печени и нервной системы. При заболеваниях печени концентрация адеметионина в тканях снижается параллельно с развитием болезни. Препарат гептрал восполняет недостаток эндогенного адеметионина, а также стимулирует его образование в организме. Он обладает гепатопротективным и антидепрессивным действием. Также адеметионин обладает детоксикационными и регенерирующими свойствами. Адеметионин может участвовать в реакциях трансметилирования, трансаминирования, транссульфурирования и аминопропилирования. Молекула адеметионина служит донором метильной группы в ходе реакций метилирования фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран, а также белков и гормонов. Участвуя в реакциях транссульфатирования, адеметионин выступает в качестве предшественника цистеина, глутатиона, обеспечивая окислительно-восстановительный механизм клеточной детоксикации, а также ацетилирования коэнзима Q, способного проявлять антиоксидантные свойства. Адеметионин служит также предшественником полиаминов, в частности, путресцина, который может стимулировать регенеративные процессы, пролиферацию гепатоцитов, [491, 609, 651].

При лечении патологических состояний печени используют препараты эссенциальных фосфолипидов, которые представляют собой высокоочищенную фракцию фосфатидилхолина. Главным компонентом эссенциальных фосфолипидов из данной фракции является 1,2-дифосфатидилхолин. Фосфолипиды обладают амфифильными свойствами, за счет которых они способны регулировать проницаемость клеточной мембраны гепатоцитов. Молекулы эссенциальных фосфолипидов встраиваются непосредственно в структуру поврежденных гепатоцитов, обеспечивая устранение дефектов и восстановление барьерной функции мембран, благоприятно влияют на ионный обмен, действие митохондриальных ферментов, процесс окислительного фосфорилирования, за счет чего способны воздействовать на энергетический обмен клеток. Эссенциальные фосфолипиды способствуют снижению доступа кислорода в гепатоциты и тем самым уменьшению интенсивности ПОЛ и образования свободных радикалов. Благодаря своим фармакологическим свойствам эссенциальные фосфолипиды способствуют регенерации мембран, обеспечивают реактивацию мембраносвязанных ферментных систем и рецепторов, подавляют окислительный стресс, повышают детоксикационную способность печени и нормализуют ее функцию. Важным эффектом их действия является усиление регенерации клеток печени и уменьшение образования соединительной ткани [85, 286, 585].

В качестве гепатопротектора часто используется карсил. Активной частью карсила, входящей в его состав, является силимарин. Он действует как стабилизатор мембран клеток, что предотвращает негативное влияние различных факторов на печень, а также способствует регенерации поврежденных гепатоцитов. Силимарин, содержащийся в семенах расторопши, представляет собой смесь четырех флавонолигнанов: силибина, силикристина, силидианина и изосилибина. Механизм действия препарата еще не выяснен окончательно. Известно, что силимарин обладает противотоксическим действием за счет конкурирующих связей с рецепторами токсинов в мембране гепатоцитов,

угнетения метаболической активации метаболитов токсических веществ и способности нейтрализовывать свободные радикалы и этим самым подавлять оксидативный стресс. За счет этого карсил улучшает функциональность клеточных структур гепатоцитов и стабилизирует биомембраны. В результате реализуются специфические профилактический и лечебный эффекты на печень, стимуляция клеточного метаболизма. Действие флавоноидов (к которым относится силимарин) связано также с угнетением активности липоксигеназы и простагландинсинтазы и ингибированием ядерного фактора NF-κB, что обеспечивает противовоспалительный эффект [272, 279, 443].

В качестве антиоксидантов в терапии могут выступать α-токоферол и желчные кислоты. Установлено, что такая желчная кислота, как урсодезоксихолиевая, препятствует развитию ПОЛ и стеатоза печени, индуцированного этанолом [40, 659]. Препараты урсодезоксихолевой кислоты стимулируют экзоцитоз в гепатоцитах путем активации Ca-зависимой α-протеинкиназы, что ведет к уменьшению концентрации гидрофобных желчных кислот, обладают антиапоптотическим эффектом за счет предотвращения выхода цитохрома C из митохондрий, что в свою очередь блокирует активацию каспаз и апоптоз гепатоцитов, а также снижают оксидативную активацию Купферовских клеток гидрофобными желчными кислотами [195,259]. На фоне применения препаратов урсодезоксихолевой кислоты у пациентов с токсическим гепатитом отмечено улучшение клинико-биохимических и гисто-морфологических признаков заболевания [41]. Это, вероятно, связано не только с ее цитопротекторным, антихолестатическим, антиапоптотическим эффектами, но и с подавлением секреции провоспалительных цитокинов.

### **1.10. Мелатонин: функции и свойства**

Мелатонин – основной гормон эпифиза, ключевая роль которого в организме определяется тем обстоятельством, что ритмам его продукции подчинены все эндогенные ритмы организма. Мелатонин также продуцируется у

человека сетчатой оболочкой глаза, клетками диффузной эндокринной системы пищеварительного тракта (хромаффинными клетками печени), тимусом, иммунными клетками, легкими и др. [188, 214]. Выявлено, что многие клетки различных типов имеют способность поглощать предшественники моноаминов ( $\alpha$ -гидроксифенилаланин и 5-гидрокситриптофан), которые далее подвергаются декарбоксилированию и используются в синтезе биогенных аминов. Дифференцированные клетки этой системы называются апудоцитами. Мелатонин был идентифицирован в энтерохромаффинных клетках с помощью иммуногистохимического метода с применением антител к мелатонину и его ближайшим предшественникам: серотонину, N-ацетилсеротонину и мексамину. Следует также отметить, что ключевой фермент биосинтеза мелатонина – оксииндол-O-метилтрансфераза, присутствует в кишечнике, что свидетельствует о наличии процессов синтеза мелатонина, а не просто о его пассивной аккумуляции [183, 466]. Действие экстрапинеального мелатонина, как правило, ауто – и/или паракринно. Согласно современным представлениям, для мелатонина характерны полифункциональное разнообразие и активная задействованность в регуляции важнейших физиолого-биохимических процессов [161].

Предшественником мелатонина служит серотонин. Содержание данного гормона в ткани, наряду с активностью оксииндол-O- метилтрансферазы, служит показателем функционирования эпифиза. В качестве субстратов метилирования в эпифизе могут выступать как серотонин, N-ацетилсеротонин, так и 5-оксииндолы. Однако N-ацетилсеротонин обладает более предпочтительной химической структурой, а, следовательно, и субстратом для данной реакции. У взрослого человека за сутки синтезируется около 30 мкг мелатонина, а его концентрация в сыворотке крови ночью в 30 раз больше, чем днем, причем пик активности приходится на 2 ч ночи. Как и другие эндокринные железы, эпифиз выделяет гормоны в кровь. Однако мелатонин обнаружен также в моче, слюне, цереброспинальной и амниотической жидкостях. Большая часть мелатонина

плазмы (около 70%) связана с альбумином [571]. Мелатонин транспортируется сывороточным альбумином, после чего он связывается со специфическими рецепторами на мембране клеток-мишеней, затем проникает в ядро и там осуществляет свое действие. Попадая в печень мелатонин подвергается гидролизу и экскретируется с мочой. Основным метаболитом является 6-гидроксимелатонин-сульфат, содержание которого позволяет косвенно судить о продукции мелатонина эпифизом [161].

Мелатонин обладает уникальными антиоксидантными свойствами, определяющими его протективные возможности при свободнорадикальном повреждении ДНК, белков и липидов. Важно подчеркнуть, что в связи с небольшим размером молекулы данного гормона, способной проникать через плазматическую мембрану, а также с тем, что антиоксидантные эффекты мелатонина не опосредованы мембранными рецепторами, он может оказывать воздействие на свободнорадикальные процессы в любой клетке организма [547]. Существенное значение имеют и иммуномодулирующие свойства мелатонина, способного оказывать влияние как на сами иммунокомпетентные клетки, так и секрецию ими цитокинов [161]. Согласно имеющимся сведениям, известны следующие факты взаимодействия данного гормона и иммунной системы. Рецепторы к мелатонину обнаружены на мембранах лимфоцитов и нейтрофилов человека [458; 629], а также лейкоцитах и иммунокомпетентных клетках тимуса и селезенки [330, 628]. Считают, что в основе иммуномодулирующих эффектов мелатонина может быть несколько механизмов, среди которых - прямое воздействие через специфические рецепторы: MT1, MT2 и MT3 на функцию лимфоидных органов и клеточных элементов крови [394], а также опосредованное влияние через мобилизацию опиоидных механизмов и модификацию выработки кортикостероидов корой надпочечников [161].

### **1.10.1. Антиоксидантная активность мелатонина**

Поскольку мелатонин способен проникать во все органы и ткани, то антиоксидантная активность данного гормона проявляется повсеместно. Антиокислительное действие данного гормона связано с его способностью взаимодействовать с АФК, включая гидроксильный радикал, а также с экзогенными токсическими соединениями, обезвреживая их. Данный гормон способен активировать важнейший антиоксидантный фермент – ГП. Кроме того, мелатонин подавляет активность нитрикоксидсинтазы, стимулирующую синтез NO – радикалов. В первую очередь его антиоксидантное действие направлено на защиту ядерной и митохондриальной ДНК, а также липидов и протеинов [420].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* мелатонин был в 2 раза эффективнее по сравнению с токоферолом в отношении инактивации свободных радикалов. Было отмечено, что мелатонин, обладая высоким антиоксидантным потенциалом, не только прерывал процессы липидной пероксидации путем дезактивации АФК, но и инактивировал  $\text{OH}^\bullet$ , являющийся одним из инициаторов процесса ПОЛ [561]. Также выявлено, что метаболит мелатонина 6-гидроксимелатонин, образующийся в печени, обладает более выраженным антиоксидантным эффектом, чем сам гормон [542]. Следовательно, в организме механизмы антиоксидантной защиты от свободных радикалов основаны не только на эффектах, характерных для мелатонина, но и его метаболитов. Установлено также, что мелатонин способен тормозить активность  $\text{NO}^\bullet$  –синтазы, катализирующей образование  $\text{NO}^\bullet$  –радикалов [522]. Вместе с тем, мелатонин может воздействовать на экспрессию генов, ответственных за синтез Си, Zn-зависимой СОД, индуцируя данный фермент [520]. Таким образом, вышеуказанные эффекты мелатонина позволяют относить его к одному из наиболее мощных эндогенных антиоксидантов. Одной из отличительных черт мелатонина по сравнению с другими внутриклеточными антиоксидантами, присутствие которых обнаружено преимущественно в определенных клеточных структурах, является присутствие мелатонина во всех структурах клетки, включая ядро. Это свидетельствует об универсальном характере антиоксидантного действия мелатонина. Антиоксидантное действие

экзогенного мелатонина по отношению к СО биомолекул было продемонстрировано на человеческих лейкоцитах *in vitro* — преинкубация лимфоцитов в растворе, содержащем мелатонин, значительно уменьшала повреждающий эффект ионизирующей радиации на ДНК лимфоцитов [495]. Из результатов, полученных в экспериментальных работах, можно сделать вывод, что мелатонин и препараты, корригирующие его уровень и активность в организме (эпифамин, вальдоксан), оказывали антиоксидантное действие при токсических поражениях печени, спровоцированных четыреххлористым углеродом [189, 190, 191, 566], при заболеваниях щитовидной железы [62, 63, 64, 65, 200, 201, 204, 205, 208, 432, 433, 576, 577], экспериментальном сахарном диабете [1], ишемии мозга [642].

Таким образом, антиокислительный эффект мелатонина может быть опосредован воздействием на СО в любой клетке организма, так как его влияние не связано лишь с действием через мембранные рецепторы.

### **1.10.2. Перспективы применения мелатонина в клинической практике**

Проведение ряда клинических исследований продемонстрировало благоприятное влияние мелатонина при некоторых заболеваниях. Так, выявлено, что при приеме мелатонина на фоне традиционного лечения наблюдался терапевтический эффект у пациентов с артериальной гипертонией, ишемической болезнью сердца, постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью [88, 384, 586]. Это было обусловлено антиоксидантной активностью мелатонина, способностью данного гормона оказывать положительное воздействие на сосудистый тонус, частоту сердечных сокращений, агрегацию тромбоцитов [13, 616].

При включении мелатонина в комбинированную терапию с омепразолом у пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки наблюдалось улучшение морфологической и иммуногистохимической картины слизистой антрального отдела желудка. Лечение с мелатонином способствовало



достижению более глубокой ремиссии в те же сроки, что и на монотерапии омепразолом.

Исследования влияния мелатонина на сократительную активность миометрия матки показали, что данный гормон может вызывать уменьшение частоты сокращений при одновременном увеличении амплитуды. Было установлено, что мелатонин действует через рецепторы, находящиеся в матке. Из этого следует, что миометрий является органом-мишенью для мелатонина, и следовательно, имеются возможности его применения, а также антагонистов соответствующих рецепторов для регуляции сократительной активности матки [645].

В клинических работах было продемонстрировано, что данный гормон может проявлять антистрессовый и антидепрессивный эффекты [514]. Мелатонин стабилизирует функцию эмоциогенных структур мозга, желез внутренней секреции [162]. Это открывает возможности использования гормона с целью коррекции нарушений высшей нервной деятельности, терапии разных видов соматической патологии.

Проведен ряд клинических исследований по изучению влияния мелатонина на рост опухолевых клеток. При приеме мелатонина с тамоксифеном пациентами с метастатическим раком молочной железы была отмечена наибольшая выживаемость больных через год наблюдения, по сравнению с теми пациентами, которые получали только тамоксифен [4]. В ходе исследования влияния мелатонина на рост злокачественных опухолей молочной железы было установлено, что он препятствует пролиферации опухолевых клеток. Следует отметить, что препятствуют росту клеток опухоли только концентрации гормона в пределах физиологического диапазона [315, 316].

При ряде патологических состояний был использован эпифамин (эпиталамин). Эпифамин – препарат, полученный из шишковидной железы крупного рогатого скота, представляет собой комплекс белков и нуклеопротеидов, которые обладают избирательным действием на клетки

эпифиза. Считается, что основным эффектом эпифамина является гормон – корригирующая секреция мелатонина. В клинической практике эпифамин применяется для нормализации гормонального обмена, иммуномодуляции и регулирования системы свертывания крови, а также для поддержания функции эндокринной системы у пожилых людей. Данный препарат может применяться при лечении ряда онкологических больных, в основном, при раке молочной железы и шейки матки. Эпифамин применяют для стимуляции иммуно- и гемопоза, а также подготовки к последующему комплексному лечению. У пациентов с гормонзависимыми опухолями на фоне лучевой и химиотерапии эпифамин стимулирует кроветворение и иммунитет, что снижает риск инфекционных и других осложнений. Использование эпифамина также является весьма перспективным направлением в терапии бронхиальной астмы, сахарного диабета, сердечно-сосудистых заболеваний и патологий, сопровождающихся развитием психовегетативных расстройств [28, 130, 173, 235, 254].

Присутствие рецепторов к мелатонину на мембранах человеческих лимфоцитов и нейтрофилов, а также лейкоцитов, указывает на возможность участия мелатонина в регуляции иммунной системы организма. При активации рецепторов мелатонина возрастает степень образования в клетках Т-хелперов цитокинов, гамма-интерферона и интерлейкина-2. Данный гормон также стимулирует синтез интерлейкина-6 моноцитами человека. О тесной взаимосвязи между мелатонином и иммунной системой свидетельствует активация гамма-интерфероном продукции мелатонина эпифизом, что позволяет предполагать существование регуляторных механизмов секреции мелатонина, сопряженных с иммунной системой. Кроме того, следует отметить, что для организма человека характерны циркадные изменения количества нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов в кровотоке с максимумом в темное время суток, что также может служить косвенным подтверждением взаимосвязи мелатонина и иммунной системы [188, 233, 331, 630]. Следовательно, имеющиеся данные указывают на возможности применения мелатонина в качестве модулятора иммунной системы.

Следует отметить, что имеющиеся в литературе данные о влиянии мелатонина на секрецию и действие инсулина, а также на течение СД носят часто довольно противоречивый характер. Имеются сведения, что концентрация мелатонина и инсулина в крови меняется в противофазе. Существуют предположения, что мелатонин может замедлять выброс инсулина вне зависимости от концентрации глюкозы в крови. Обнаружена корреляция между определенным истинным уровнем глюкозы и количеством молекул одного из генетических вариантов мелатонинового рецептора MNR1B (melatonin receptor 1 beta), располагающегося на поверхности многих клеток, в том числе, на клетках островков Лангерганса, ответственных за синтез инсулина. В одной из работ было высказано предположение, что носители гена высокого риска СД2 имеют повышенную экспрессию MTNR1B в островках. Предполагается, что эти люди могут быть более чувствительными к действию мелатонина, что приводит к ослаблению секреции инсулина [658, 660].

В то же время, было установлено, что при снижении чувствительности рецепторов к мелатонину стрессы проходят с более интенсивным выделением гормонов стресса – глюко- и минералокортикоидов клетками коры надпочечников и тиреоидных гормонов клетками щитовидной железы. Это, в свою очередь, приводит к снижению чувствительности к инсулину, угнетению функции и регенерации  $\beta$  – клеток островков Лангерганса и далее – к развитию СД1 подтипа СД2 [529, 567].

Вместе с тем, выявлено, что удаление эпифиза ускоряет развитие аутоиммунного СД у мышей, тогда как введение мелатонина обращает этот эффект. Уровень мелатонина в крови у крыс и людей, больных СД2, а также уровень его синтеза в эпифизе ниже, чем у здоровых, в то же время у крыс со стрептозоциновым СД – выше, чем у контрольных здоровых особей. Существуют работы, в которых доказано, что введение мелатонина снижает уровень гликемии, С-пептида и гликозилированного гемоглобина в крови у пациентов с СД2 [512, 517, 567].

Вряде исследований показан благоприятный эффект использования мелатонина и препаратов, корригирующих его синтез или активность, на течение заболевания и метаболические процессы при гиперфункции щитовидной железы (тиреотоксикозе) [64, 206].

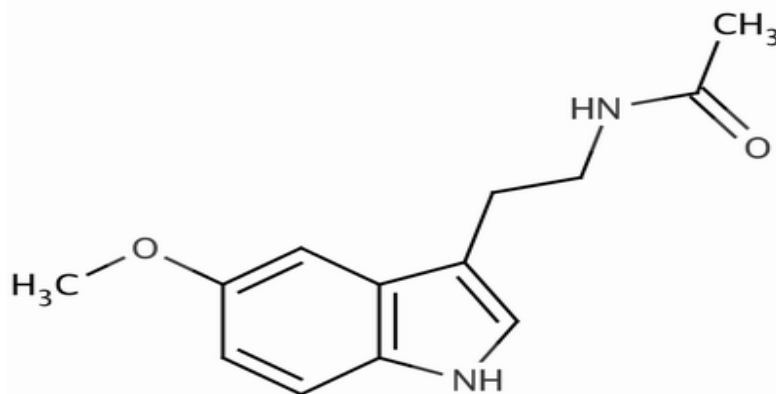


Рисунок 2. Химическая структурная формула мелатонина

В настоящее время одним из популярных мелатонин-корригирующих препаратов в России является мелаксен. Мелаксен по своему фармакологическому действию относится к адаптогенным препаратам. По химической структуре он является аналогом биогенного амина мелатонина. Синтезирован из аминокислот растительного происхождения. Химическая формула мелаксена N-ацетил-5-метокситриптамиин, молекулярная масса 232 Да (Рис. 2). Растворяется в воде, спирте, липидах. Мелаксен применяется для облегчения адаптации при изменении часовых поясов, при нарушениях сна, бессоннице, отрицательных последствиях стрессовых реакций, для нормализации биологических ритмов, при повышенной утомляемости, депрессивном синдроме.

Под действием мелаксена в среднем мозге и гипоталамусе повышается содержание  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и серотонина, а также

изменяется активность пиридоксалькиназы, участвующей в синтезе ГАМК, дофамина и серотонина. Данный препарат регулирует цикл «сон-бодрствование», способствует организации биологического ритма организма и нормализации ночного сна. При приеме внутрь мелаксен быстро и полностью абсорбируется, легко проходит гистогематические барьеры. Имеет короткий полупериод элиминации, поскольку быстро выводится из организма. Мелаксен улучшает качество сна, ускоряет засыпание, уменьшает число ночных пробуждений, улучшает самочувствие после утреннего пробуждения. Он делает сновидения более яркими и эмоционально насыщенными. Лекарство помогает приспособиться к изменению часовых поясов при авиа-перелетах, адаптироваться к круглосуточной работе и ночным дежурствам. Мелаксен положительно влияет на интеллектуально-мнестические функции мозга, на эмоционально-личностную сферу, снижает частоту приступов головных болей, головокружений, повышает настроение. Мелаксен понижает стрессовые реакции, обладает иммуностимулирующими и выраженными антиоксидантными свойствами, защищает организм от повреждающих факторов внешней среды, противодействует старению и отмиранию клеток. Препарат способен уменьшать секрецию гонадотропинов, в меньшей степени – кортикотропина, тиреотропина, соматотропина, этим самым регулируя нейроэндокринные функции. Известно, что секреция мелатонина в эпифизе подчинена циркадному ритму, в результате которой происходит ритмичность гонадотропных эффектов и половой функции [305, 342, 345].

Однако широкий круг вопросов, касающихся интегральной оценки воздействия мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз, а также функционирование ферментов окислительного метаболизма, оказывающих лимитирующее действие на СО, при многих патологических состояниях, включая ДЗП, сопряженные с алкогольной, лекарственной интоксикацией и СД2, остается практически не исследованным, в связи с чем, эта проблема весьма актуальна в настоящее время.

## **ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **2.1. Материалы и методы исследований**

Работа проводилась на базах кафедр госпитальной терапии и эндокринологии (заведующая кафедрой, д.м.н., профессор, Черных Т.М.) и биологии (заведующий кафедрой, д.б.н., профессор, Пашков А.Н.) ГБОУ ВПО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» (ректор, д.м.н., профессор, Есауленко И.Э.), в эндокринологических отделениях БУЗ ВО «Воронежский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи» (главный врач, д.м.н., профессор, Новикова Л.А.) и БУЗ ВО «Воронежская городская клиническая больница скорой медицинской помощи №10» (главный врач, д.м.н., Иванов М.В.), в терапевтическом отделении ГУЗ ВОКПД им. Н.С. Похвисневой (главный врач, к.м.н., Корниенко С.В.), в терапевтическом отделении КУЗВО «Воронежский областной клинический психоневрологический диспансер» (главный врач, к.м.н., Левтеев В. Е.).

#### **2.1.1. Материалы и объекты исследования**

Материалом исследований служила кровь здоровых доноров, кровь пациентов с лекарственным гепатитом, возникающем вследствие использования противотуберкулезной полихимиотерапии, больныхс алкогольным гепатитом в стадии обострения и с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа.

В ходе клинического исследования использовали кровь и мочу больных, находящихся на лечении в стационаре. Кровь для исследования забиралась в пробирки типа «вакутейнер» в утреннее время, натощак, из локтевой вены. Моча собиралась в утреннее время в контейнер. При проведении исследований соблюдались необходимые этические нормы. Проводимые исследования были одобрены Этическим комитетом Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко.

### **2.1.1.1. Характеристика используемых препаратов.**

#### **2.1.1.1.1. Характеристика препарата «Эпифамин»**

Эпифамин – препарат (0,01 г.), представляющий собой цитамин, содержит комплекс белков и нуклеопротеидов, выделенных из шишковидной железы крупного рогатого скота, обладает избирательным действием на клетки эпифиза. Производителем является ООО «Клиника Института биорегуляции и геронтологии». В соответствии с удостоверением качества и безопасности (№ RU.77.99.11.003.E.045773.11.11, 2011-11-08) биологически активная добавка соответствует требованиям ТУ 9358-025-23089787-97 с изменениями №1, 2; таблетки изготовлены из порошка, покрытого кишечнорастворимой оболочкой. Применение цитаминов одобрено научно-исследовательским Институтом питания Российской Академии медицинских наук и Геронтологическим обществом Российской Академии наук. Качество цитаминов гарантировано гигиеническими сертификатами Департамента Госсанэпиднадзора Российской Федерации.

Показаниями являются: нарушение функций эндокринной, иммунной и системы свертывания крови, вызванные лучевой и химиотерапией, воздействием других экстремальных факторов. Противопоказаний нет.

Способ применения и дозы: внутрь, за 10–15 мин до еды, по 0,01–0,02 г, 2–3 раза в сутки.

#### **2.1.1.1.2. Характеристика препарата «Мелаксен»**

Мелаксен – лекарственный препарат (Unifarm, Inc., США), содержащий в своем составе 3 мг мелатонина и вспомогательные вещества: двузамещенный кальция фосфат, магния стеарат, тальк, фармацевтическая глазурь, изопропиловый спирт (рег. №: П N015325/01 от 29.08.08).

Показания: в качестве снотворного средства и адаптогена для нормализации биологических ритмов.

В противопоказания входят: выраженные нарушения функции почек, аутоиммунные заболевания, лейкоз, лимфома, аллергические реакции, лимфогранулематоз, миелома, эпилепсия, сахарный диабет, беременность, период лактации, повышенная чувствительность к компонентам препарата.

Применение: внутрь по 0,5–1 таблетке, за 30–40 мин до сна, 1 раз в сутки.

### **2.1.1.1.3. Характеристика выборки больных с алкогольным гепатитом**

В клиническое исследование было включено 74 человека с алкогольным гепатитом (АГ), минимальной и умеренной степени активности, развивающимся вследствие хронического употребления алкоголя, все больные были мужского пола. Возраст пациентов составлял от 22 до 70 лет: средний возраст –  $41,4 \pm 7,2$  года. Все пациенты были больны синдромом алкогольной зависимости. Средняя продолжительность заболевания составляла  $6,2 \pm 0,4$  месяца.

Всем лицам был установлен предварительный диагноз АГ по следующим параметрам:

1. Хронический алкоголизм.
2. Отсутствие постоянного или в течение последних трех месяцев приема лекарственных препаратов (в анамнезе).
3. Активности аминотрансфераз (АлАт, АсАт) и ГГТП выше верхней границы нормы.
4. ИМТ < 30 кг/м<sup>2</sup>.
5. Отрицательный результат исследования anti-HCV и HBsAg.

Из сопутствующих заболеваний чаще всего регистрировались следующие: хронический гастрит – 36 больных (50%), артериальная гипертензия – 22 больных (30,5%).

Активность гепатита оценивали по уровню АлАт: минимальная при повышении до 3-х норм, умеренная от 3-х до 10 норм, высокая – более 10 норм.



В качестве критериев исключения рассматривали следующие патологические состояния: острый инфаркт миокарда, вирусные гепатиты, синдром холестаза, злокачественные новообразования, острое нарушение мозгового кровообращения, сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность.

Больные были разделены на 3 группы. Первая группа пациентов (28 человек) находилась на базисном лечении: полный отказ от приема алкоголя, раствор NaCl 0,9% и раствор витамина B1 10 мл внутривенно, раствор витамина B6 4 мл внутримышечно, гепатопротекторы: эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды 300 мг) по две таблетки 3 раза в день, внутрь; карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по две таблетки 3 раза в день во время еды, внутрь, в течение 10 дней. Пациенты 2-ой группы (22 человека) на фоне базисного лечения принимали по одной таблетке эпифамина (10 мг) 3 раза в день, за 10-15 мин. до еды, в течение 10 дней. Третья группа пациентов (24 человека) дополнительно к базисной терапии получала мелаксен по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30-40 минут перед сном в течение 10 дней.

#### **2.1.1.1.4. Характеристика выборки больных с неалкогольным стеатогепатитом**

В клиническое исследование было включено 87 человек с НАСГ, возникшим на фоне СД2, минимальной степени активности. Среди них 33 мужчины (37,9%) и 54 женщины (62,1%). Возраст больных составлял от 38 до 75 лет: средний возраст –  $56,5 \pm 17,5$  года. Все пациенты были больны СД2. Средняя продолжительность заболевания СД2 составляла  $3,6 \pm 2,7$  года. Диагноз неалкогольного стеатогепатита был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени.

Всем лицам был установлен предварительный диагноз НАСГ по следующим параметрам:

1. Отсутствие хронического потребления алкогольсодержащих напитков.
2. Гипергликемия (уровень глюкозы > 5,5 ммоль/л), дислипидемия (общий холестерин > 4,5 ммоль/л; липопротеиды низкой плотности > 4,5 ммоль/л; липопротеиды высокой плотности < 1,55 ммоль/л; коэффициент атерогенности > 3).
3. Активности аминотрансфераз (АлАт, АсАт) и ГГТП выше верхней границы нормы.
4. ИМТ > 30 кг/м<sup>2</sup>.
5. Отрицательный результат исследования anti-HCV и HBsAg.

Активность гепатита оценивали по уровню АлАт: минимальная при повышении до 3-х норм, умеренная от 3-х до 10 норм, высокая – более 10 норм.

У больных НАСГ среднее значение ИМТ составило (32,6±2,5) кг/м<sup>2</sup>. При УЗИ печени у пациентов с НАСГ выявлялось усиление эхогенности печени, которое можно было оценивать как признак стеатоза.

Из сопутствующих заболеваний чаще всего регистрировались следующие: ожирение – 87 больных (100%), артериальная гипертензия – 79 больных (90,8%), хроническая сердечная недостаточность – 77 больных (88,5%), хронический гастрит – 48 больных (55,2%).

В качестве критериев исключения из исследования рассматривали: вирусные гепатиты, синдром холестаза, злокачественные новообразования, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, хроническую почечную недостаточность.

Больные были разделены на 3 группы. Первая группа пациентов (33 человека) находилась на базисном лечении: сахароснижающая терапия (таблетированные препараты сульфонилмочевины и бигуаниды), витамины – В1, В6, В12 (5% растворы по 1 мл внутримышечно 1 раз в день), гепатопротекторы: эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды, 300 мг) по две таблетки 3 раза в день, внутрь; карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по две таблетки 3 раза в день во время еды, внутрь; гиполипидемическая терапия: статины (симвастатин 10 мг)

1 раз в день, внутрь, в течение 10 дней. Пациенты 2-ой группы (28 больных) на фоне базисной терапии принимали эпифаминпо одной таблетке (10 мг) 3 раза в день за 10-15 минут до еды в течение 10 дней. Третья группа (26 человек) дополнительно к базисной терапии получала мелаксен (Unifarm, Inc., США) по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30-40 минут перед сном в течение 10 дней.

#### **2.1.1.1.5 Характеристика выборки больных с лекарственным поражением печени**

В клиническое исследование было включено 105 человек с лекарственным гепатитом, минимальной и умеренной степени активности, развивающимся вследствие комплексного приема 4-5 противотуберкулезных препаратов (изониазид, стрептомицин, рифампицин, пипразинамид, этамбутол, микобутин), находящихся на стационарном лечении в Воронежском областном клиническом противотуберкулезном диспансере им. Н.С. Похвисневой. Среди них 62 мужчины (61%) и 43 женщины (39%). Возраст больных составлял от 21 до 75 лет: средний возраст –  $45,2 \pm 7,3$  года. Все пациенты были больны инфильтративным туберкулезом легких. Средняя продолжительность заболевания составляла  $3,6 \pm 0,4$  месяца.

Всем лицам был установлен предварительный диагноз ЛГ по следующим параметрам:

1. Отсутствие хронического потребления алкогольсодержащих напитков.
2. Постоянный или в течение последних трех месяцев прием лекарственных препаратов.
3. Активности аминотрансфераз (АлАт, АсАт) и ГГТП выше верхней границы нормы.
4. ИМТ  $< 30$  кг/м<sup>2</sup>.
5. Отрицательный результат исследования anti-HCV и HBsAg.

Из сопутствующих патологий были отмечены: артериальная гипертензия – у 39 (37%) больных, хронический гастрит – у 27 (26%) пациентов.

В качестве критериев исключения из исследования рассматривали: острый инфаркт миокарда, вирусные гепатиты, синдром холестаза, злокачественные новообразования, сахарный диабет, острое нарушение мозгового кровообращения, хроническую почечную недостаточность.

Больные были разделены на 3 группы. Первая группа пациентов (35 человек) находилась на базисном лечении (раствор NaCl 0,9% и раствор витамина B1 10 мл внутривенно, гепатопротекторы: гептор (адеметионин 400 мг) по одной таблетке 2 раза в день, внутрь; эсливер форте (эссенциальные фосфолипиды 300 мг) по две таблетки 3 раза в день, внутрь; карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по две таблетки 3 раза в день во время еды, внутрь, в течение 10 дней. Больные 2-ой группы (39 пациентов) на фоне базисной терапии принимали эпифамин по одной таблетке (10 мг) 3 раза в день, за 10-15 мин. до еды, в течение 10 дней. Пациенты 3-ей группы (31 человек) на фоне базисного лечения получали дополнительно мелаксен по одной таблетке, содержащей 3 мг мелатонина, 1 раз в день за 30-40 минут перед сном в течение 10 дней.

#### **2.1.1.1.6. Характеристика контрольной группы**

Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц в возрасте от 21 до 52 лет с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

Критериями исключения из исследования явились: вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, сахарный диабет, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, хроническая почечная недостаточность.

#### **2.1.1.1.7. Критерии оценки эффективности лечения**

Оценка эффективности лечения проводилась на основании анализа динамики течения патологического процесса, а также направленности изменений критериев общего состояния больных, лабораторных и инструментальных показателей в ходе базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Таблица 1. Схема обследования пациентов с диффузными заболеваниями печени.

Исследуемые показатели	Период обследования					
	1-я группа		2-я группа		3-я группа	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Получение письменного информированного согласия	+		+		+	
Анамнез	+		+		+	
Объективное обследование	+	+	+	+	+	+
Регистрация субъективных жалоб	+	+	+	+	+	+
Общий анализ крови	+	+	+	+	+	+
Биохимический анализ крови:	+	+	+	+	+	+
1. Показатели липидного обмена	+	+	+	+	+	+
2. Показатели функции печени	+	+	+	+	+	+
3. Показатели углеводного обмена	+	+	+	+	+	+
Иммунный статус	+	+	+	+	+	+
Концентрация 6-сульфатоксимелатонина	+	+	+	+	+	+
Показатели интенсивности свободнорадикального окисления (параметры БХЛ: S и I <sub>max</sub> ; ДК; АГ)	+	+	+	+	+	+
Показатели интенсивности антиоксидантной системы (параметр БХЛ-tgα <sub>2</sub> , GSH,	+	+	+	+	+	+

ГП, ГР, Г-S-T, СОД, каталаза, цитрат, α-токоферол)						
Показатели интенсивности апоптотических процессов (каспаза-1 и -3)	+	+	+	+	+	+
Инструментальные методы исследования	+	+	+	+	+	+
Оценка эффективности		+		+		+

## 2.1.2. Методы исследования

Перед лечением все пациенты проходили комплексное клиническое обследование, заключающееся в сборе анамнеза, объективном обследовании, консультации узких специалистов, позволяющее выяснить общее состояние больных. В работе использовались следующие методы исследований.

### 2.1.2.1. Клинические и инструментальные методы

Обследование больных включало выяснение жалоб и сбор анамнеза, физикальное обследование, выявление клинической симптоматики, наблюдающейся при диффузных заболеваниях печени. При физикальном обследовании больных с лекарственным, алкогольным гепатитами и неалкогольным стеатогепатитом осуществлялась оценка размеров и плотности печени при пальпации, частота и напряженность пульса, границы относительной сердечной тупости при перкуссии, состояния кожных покровов, а также психо-эмоционального состояния. Проводилось определение индекса массы тела (ИМТ) пациентов согласно рекомендациям ВОЗ (1997) по формуле Кетле:  $ИМТ = \text{масса тела} / \text{рост}^2$  (кг/м<sup>2</sup>). Степени ожирения определялись в зависимости от значений ИМТ: 25-29,9 – избыточная масса тела, 30-34,9 – ожирение 1-й степени, 35-39,9 – ожирение 2-й степени, 40 и выше – ожирение 3-й степени.

Определение АД проводили по методу Короткова. Регистрация ЭКГ осуществлялась в 12-ти стандартных отведениях, в покое, в положении лежа.

Размеры сердца оценивали путем перкуссии и определения границ относительной тупости сердца. Определение пульса осуществляли на лучевой артерии. Пальпацию печени проводили, применяя метод В.П.Образцова. Исследование размеров и структуры печени осуществляли с помощью УЗИ на приборах «Aloka SSD-500» и «Sonos 1000».

Определение показателей общего анализа крови (лимфоциты, эритроциты, моноциты, лейкоциты, эозинофилы, нейтрофилы, тромбоциты, СОЭ, гемоглобин) проводилось на гематологическом анализаторе «COULTER AcT diff».

### **2.1.2.2. Биохимические методы исследования**

**Печеночные пробы.** Принцип метода определения активности АлАТ и АсАТ заключался в фотометрическом определении содержания пирувата или оксалоацетата в пробе на основе реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. В качестве исследуемого материала использовалась свежая сыворотка крови без следов гемолиза. Активность ГГТП оценивали по скорости реакции переноса глутамилового остатка с гамма-L-(+)-глутамил-4-нитроанилида на глицилглицин (Био-тест, PLIVA – Lachema Diagnostika). Определение тимоловой пробы было основано на электрофотометрическом определении степени мутности сыворотки. Для определения активности ХЭ, отражающей белок-синтезирующую функцию печени, применяли метод, основанный на действии фермента на бутирилтиохолин, в результате чего в ходе гидролиза образуются масляная кислота и тиохолин. Тиохолин затем вступает в реакцию с дитио-бис-нитробензойной кислотой с образованием желтого окрашивания. Показателем активности холинэстеразы служило увеличение оптической плотности при 405 нм. Анализ осуществляли с использованием набора реактивов для определения активности холинэстеразы («Bio-La-Test», Erba Lachema s.r.o., Чехия).

**Исследование изменений липидного обмена** пациентов проводилось биохимическими методами при помощи определения концентрации общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в сыворотке крови при помощи наборов реагентов («Био-Ла-Тест») ферментативным фотоколориметрическим методом на биохимическом анализаторе Klima 15МС (Испания). Величины индекса атерогенности (ИА) определяли как отношение разности ОХС и ЛПНП – к ЛПВП ( $ИА = (ОХС - ЛПНП) / ЛПВП$ ).

**Показатели углеводного обмена.** Уровень глюкозы натощак и постпрандиальный уровень глюкозы оценивали с помощью глюкометра «Сателлит Плюс». Уровень инсулина определяли путем исследования его концентрации в сыворотке крови общепринятым методом иммуноферментного анализа с помощью набора реактивов DRG (США). Концентрацию С-пептида определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом (DRG, Австрия). Исследование гликированного гемоглобина (HbA1c) выполнялось с использованием иммуноферментного метода на ИФА «Униплан» (по стандарту NGSP). Расчет индекса НОМА (показатель инсулинорезистентности) проводился по формуле: индекс НОМА =  $I_{п} \times Г_{п} / 22,5$ , где  $I_{п}$  – инсулин плазмы, ед/мл;  $Г_{п}$  – глюкоза плазмы, ммоль/л. Значение индекса НОМА > 2,7 расценивалось как инсулинорезистентность.

**Иммунологические методы исследования.** Количественное определение сывороточных иммуноглобулинов классов А, М, G осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА). В основе метода лежит принцип взаимодействия иммуносорбента — антигена возбудителя инфекции — с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген-антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку [501]. Циркулирующие иммунные комплексы, представляющие собой растворимые комплексы антиген-антитело, определяли спектрофотометрическим методом [58].



### 2.1.2.3. Определение содержания 6-сульфатоксимелатонина

Об уровне мелатонина в организме человека можно судить по содержанию 6-сульфатоксимелатонина, являющегося основным метаболитом биотрансформации данного гормона. Профиль экскреции 6-сульфатоксимелатонина в плазме крови и моче отражает количественные и качественные аспекты секреции мелатонина [305]. В этой связи данный подход, как правило, используется для анализа ритма эндогенного мелатонина и исследования его фармакокинетических свойств.

Для определения содержания 6-сульфатоксимелатонина в моче пациентов применяли иммуноферментный анализ с использованием техники метки с помощью антител. В ходе исследований использовали набор реактивов фирмы «BÜHLMANN» «6-Sulfatoxymelatonin ELISA Kit (EK-M6S)». Микротитровальные лунки микропланшета были покрыты козьими анти-кроличьими антителами. Диапазон измерений: 0,8-40 нг/мл.

Образцы мочи центрифугировали в течение 5 мин при 2000 g и отбирали аликвоты в пробирки. При подготовке реагентов осуществляли разведение стандартов, контролей и образцов согласно указаниям в прописи. Вносили по 10 мкл стандартов, контролей и образцов мочи пациентов в пробирки, добавляли 500 мкл буфера – компонента используемого набора, и перемешивали. При подготовке реагентов избегали попадания прямых солнечных лучей. Перед проведением анализа доводили реагенты до комнатной температуры. Неиспользованные реагенты хранили при 2-8°C. Стандарты, контроли и образцы тестировали в дублях.

Процедура проведения анализа включала следующие основные этапы:

1. Подготавливали планшет с достаточным количеством лунок. Промывали лунки дважды, используя 300 мкл промывочного буфера на каждую. Опустошали лунки, постучав планшет о фильтровальную бумагу.

2. В соответствующие лунки разносили по 50 мкл разведенных стандартов, контролей и образцов.

3. Добавляли в лунки по 50 мкл разведенного ферментного конъюгата, входящего в состав набора, и 50 мкл антисыворотки.

4. Закрывали планшет клейкой пленкой и инкубировали 120 мин. с шейкрованием (500 об/ мин).

5. Опустошали лунки, сняв пленку, и промывали как минимум четыре раза 300 мкл промывочного буфера с учетом того, что процедура промывки является критичной. Аккуратно удаляли промывочный буфер. Переворачивали планшет и опустошали, постучав о фильтровальную бумагу.

6. Добавляли 200 мкл субстрат-раствора, входящего в набор, в каждую лунку.

7. Инкубировали в шейкере 30 мин.

8. Останавливали реакцию добавлением 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку.

9. Аккуратно потряхивали планшет, чтобы перемешать содержимое.

10. Измеряли оптическую плотность при 450 нм на спектрофотометре HitachiU1900 в течение 60 мин после остановки реакции.

Подсчет результатов осуществляли, используя калибровочную кривую. Оптическую плотность стандартов (ось абсцисс) отмечали против соответствующей концентрации (ось ординат). При этом находили среднее между оптическими плотностями дублей и из полученного значения вычитали отрицательный контроль. Концентрации образцов рассчитывали по стандартной кривой с использованием средних значений абсорбции.

#### **2.1.2.4. Определение интенсивности свободнорадикальных процессов**

##### **2.1.2.4.1 Оценка параметров биохемилюминесценции**

Определение интенсивности свободнорадикального окисления биосубстратов проводили с помощью метода биохемилюминесценции (БХЛ),

индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа. Метод основан на реакции Фентона, заключающейся в каталитическом разложении  $H_2O_2$  ионами  $Fe^{2+}$ . Генерируемые свободные радикалы ( $R^\bullet$ ,  $OH^\bullet$ ,  $RO^\bullet$ ,  $RO_2^\bullet$ ) инициируют СО в исследуемом биологическом субстрате. Рекомбинация радикалов  $RO_2^\bullet$  сопровождается формированием неустойчивого тетроксидов, распадающегося с испусканием кванта света. Оценку интенсивности СО проводили с помощью биохемиллюминометра БХЛ-07 с программным обеспечением. Регистрацию кинетической кривой БХЛ осуществляли в течение 30 секунд и определяли следующие параметры: светосумму хемиллюминесценции  $-S$ , интенсивность вспышки  $-I_{max}$ , характеризующие скорость свободнорадикальных процессов, и величину тангенса угла падения кинетической кривой ( $tg\alpha_2$ ), отражающую общую антиоксидантную активность [131].

На скорость СО в биологическом материале оказывает воздействие комплекс всех соединений, способных проявлять и антиоксидантные, и прооксидантные свойства, в связи с чем, данный подход обеспечивает возможность определения степени компенсаторных механизмов свободнорадикальных процессов в организме.

Измерение интенсивности БХЛ осуществляли в среде следующего состава: 0,4 мл 0,02 моль/л калий-фосфатного буфера (рН 7,5), 0,2 мл 2% раствора  $H_2O_2$  (вносится непосредственно перед анализом), 0,4 мл 0,01 ммоль/л  $FeSO_4$ . Сыворотку крови вносили в среду измерения в количестве 0,1 мл перед определением. На рисунке 3 изображена типичная кривая БХЛ.

Интенсивность сигнала, мВ

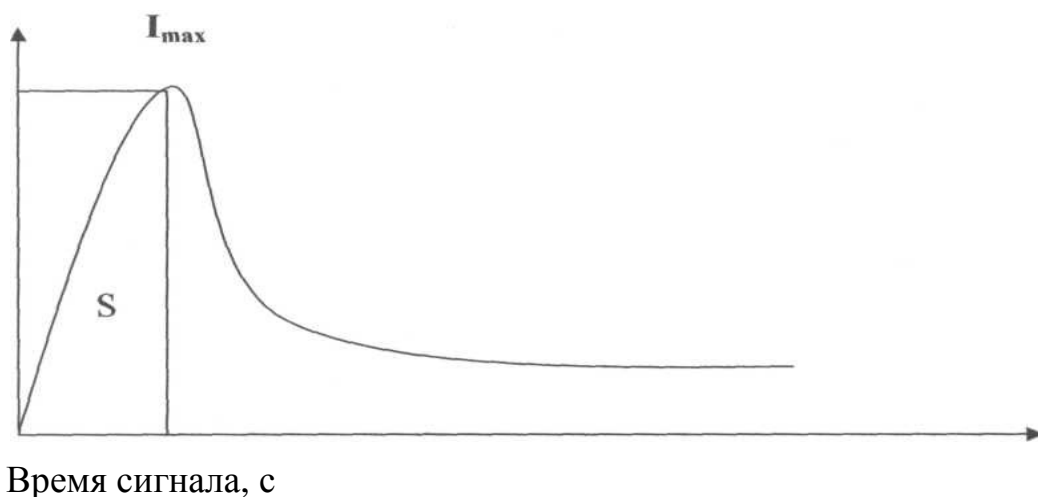


Рисунок 3. Типичная кривая биохемилюминесценции

#### 2.1.2.4.2. Определение содержания диеновых конъюгатов

Определение содержания диеновых конъюгатов (ДК) осуществляли спектрофотометрическим методом, основанном на том, что в процессе ПОЛ в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникают сопряженные двойные связи. С этим сопряжено появление максимума в спектре поглощения при 233 нм [239]. Для определения содержания ДК 0,25 мл биоматериала обрабатывали в течение 15 мин в гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма с 9 мл экстрагирующей смеси гептана с изопропиловым спиртом (соотношение 1:1). Затем суспензию переносили в плотнозакрывающиеся полиэтиленовые пробирки. Центрифугирование проб осуществляли при 4000g в течение 10 мин. Супернатант переносили в градуированные пробирки и приливали 1/10 объема дистиллированной  $H_2O$ . Затем образцы двукратно встряхивали и после расслаивания фаз отбирали гептановую фазу. К равным объемам по 0,5 мл добавляли этанол в объемном отношении 1:5 – 1:10. Контролем служили пробы, содержащие только экстрагирующую фазу и вместо 1 мл супернатанта 1 мл 0,1 мМ фосфатного буфера, рН 7,6.

Для определения концентрации ДК в сыворотке крови расчет проводили по формуле:

$$[ДК] = \frac{V_{общ} \cdot D}{l \cdot \varepsilon \cdot V_{внес}}$$

где [ДК] – концентрация диеновых конъюгатов (мкмоль/л);  $V_{общ}$  – объем полученного образца, мл;  $D$  – величина оптической плотности, ед.;  $l$  – длина оптического пути, см;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции, равный  $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ;  $V_{внес}$  – объем вносимой пробы, мл.

### 2.1.2.4.3. Определение активности аконитатгидратазы

Определение активности АкГ осуществляли спектрофотометрически при 235 нм. Принцип метода основан на возникновении двойной связи в молекуле цис-аконитата, образующегося при дегидратации цитрата в ходе реакции, катализируемой АкГ. Определение скорости ферментативной реакции проводили в среде 50 мМ трис-НСl-буфера, рН 7,8, содержащего 0,15 мМ цитрат. Реакцию инициировали внесением аликвоты исследуемой пробы в среду спектрофотометрирования. Расчет количества ферментативных единиц (Е) проводили с помощью формулы:

$$E = \frac{\Delta D \cdot 1,0 \cdot V_{общ}}{V_{пр} \cdot t \cdot \varepsilon}$$

где  $\Delta D$  – изменение оптической плотности пробы в единицу времени измерения; 1,0 – объем реакционной среды в кювете, мл;  $V_{общ}$  – общий объем ферментного раствора, мл;  $V_{пр}$  – объем ферментного раствора, внесённый в кювету для измерения, мл;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции для хромофорной группы субстрата, отражающий изменение оптической плотности при окислении или восстановлении 1 мкмоль субстрата в 1 мл среды (для цис-аконитата – 3,08);  $t$  – время измерения активности фермента, мин.

## 2.1.2.5. Определение активности антиоксидантной системы

### 2.1.2.5.1. Определение активности ферментативного звена антиоксидантной системы

Ферментативную активность выражали в ферментативных единицах (Е) на мл сыворотки крови и в расчете Е на мг белка, т.е. в виде удельной активности. Разные способы выражения ферментативной активности позволяли наиболее адекватно оценить наблюдающиеся модификации каталитического действия ферментов, так как при исследуемых патологиях и проведении лечения могли происходить изменения содержания общего белка. Е - количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ продукта реакции за 1 мин при температуре 25°C. Ферментативную активность измеряли на спектрофотометре HitachiU-1900 с программным обеспечением. Активность ферментов, использующих в качестве кофермента окисленную или восстановленную форму NADP, оценивали по изменению оптической плотности при 340 нм. В этом случае для расчета ферментативной активности использовали следующую формулу:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times \tau \times 6,22} ,$$

где D – прирост оптической плотности при 340 нм за определенное время; 1,0 – объем раствора в кювете, мл; V – общий объем ферментного раствора, мл;  $\Delta V$  – объем внесенной для измерения пробы, мл;  $\tau$  – время измерения, мин; 6,22 – коэффициент экстинкции, соответствующий величине поглощения, которую дает 1 мкмоль кофермента, находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора 1 см [364].

#### 2.1.2.5.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы

Скорость реакции, катализируемой ГП, оценивали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм, обусловленному

окислением NADPH, происходящем в ходе сопряженных ферментативных реакций: образования GSSG в результате катализа ГП и его последующего восстановления, взаимосвязанного с окислением NADPH, под действием ГР. Активность ГП определяли в среде следующего состава: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH, 0,85 мМ GSH, 0,37 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ед/мл ГР. В контрольной пробе отсутствовал восстановленный глутатион GSH.

#### **2.1.2.5.1.2. Определение активности глутатионредуктазы**

Скорость реакции, катализируемой ГР, оценивали спектрофотометрически по уменьшению оптической плотности при длине волны 340 нм, связанным с окислением NADPH, протекающим в результате восстановления глутатиона под действием фермента. Определение ферментативной активности осуществляли в среде 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH и 0,8 мМ GSSG [575].

#### **2.1.2.5.1.3. Определение активности глутатион-S-трансферазы**

Активность Г-S-T определяли с помощью метода, основанного на оценке скорости ферментативного образования глутатион-S-2,4-динитробензола в реакции GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом. Измерение активности Г-S-T проводили в среде: 0,1М калий-фосфатного буфера (pH 7.4), содержащем 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH. Скорость реакции, катализируемой Г-S-T, оценивали по возрастанию оптической плотности при 340 нм.

Расчет активности глутатионтрансферазы производили по формуле:

$$E = \frac{D \times 1,0 \times V}{\Delta V \times t \times 9,6},$$

где D – прирост оптической плотности при 340 нм за определенное время;

1,0 – объем раствора в кювете, мл;  $V$  – общий объем ферментного раствора, мл;  $\Delta V$  – объем внесенной для измерения пробы, мл;  $t$  – время измерения, мин; 9,6 – коэффициент экстинкции для глутатион-1-хлор-2,4-динитробензола, соответствующий величине поглощения, которую дает 1 мкмоль кофермента, находящийся в 1 мл исследуемой смеси при измерении на спектрофотометре, когда толщина слоя измеряемого раствора 1 см.

#### **2.1.2.5.1.4. Определение активности НАДФ –зависимой изоцитратдегидрогеназы**

Скорость реакции, катализируемой НАДФ-специфичной изоцитратдегидрогеназой, оценивали спектрофотометрически по возрастанию оптической плотности при 340 нм, обусловленному восстановлением NADP в ходе превращения изоцитрата в 2-оксоглутарат. Измерение активности фермента проводили в среде следующего состава: 50 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 1,5 мМ изоцитрат, 0,25 мМ NADP и 2,0 мМ  $MnCl_2$ .

#### **2.1.2.5.1.5. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы**

Скорость реакции, катализируемой Г6ФДГ, оценивали по возрастанию оптической плотности при 340 нм, связанному с восстановлением NADP в ходе превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконолактон. Среда для определения ферментативной активности имела следующий состав: 0,05 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,8), содержащий 3,0 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ NADP, 1,0 мМ  $MnCl_2$  [327].

#### **2.1.2.5.1.6. Определение активности каталазы**

Активность каталазы определяли с помощью метода, основанного на способности  $H_2O_2$  формировать с молибдатом аммония окрашенный комплекс. Ферментативную активность измеряли спектрофотометрически при длине волны 410 нм [575]. При этом использовали следующие реактивы: буферно-субстратную



смесь, содержащую 10 мл 0,1 М трис-НСl-буфера (рН 7,4) и 30 мл 0,08% раствора пероксида водорода; 4,5% раствор аммония молибденовокислого.

Таблица 2. Последовательность определения каталазной активности.

Реактив	Холостая проба, мл	Опытная проба, мл	Примечание
Буферно-субстратная смесь	2,0	2,0	10 минут при 37°С
Сыворотка крови	-	0,1	3 минуты при 37°С
Раствор молибдата аммония	2,0	2,0	-
Сыворотка крови	0,1	-	-

Пробы анализировали спектрофотометрически при 410 нм. Раствором сравнения служила среда, содержащая 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл сыворотки крови.

Активность каталазы рассчитывали по следующей формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_{on}) \cdot 12 \cdot 10^3 \cdot 4,1 \cdot 10^6}{22,2 \cdot 10^6 \cdot 3}$$

где  $A$  – активность каталазы, Е/мл;  $12 \cdot 10^3$  – фактор разведения;  $10^6$  – коэффициент пересчета на мкмоль;  $22,2 \cdot 10^6$  – коэффициент молярной экстинции образующегося комплекса; 3 – время инкубации, соответствующее 3 мин.

#### 2.1.2.5.1.7. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и NADH [159]. За единицу активности СОД (Е) принимали количество фермента, необходимого для 50%-ого ингибирования восстановления НСТ.

Среда для определения активности СОД включала следующие компоненты: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,8), 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ НСТ, 0,01 мМ ФМС, 0,8 мМ NADH. Исследуемый образец сыворотки крови вносили в количестве 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию запускали добавлением NADH. Регистрировали прирост оптической плотности за 5 мин при длине волны 540 нм.

Расчет вели по формуле:

$$A = \left( 100 - \frac{E_o \times 100}{E_k} \right) / 50 \cdot \text{мг белка}$$

где  $E_o$  и  $E_k$  - среднее значение прироста экстинции за 1 мин. ( $\Delta D/5$  мин) соответственно в опытной и контрольной пробах.

#### **2.1.2.5.2. Определение активности неферментативного звена антиоксидантной системы**

##### **2.1.2.5.2.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона**

Для определения содержания восстановленного глутатиона использовали метод, в основе которого лежит реакция с 5,5 - дитио - бис - (2 - нитробензойной) кислотой, в ходе которой образуется тионитрофенильный анион (ТНФА), имеющий максимум поглощения при 412 нм. В пробирке смешивали 0,5 мл сыворотки крови и 3,5 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4). Полученную суспензию разводили в 8 раз дистиллированной  $H_2O$  и к 2 мл полученного раствора добавляли 1 мл 20% ТХУ. Затем раствор перемешивали и ставили в холодильник на 15-20 мин. После этого смесь центрифугировали при 3000g в течение 15 мин и 1 мл супернатанта добавляли к 0,5 мл фосфатного буфера (рН

7,4). В опытную пробу приливали 0,05 мл реактива Элмана, в контрольную – 0,05 мл метанола. Затем измеряли оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера (рН 7,4).

Концентрацию GSH рассчитывали по следующей формуле:

$$[GSH] = \frac{(E_{on} - E_k)}{13,1 \cdot 10^3} \cdot 72,6 \cdot 10^3$$

где  $[GSH]$  – содержание восстановленного глутатиона, моль/л;  $E_{on}$  – оптическая плотность опытной пробы;  $E_k$  – оптическая плотность контрольной пробы;  $13,1 \cdot 10^3$  – коэффициент молярной экстинкции ТНФА при 412 нм; 72,6 – фактор разведения.

#### **2.1.2.5.2.2. Определение содержания цитрата**

Для определения содержания цитрата применяли метод Нательсона, заключающийся в образовании из цитрата при помощи бромного реактива и перманганата калия пентабромацетона, его экстракции петролейным эфиром и измерении поглощения окрашенного комплекса с тиомочевинной при длине волны 430 нм [545]. Расчет производили с помощью калибровочной кривой.

Для определения содержания цитрата к 1 мл сыворотки крови приливали 0,8 мл 17% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем полученную смесь центрифугировали при 4000g в течение 5 мин. К 0,5 мл супернатанта, перенесенного в пробирку с притертой пробкой, прибавляли 0,25 мл 50% раствора серной кислоты, 0,1 мл 1 М бромистого калия и 0,5 мл насыщенного раствора перманганата калия. Смесь охлаждали в течение 20 мин. Избыток перманганата калия устраняли, прибавляя по каплям 3% перекись водорода. Для экстрагирования образовавшегося пентабромацетата прибавляли гексан по частям; сначала 0,5 мл, затем еще раз 0,5 мл и в заключительный раз - 0,3 мл гексана. После добавления каждой порции гексана осуществляли встряхивание в

течение 5 мин на шюттель-аппарате. Для проведения цветной реакции 1 мл гексанового экстракта переносили в пробирку с притертой пробкой, куда предварительно приливали 2,5 мл 2% раствора тиомочевины в боратном буфере. Пробирку встряхивали в течение 5 мин. После расслоения фаз окрашенный в светло-желтый цвет нижний слой осторожно отсасывали с помощью пипетки Пастера с оттянутым концом. Фотометрирование осуществляли против контроля, для получения которого на выпаривание брали вместо безбелкового фильтра 0,5 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и обрабатывали также. Интенсивность окраски определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900.

#### **2.1.2.5.2.3. Определение содержания $\alpha$ -токоферола**

Принцип метода определения содержания  $\alpha$ -токоферола заключается в фотометрировании хромогенного комплексного соединения двухвалентного железа, формирующегося при взаимодействии витамина E с  $\text{FeCl}_3$ , и ортофенотролина [156]. К 1 мл сыворотки крови приливали 1 мл 96% этанола, после перемешивания добавляли 3 мл гексана. Затем смесь встряхивали 2 мин и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Из сформировавшегося верхнего слоя отбирали 2 мл и переносили в 4 пробирки (по 0,5 мл). Затем пробирки ставили на инкубацию на водяную баню при температуре 50°C. Образовавшийся сухой осадок растворяли в 1 мл бензола, приливали 1 мл 0,025% спиртового раствора  $\text{FeCl}_3$  и выдерживали 5 мин при температуре 25°C. После этого в смесь добавляли 1 мл 0,05% спиртового раствора ортофенотролина и ровно через 2 мин определяли оптическую плотность при 510 нм против пробы, содержащей 1 мл бензола и 2 мл этилового спирта. Контроль содержал 1 мл бензола, 1 мл 0,025% раствора  $\text{FeCl}_3$  и 1 мл 0,05% раствора ортофенотролина. Из оптической плотности опытной пробы вычитали оптическую плотность контрольной пробы. Количество  $\alpha$ -токоферола, участвующего в реакции с  $\text{FeCl}_3$ , оценивали с помощью калибровочной кривой.

## 2.1.2.6. Определение интенсивности апоптотических процессов

### 2.1.2.6.1. Исследование степени фрагментации ДНК

Выделение ДНК осуществляли фенольно-хлороформным методом [155].

Используемые реагенты:

1. *Буфер для выделения: (DigestionbufferDB)*. Для приготовления 5 мл раствора смешивали: 0,1 мл 5 M NaCl, 0,05 мл 1 M трис-HCl буфера, (pH 8,0), 0,25 мл 5 mM ЭДТА, 0,25 мл 10% додецилсульфата натрия, 25 мкл протеинкиназы K, 4,35 мл стерильной дистиллированной H<sub>2</sub>O.
2. *Раствор протеинкиназы K*: лиофилизованную протеинкиназу растворяли в стерильной дистиллированной H<sub>2</sub>O в концентрации 20 мг/мл. Хранение препарата осуществляли при -20°C.
3. *Насыщенный буфером фенол*: фенол расплавляли при температуре 65°C в присутствии равного объема 0,5 M трис-HCl буфера (pH 8,0), содержащего 0,2% 2-меркаптоэтанола. После полного расплавления фенола перемешивали смесь, осуществляли отбор водной фазы и еще дважды экстрагировали фенол 0,1 M трис-HCl буфером, pH 8,0, содержащим 0,2% 2-меркаптоэтанола. После последней экстракции водную фазу не удаляли, а оставляли в сосуде с фенолом.
4. *Буфер трис-ЭДТА (TE)*: для приготовления 10 мл раствора смешивали 0,1 мл 1 M трис-HCl буфера (pH 7,4) и 20 мкл 0,5 M ЭДТА, pH 8,0, и доводили объем водой до 10 мл. Хранение готового раствора при 4°C.

Для выделения ДНК кровь, находящуюся в пробирке с консервантом, использовали для получения лейкоцитов. Клеточную суспензию смешивали с 1 мл буфера для выделения в пробирке «эппендорф». В каждый образец вносили протеинкиназу K и тщательно перемешивали. Инкубировали образцы при 55°C в течение 3 часов или при 37°C в течение ночи (до 16 часов).

После инкубации к образцам прибавляли по 400 мкл насыщенного буфером фенола и перемешивали до образования гомогенной эмульсии. Затем продолжали экстракцию супернатанта при комнатной температуре в течение 5 мин.

Разделение водной и органической фаз осуществляли центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. После разделения фаз в верхней водной фазе находится ДНК, в фенольной фазе – РНК, а на интерфазе – белки.

Водную фазу переносили в другую пробирку и прибавляли 400 мкл смеси фенол/хлороформ (1:1). Затем перемешивали при комнатной температуре 5 мин, центрифугировали при 5000 g в течение 5 мин и переносили водную фазу в новую пробирку. К ней добавляли 400 мкл хлороформа и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Центрифугировали в режиме - 5 мин при 5000 g.

Водную фазу переносили в новую пробирку и к ней добавляли 800 мкл (два объема) охлажденного 96%-ного этилового спирта и 40 мкл 3М ацетата натрия (0,1 объема). При этом происходила преципитация ДНК. ДНК собирали с помощью центрифугирования при 12000 g в течение 10 мин. Затем отбирали надосадочную жидкость и промывали ДНК 20 мл 70%-ного этилового спирта. Вторично промывали ДНК 1 мл 70%-ного этанола и переносили ее в пробирку «эппендорф». Высушивание ДНК проводили на воздухе в течение 2,5 мин. Затем ДНК растворяли в ТЕ буфере до концентрации 1 мг/мл. Хранение осуществляли при температуре -20°C.

Фрагментацию ДНК выявляли с помощью электрофореза в агарозном геле с использованием буфера трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ), pH 7,6. Буфер ТАЕ (50-кратный) готовили следующим образом: для приготовления 100 мл раствора смешивали 24,22 г триса, 1,862 г ЭДТА, 73 мл стерильной дистиллированной H<sub>2</sub>O. Доведение pH до 7,6 осуществляли уксусной кислотой (8,96 мл или 9,4 г). Буфер для нанесения содержал 0,25% бромфенолового синего, 40% сахарозы в 1-кратном ТАЕ. Для маркеровки молекулярной массы использовали набор «MassRuler» производства «Fermentas», содержащий маркеры от 1500 до 10000 нуклеотидных пар.

Для проведения электрофореза готовили однократный ТАЕ в объеме, достаточном для заполнения электрофоретической камеры (~ 250 мл). К ТАЕ буферу добавляли 120 мкл 0,1% раствора бромистого этидия. Образцы

исследуемой и маркерной ДНК смешивали с буфером для нанесения. Приготавливали 1,5%-ный раствор агарозы в однократном ТАЕ (450 мг агарозы на 30 мл буфера) и нагревали его до полного расплавления агарозы. Затем охлаждали смесь до ~ 60°C, добавляли 1,5 мкл 2% раствора бромистого этидия и перемешивали, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

Теплую агарозу выливали, равномерно распределяя, в кювету для геля. Вставляя вертикально гребенки, следили за тем, чтобы зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм. Оставляли кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляли гребенки. Кювету с гелем помещали в электрофоретическую камеру, заполненную буфером.

Исследуемую и маркерную ДНК вносили в лунки, учитывая, что для получения четкой картины достаточный объем внесения - 10 мкл. Электрофорез проводили при напряжении 100 В в течение 1-2 часов. После электрофореза гель просматривали в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографировали.

#### **2.1.2.6.2. Определение активности каспаз**

Определение активности каспаз – 1 и –3 производили с помощью набора реактивов фирмы «Sigma» «Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric» и «Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric» соответственно. Реакционный буфер представлял собой 20мМ HEPES, рН 7,4, содержащий 2 мМ ЭДТА, 0,1% Chaps, 5 мМ ДТТ, 20 нмоль субстрата каспазы. В среду измерения добавляли коктейль ингибиторов протеаз (0,08 мМ апротинин, 1,5 мМ пепстатин А, 2 мМ лейпептин) в соотношении 100 : 1 (все реактивы фирмы Sigma, США). Исследуемый образец инкубировали 95 мин при 37°C в реакционном буфере. Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил–Tyr–Val–Ala–Asp–p–нитроанилида (Ac–YVAD–pNA) (в случае каспазы – 1) и ацетил–Asp–Glu–Val–Asp–p–нитроанилида (Ac–DEVD–pNA) (в случае каспазы –3) с образованием остатка p–нитроанилида, имеющего максимум экстинкции при 405 нм (коэффициент молярной экстинкции = 10,5).

Активность каспаз рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times d}{\epsilon \times t \times V}$$

где A – активность, D – оптическая плотность, d – фактор разведения,  $\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции = 10,5, t – время реакции, мин, V – объем образца, мл.

Активность каспаз выражали в пикомолях продукта, образующегося в 1 мин, в расчете на мг белка.

### **2.1.2.7. Унифицированный метод определения содержания общего белка по биуретовой реакции**

Метод основан на том, что белки реагируют в щелочной среде с серноокислой медью с образованием соединения, окрашенного в фиолетовый цвет.

Используемые реактивы:

1. 154 ммоль/л хлорид натрия (изотонический раствор). Приготовление: 9,317 г NaCl доводится до 1 л дистиллированной водой.

2. Биуретовый реактив. Приготовление: в мерную колбу на 1 л наливается 100-150 мл дистиллированной воды, добавляется 8 г NaOH, 45 г сегнетовой соли (калий-натрий виннокислый четырёхводный), 15 г сульфата меди ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) и 5 г йодида калия (KI). Каждый компонент смеси добавляется после полного растворения предыдущего строго в указанной последовательности. Смесь оставляется стоять на ночь, затем доводится водой до метки и профильтровывается. Хранится в тёмной посуде в холодильнике.

3. 0,2 моль/л раствор гидроксида натрия:

8 г NaOH доводится водой до 1 л.

4. 30 ммоль/л раствор йодида калия: 0,5 г KI доводится 0,2 моль/л NaOH до 100 мл.



5. Рабочий раствор биуретового реактива: к 20 мл биуретового реактива добавляется 80 мл 30 ммоль/л раствора KI.

6. Основной калибровочный раствор альбумина из человеческой сыворотки, 100 г/л: 1 г альбумина растворяют в 10 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Ход определения. В две пробирки наливают по 5 мл биуретового реактива. В одну из пробирок добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки крови (опытная проба), в другую – 0,1 мл изотонического раствора NaCl (контрольная проба). Содержимое пробирок тщательно перемешивают. Через 30 мин опытную пробу фотометрируют против контрольной при длине волны 540-560 нм (зелёный светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Расчёт ведут по калибровочному графику, для построения которого из калибровочного раствора альбумина готовят рабочие растворы с различной концентрацией белка (Таблица 3). Из каждого рабочего калибровочного раствора берут по 0,1 мл и вносят в пробирки, содержащие по 5 мл биуретового реактива. Через 30 мин все пробы фотометрируют против контрольной при 540-560 нм по полученным данным строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс концентрацию белка в г/л, по оси ординат – величину экстинкции. Калибровочный график линеен до величины экстинкции 0,5. При более высокой величине экстинкции сыворотку разводят изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:1 [142].

Таблица 3. Приготовление рабочих калибровочных растворов белка

№ раствора	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Изотонический раствор NaCl, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,4	0,6	40
2	0,6	0,4	60

3	0,8	0,2	80
4	1,0	-	100

Норма: 65-85 г/л. В мутной, гемолизированной сыворотке белок не определяют.

### 2.1.2.8. Статистическая обработка данных

Для обработки результатов исследования использовали описательную статистику с определением выборочного среднего ( $M$ ), выборочного стандартного отклонения ( $\sigma$ ), стандартной ошибки среднего ( $m$ ) по формулам [59]:

$$M(\bar{X}) = \frac{\sum X}{n}; \sigma = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}}; m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

где  $X$  — значение параметра,  $\bar{X}$  — выборочное среднее соответствующей выборки,  $\mu$  — среднее арифметическое,  $t_{0,05}$  — критическое значение непарного критерия Стьюдента при уровне значимости 0,05,  $n$  — объем выборки.

При количестве пациентов в группе контроля и каждой из подгрупп основной группы менее 50 лиц даже в случае нормальности распределения для сравнения применялись непараметрические методы статистического анализа [71]. Так, внутригрупповое сравнение осуществлялось с помощью двустороннего критерия Вилкоксона ( $W$ ), критическое значение ( $p$ ) которого находили по специальным таблицам согласно объёму выборки:

$$z_W = \frac{|W| - \frac{1}{2}}{\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{6}}},$$

где  $z_W$  — z-критерий Вилкоксона с поправкой Йейтса на непрерывность,  $W$  — сумма знаковых рангов,  $n$  — число пар наблюдений.

Каждому больному сопоставляли величину изменения признака, все изменения упорядочивали по абсолютной величине (модулю), затем рангам присваивали знак изменения и, суммируя «знаковые ранги», получали величину критерия Вилкоксона  $W$ .

Для сравнения параметров двух независимых групп (т.е. межгрупповое сравнение между комбинированным лечением с эпифамином или мелаксенон по

сравнению с базисным лечением) использовали двухсторонний U-критерий Манна-Уитни, критическое значение (p) которого находили по специальным таблицам согласно численности меньшей и большей групп [118; 133]:

$$U = T - \frac{n_m(n_m + 1)}{2},$$

где U - критерий Манна-Уитни, T — сумма упорядоченных по значению рангов меньшей группы,  $n_m$  — численность меньшей группы.

С целью вычисления U-критерия Манна-Уитни сравниваемые параметры совокупностей объединяли и ранжировали по возрастанию, присваивая наибольший ранг максимальному значению показателя в обеих группах. Далее в меньшей группе вычисляли сумму упорядоченных рангов, находя для неё критическое значение уровня значимости (p) [59].

Для выявления взаимосвязей между изучаемыми лабораторными параметрами у больных использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ), применимый как к количественным, так и порядковым признакам. Информация о признаках x, y обычно представлена совокупностью  $(x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ , которую получают, отбирая n объектов и измеряя n значения их признаков. Значения признаков выборки ранжировали по возрастанию и подменяли их рангами, рассчитывая коэффициент ранговой корреляции Спирмена по формуле [118,133]:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n^3 - n},$$

где d — разность рангов для каждого члена выборки, n — её объем.

Корреляционный анализ позволяет установить, ассоциированы ли наборы данных по величине. Если большие значения из одного набора данных были связаны с большими значениями другого набора, то это свидетельствовало о положительной корреляции, малые значения одного набора, связанные с большими значениями другого набора — об отрицательной корреляции, данные двух диапазонов никак не связанные — о корреляции близкой к нулю. Уровень

значимости ( $p$ )  $r_s$  находили в таблице его критических значений в соответствии с объёмом выборки.

На основании данных корреляционного анализа проводился расчёт коэффициента сопряжённости (КС) и коэффициента тесноты связей (КТС):

$$\text{КС} = \frac{\text{количество достоверных корреляционных связей}}{\text{количество возможных корреляционных связей}},$$
$$\text{КТС} = \frac{\text{количество достоверных корреляционных связей}}{\text{количество недостоверных корреляционных связей}}$$

Степень силы корреляции оценивали по следующей классификации:

- Сильная или тесная – более 0,70
- Средняя – от 0,50 до 0,69
- Умеренная – от 0,30 до 0,49
- Слабая – от 0,20 до 0,29
- Очень слабая – меньше 0,19

Статистическая обработка данных проводилась на ЭВМ с помощью пакетов статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft, Inc.) и электронных таблиц Excel 2007 (Microsoft, Corp.) под управлением Windows 8.0 (Microsoft, Corp.). Достоверными считались различия при  $p \leq 0,05$ .

### **ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ И АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БОЛЬНЫХ С АЛКОГОЛЬНЫМ ГЕПАТИТОМ**

#### **3.1. Изменения клинической картины при алкогольном гепатите и применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

В ходе нашей работы на основании комплексных исследований осуществлен анализ объективных и субъективных признаков при алкогольном гепатите (АГ) на фоне базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Такой клинический признак, как общая утомляемость после базисного лечения не наблюдался у 82,1% больных (Таблица 4). Диспепсические расстройства, включающие тошноту, отрыжку, рвоту, диарею, исчезали у 46,4% пациентов по сравнению с данными, полученными до лечения. Такие клинические признаки, как желтушность кожных покровов и кожный зуд, возникающие в результате повышения уровня общего билирубина, не наблюдались после базисного лечения, включающего гепатопротекторы, у 57,1% и 57,0% больных, соответственно. Болезненность в правом подреберье уменьшалась у 50% пациентов по сравнению с данными, полученными до проведения лечения. Очевидно, силимарин, являющийся основным компонентом карсила, способствовал стабилизации мембран гепатоцитов. Это согласуется с данными, в соответствии с которыми силимарин может тормозить действие фосфодиэстеразы, способствуя замедлению распада цАМФ и уменьшению концентрации внутриклеточного кальция в гепатоцитах, что снижает кальций-зависимую активацию фосфолипаз. Метаболическое действие силимарина состоит также в стимуляции синтеза протеинов и ускорении регенерации поврежденных гепатоцитов. Имеются сведения, что силимарин может стимулировать РНК-полимеразу I в клеточном ядре и активировать транскрипцию

и скорость синтеза РНК, а, следовательно, и белка, в клетках печени [375, 492]. Эссенциальные препараты способствуют активации, расположенных в мембране фосфолипидзависимых ферментов и транспортных белков, что, в свою очередь, оказывает поддерживающее влияние на обменные процессы в клетках печени, обеспечивая повышение ее детоксикационного и экскреторного потенциала. Эссенциальные фосфолипиды, как известно, способны нейтрализовать нитриты и продукты перексидного окисления липидов. Очевидно, это может приводить к улучшению клинической картины при алкогольной болезни печени [171,196].

Таблица 4. Изменение общего состояния больных с алкогольным гепатитом на фоне базисного лечения

Клинические симптомы	1-ая группа (базисная терапия)			
	Количество больных (n=28)			
	До лечения		После лечения %	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	24	85,7	10	35,8
Диспепсия	18	64,3	5	17,9
Пожелтение кожных покровов и слизистых оболочек	18	64,3	2	7,2
Кожный зуд	19	67,8	3	10,8
Гепатомегалия	26	92,6	26	92,6
Субфебрильная температура	13	46,4	1	3,6
Покраснение ладоней	17	60,7	15	53,6
Тремор пальцев рук	26	92,6	12	42,8
<b>Субъективные признаки</b>				

Общая утомляемость	28	100	5	17,9
Нарушение поведения	26	92,6	6	21,4
Нарушение памяти и внимания	20	71,4	5	17,9
Нарушение сна	27	96,4	4	14,3

Такой клинический симптом, как гепатомегалия после базисного лечения гепатопротекторами не изменялся. Субфебрильная температура уменьшалась у 42,8% больных. Покраснение ладоней после базисного лечения изменялось незначительно. Очевидно, при базисной терапии не происходило существенного исчезновения артериовенозных анастомозов, приводящих к проявлению данного клинического симптома. Тремор пальцев рук, развивающийся в результате повышения активности нервной системы и приводящий к повторяющимся сокращениям и расслаблениям мышц, исчезал у 50% пациентов, что связано с временным прекращением употребления алкоголя и восстановлением работы нервной системы. Проявление таких клинических признаков, как нарушение поведения, памяти и внимания, сна снижалось у 71,2%, 53,5% и 82,1% больных соответственно, по сравнению с результатами, полученными до лечения. Это свидетельствует об уменьшении выраженности абстинентного синдрома после проведения стандартного лечения, включающего прием не только гепатопротекторов, но и седативной и метаболической терапии. Таким образом, после базисной терапии общая клиническая эффективность составила 56,2%

В первой группе больных АГ до лечения средние значения систолического АД составляли 145,6 мм рт. ст., диастолического АД – 91,5 мм рт. ст. При проведении базисной терапии наблюдалось снижение артериального давления. Так, после лечения средние значения систолического АД были 134,4 мм рт. ст., диастолического АД – 79,4 мм рт. ст. (во всех случаях  $p > 0,05$ ). Число сердечных сокращений при поступлении пациентов в стационар составляло в среднем 92,2 ударов в минуту, после проведения терапии наблюдалось уменьшение

клинического показателя до 78,9 ударов в минуту. Используемые препараты благоприятно влияли на артериальное давление и сердечную деятельность у больных с АГ за счет своих гипотензивных эффектов.

Таблица 5. Влияние эпифамина на общее состояние больных с алкогольным гепатитом на фоне базисной терапии

Клинические симптомы	2-я группа (комбинированная терапия с эпифамином)			
	Количество больных (n=22)			
	До лечения		После лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
	<b>Объективные признаки</b>			
Болезненность в правом подреберье	19	86,4	6	27,3
Диспепсия	14	63,6	3	13,6
Пожелтение кожных покровов и слизистых оболочек	14	63,6	2	9,2
Кожный зуд	13	59,1	2	9,2
Гепатомегалия	20	90,9	20	90,9
Субфебрильная температура		45	1	4,6
Покраснение ладоней	13	59,1	11	50
Тремор пальцев рук	20	90,9	7	31,8
	<b>Субъективные признаки</b>			
Общая утомляемость	22	100	2	9,2
Нарушение поведения	20	90,9	3	13,6
Нарушение памяти и внимания	16	72,7	2	9,2
Нарушение сна	21	95,5	1	4,6



Из результатов, представленных в таблице 5, видно, что после комбинированного лечения с эпифамином происходило уменьшение общей утомляемости у 90% больных. Диспепсические расстройства исчезали у 50% пациентов по сравнению с данными, полученными до лечения. Клинические признаки – желтушность кожных покровов и кожный зуд, снижались после приема гепатопротекторов и эпифамина у 55% и 50% больных соответственно. Болезненность в правом подреберье уменьшалась у 60% пациентов по сравнению с данными, полученными до лечения. Такие клинические симптомы, как снижение массы тела, увеличение печени и селезенки после проведенного комбинированного лечения не изменялись, что, по-видимому, связано с хроническим течением алкогольного гепатита и глубокими нарушениями метаболизма. Субфебрильная температура уменьшалась у 40% больных. По-видимому, эпифамин, в свою очередь, корригировал уровень мелатонина, обладающего выраженными антиокислительными свойствами, что усиливало антиоксидантную систему организма и благоприятно влияло на течение воспалительного процесса при алкогольном гепатите. Такой клинический признак, как покраснение ладоней, после комбинированного лечения с эпифамином изменялся незначительно (на 10%). Тремор пальцев рук исчезал у 60% пациентов, что вероятно, связано с позитивным действием эпифамина на деятельность нервной системы. Проявление таких клинических признаков, как нарушение поведения, памяти и внимания, сна снижалось у 60%, 75% и 90% больных соответственно, по сравнению с результатами, полученными до лечения. По-видимому, стимуляция секреции и синтеза мелатонина усиливала действие седативных препаратов при абстинентном синдроме. Следует отметить, что мелатонин обладает выраженным снотворным и антидепрессивным действием [15]. Таким образом, после комбинированной терапии с эпифамином общая клиническая эффективность лечения больных хроническим алкогольным гепатитом составила 65,1%, что выше, чем в первой группе больных (56,2%).

Во второй группе больных с АГ до проведения лечения средние значения систолического АД составляли 141,4 мм рт. ст., диастолического АД – 91,4 мм рт. ст. При проведении комбинированной терапии с эпифамином происходило снижение артериального давления. Так, после лечения средние значения систолического АД были 130,1 мм рт. ст., диастолического АД – 85,2 мм рт. ст. Число сердечных сокращений при поступлении пациентов в стационар составляло в среднем 94,6 удара в минуту, после проведения данной терапии наблюдалось уменьшение клинического показателя до 80,3 ударов в минуту. Существенных различий в показателях АД и числа сердечных сокращений после проведения комбинированной терапии с эпифамином по сравнению со стандартным лечением не наблюдалось.

По данным электрокардиографического исследования у больных первой и второй групп отмечались патологические изменения в миокарде: гипертрофия миокарда левых отделов сердца (45,7%), нарушение проводимости по ножкам пучка Гиса (19,2%). Существенных изменений показателей электрокардиографического исследования у пациентов данных групп после проведенного базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином не наблюдалось.

Таблица 6. Влияние мелаксена на общее состояние больных с алкогольным гепатитом на фоне базисной терапии.

Клинические симптомы	3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном)			
	Количество больных (n=24)			
	До лечения		После лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	20	84	5	21

Диспепсия	16	67,2	3	12,6
Пожелтение кожных покровов и слизистых оболочек	16	67,2	2	8,4
Кожный зуд	15	62,5	2	8,4
Гепатомегалия	21	88,2	21	88,2
Субфебрильная температура	11	46,2	1	4,2
Покраснение ладоней	15	62,5	11	45,8
Тремор пальцев рук	22	92,4	5	21
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	24	100	2	8,4
Нарушение поведения	22	92,4	2	8,4
Нарушение памяти и внимания	17	71,4	2	8,4
Нарушение сна	23	96,6	1	4,2

После комбинированного лечения с мелаксеном в третьей группе больных диспепсические расстройства исчезали у 54,6% по сравнению с данными, полученными до лечения (Таблица 6). Такие клинические признаки, как желтушность кожных покровов и кожный зуд не наблюдались у 58,8% и 54,6% соответственно. Болезненность в правом подреберье уменьшалась у 63% пациентов по сравнению с данными, полученными до проведения лечения. Такой клинический симптом, как гепатомегалия после базисного лечения с применением мелаксена сохранялся, что связано с хроническим применением алкогольсодержащих напитков. Субфебрильная температура уменьшалась у 42% больных. Такой клинический признак, как покраснение ладоней после лечения изменялся незначительно, также как в первой группе. Тремор пальцев рук исчезал

у 71,4% пациентов. Общая утомляемость уменьшалась у 91,6% больных. Проявление таких клинических признаков, как нарушение поведения, памяти и внимания, сна снижалось у 84%, 63% и 92,4% больных соответственно по сравнению с результатами, полученными до лечения. Таким образом, после проведения комбинированной терапии с мелаксеном в течение 10 дней у больных АГ общая клиническая эффективность лечения составила 74,3%.

В третьей группе пациентов с АГ до проведения лечения средние значения систолического АД составляли 149,7 мм рт. ст., диастолического АД – 92,2 мм рт. ст. При проведении комбинированной терапии гепатопротекторами, блокаторами ангиотензин-превращающего фермента и/или  $\beta$ -адреноблокаторами и мелаксеном происходило снижение артериального давления. После комбинированного лечения систолическое АД уменьшалось на 14,6%, диастолическое АД – на 13,1%, то есть более значительно, чем в предыдущих группах. Так, после лечения средние значения систолического АД были 129,2 мм рт. ст., диастолического АД – 80,2 мм рт. ст. Число сердечных сокращений при поступлении пациентов в стационар составляло в среднем 95,6 удара в минуту, после проведения терапии наблюдалось уменьшение данного клинического показателя до 77,3 ударов в минуту. Имеются данные, что мелатонин может сокращать длительность желудочковой тахикардии, а также обладает почти нейтральным эффектом в отношении параметров гемодинамики и коронарного кровотока [599]. Наличие циркадианной ритмики артериального и центрального венозного давления у людей свидетельствует об участии мелатонина и в регуляции функций сердечно-сосудистой системы. В пользу этого говорит также присутствие рецепторов к мелатонину в мышечном слое и эндотелии сосудов. Механизмы, посредством которых мелатонин оказывает влияние на сосудистый тонус, могут включать: связывание данного гормона с собственными рецепторами гладкомышечных клеток и эндотелия сосудов, воздействие на адренергические и пептидергические (вазоактивный интестинальный пептид и субстанция Р) окончания периваскулярных нервов, на адренергические рецепторы или

вторичные мессенджеры в цепи адренергической стимуляции мышечного сокращения, блокирование серотонинергической стимуляции гладкомышечного сокращения, ингибирование секреции серотонина структурами центральной нервной системы и тромбоцитами, вазопрессина гипоталамусом и норадреналина надпочечниками [365,667]. Таким образом, после проведения комбинированной терапии с мелаксеном по сравнению с базисным лечением и терапии с эпифамином наблюдалась более заметная тенденция к снижению АД у больных АГ. По-видимому, для коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина требуется более продолжительное время по сравнению с мелаксеном, в состав которого непосредственно входит мелатонин. При приеме мелаксена мелатонин, по-видимому, достаточно быстро связывается с рецепторами гладкомышечных клеток и эндотелия сосудов и более позитивно влияет на метаболические процессы в миокарде.

У всех групп больных с АГ в стадии обострения до проведения терапии при ультразвуковом исследовании (УЗИ) печени определялось диффузное изменение печени, которое регистрировалось и после проведения базисного и комбинированного лечения в стационаре.

Таким образом, полученные нами результаты исследования воздействия комбинированной терапии, включающей эпифамин или мелаксен, у больных с алкогольным поражением печени свидетельствуют о благоприятном влиянии данных препаратов на общее состояние пациентов, что патогенетически обоснованно. Очевидно, применение мелатонин-корректирующих препаратов способствует более быстрой клинической ремиссии больных АГ. Следует отметить, что при анализе влияния препаратов, корректирующих уровень мелатонина, на нарушения сердечно-сосудистой системы в течение времени клинического исследования был выявлен положительный эффект, как на показатели АД, так и на число сердечных сокращений. Побочных эффектов при применении эпифамина или мелаксена на фоне базисной терапии алкогольного гепатита не наблюдалось.

Таблица 7. Влияние эпифамина и мелаксена на показатели артериального давления и частоту сердечных сокращений у больных с алкогольным гепатитом на фоне базисной терапии.

Показатели	Единицы измерения	1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-я группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
АД (систолическое)	мм рт. ст.	145,6 ±8,6*	134,4 ±3,8	143,4±8,1*	130,1±4,9	149,7± 8,3*	129,2± 5,2**
АД (диастолическое)	мм рт. ст.	91,5±8,5*	79,4±5,6	91,4±4,6*	85,2±4,8	92,2±4,8*	80,2±4,2**
ЧСС	ударов в минуту	92,2±2,8*	78,9±3,1**	94,6±6,6*	80,3±3,7**	95,6 ±5,6*	77,3±2,3**,#

Примечание: достоверность значений ( $p < 0,05$  (\*)) - по сравнению с нормой, (\*\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Оценка показателей общего анализа крови у пациентов с АГ не выявила существенных различий при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с препаратами, корригирующими уровень мелатонина (Таблица 8).

Состав нейтрофилов соответствовал верхней границе нормы, что характеризовало тяжесть процесса при АГ. Однако, после проведения как базисного лечения, так и комбинированного лечения с эпифамином или мелаксеном значительных изменений не наблюдалось.

При оценке биохимического анализа крови во всех группах не было отмечено существенных различий в изменении уровня глюкозы (Таблица 9). Во всех группах больных с АГ было выявлено повышение уровня липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и общего холестерина в среднем в 1,1 и 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. В первой группе пациентов, находящихся на базисном лечении, происходило уменьшение уровня ЛПНП и общего холестерина на 8,4 % и 6,0 % соответственно. Таким образом, под действием базисной терапии происходило незначительное снижение параметров, характеризующих состояние липидного обмена. Из литературных данных известно, что гепатопротекторы обладают положительным действием при гиперлипидемии [591]. Во второй группе больных после комбинированной терапии с эпифамином происходило уменьшение содержания ЛПНП на 14,3% и холестерина на 11,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами, полученными до лечения. В третьей группе больных после комбинированной терапии с мелаксеном происходило уменьшение содержания ЛПНП на 31,9% и холестерина на 11,2% ( $U, p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. По-видимому, комбинированная терапия с эпифамином или мелаксеном положительно влияла на липидный обмен за счет гиполипидемического действия препаратов. Уровень содержания мочевины у больных с алкогольным гепатитом во всех группах был выше нормы в среднем на 32,6 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с верхней границей нормы (6,4 ммоль/л) (табл. 5). Это связано с повышением уровня аммиака при АГ и, как следствие, увеличением содержанием мочевины в крови.

Таблица 8. Влияние эпифамина и мелаксена на показатели общего анализа крови у больных с алкогольным гепатитом на фоне базисной терапии.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа (n=27)	1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-я группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Гемоглобин	г/л	134,0±7,4	123,0±7,9	127,1±7,6	133,9±8,3	126,3±6,7	132,7±7,9	129,5±6,8
Эритроциты	×10 <sup>12</sup>	4,2±0,2	4,1 ±0,4	3,8±0,3	4,2±0,5	3,8±0,7	4,3±0,6	4,1±0,5
Лейкоциты	×10 <sup>9</sup>	4,9±0,5	6,4 ±0,7*	7,1±0,8	6,9±0,8*	6,4±0,9	6,9±0,7*	6,5±0,8
Эозинофилы	% в 1мкл	2,4±0,3	1,6±0,7	1,5±0,6	1,2±0,5	1,7±0,5	0,9±0,3	1,2±0,5
Лимфоциты	% в 1мкл	31,7±2,2	27,7±3,2	29,3± 1,7	26,9± 2,2	33,1± 1,3	25,7±1,6	37,8±1,5
Моноциты	% в 1мкл	6,2±1,5	5,8± 1,6	5,3±0,6	5,9±2,9	5,7±2,7	5,5±0,9	5,6±1,9
Нейтрофилы:								
Сегментоядерные	% в 1мкл	57,8±4,2	60,6± 4,6	58,6±2,7	59,5± 4,6	56,2±3,2	64,3±4,5	59,2±4,0
Палочкоядерные	% в 1мкл	1,1±0,2	5,1 ±1,1*	3,0±1,1	3,8±1,9*	3,9±1,2	3,1±1,3*	3,4±1,4
СОЭ	мм/ч	6,7±1,8	10,9± 2,9*	7,3± 2,4	14,9±3,8*	8,2±2,2	10,7±3,1*	7,4±1,3

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.



Таблица 9. Влияние эпифамина и мелаксена на биохимические показатели анализа крови у больных с алкогольным гепатитом на фоне базисной терапии.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа (n=65)	1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Глюкоза	ммоль/л	4,8±0,8	4,6±0,3	4,2±0,2	4,9±0,6	4,4±0,3	4,5±0,2	4,3±0,4
Альбумин	г/л	35-50	41,7± 2,1	40,7± 1,7	40,3±1,9	41,2±2,3	41,7±2,7	41,2± 1,6
Мочевина	ммоль/л	2,5-6,4	9,2± 0,8*	8,9± 0,7	9,1±0,5*	8,0±0,3**	10,1± 1,2*	7,7± 0,4**,#
ЛПНП	ммоль/л	1,7-4,5	4,8±0,3*	4,4± 0,2	4,9± 0,3*	4,2±0,2	4,7± 0,2*	3,2± 0,3**,#
Холестерин	ммоль/л	4,1±0,2	5,0±0,2*	4,7±0,2	5,1±0,4*	4,5±0,2**	5,2±0,4*	4,2±0,2**,#
ГГТП	мкат/л	0,88±0,33	3,4±0,2*	1,6±0,2**	3,2±0,3*	1,3±0,1**,#	3,3±0,3*	1,2±0,1**,#
АлАт	нмоль (с.л.)	95,9±13,7	241,6±19,3*	161,8±11,2**	239,4±16,9*	145,5±11,8**,#	256,1±14,6*	145,1±11,3**,#
АсАт	нмоль (с.л.)	52,5±7,3	151,6±10,8*	108,9±6,1**	147,4±9,3*	99,1±4,3**,#	152,2±10,4*	99,3±4,2**,#
Щелочная фосфатаза	ЕД/л	<270	105±8,8	101±7,8	107±9,6	100±7,3	103±8,5	96±7,4
Общий билирубин	мкмоль/л	9,6±2,7(8,5-20,5)	20,3±5,2	18,4±2,8	20,1±3,8	15,5±4,5**	20,4±3,8*	17,3±4,9**
Тимоловая проба	Ед.	2,5±0,4	4,1±0,5*	3,4±0,3	4,2±0,4*	3,1±0,3**	4,1±0,6*	2,7±0,3**
Холинэстераза	Мкат/л	77,6±20,2(76-230)	471,5±39,4*	288,6±28,9**	470,1±40,3	199,1±26,7**,#	475,6±38,8*	169,1±27,7**,#
ПТИ	%	80-110	90,8±4,8	97,5±4,3	91,2±3,8	100,1±4,1	98,6±2,8	91,5±3,3

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

После проведения базисного лечения данный показатель снижался незначительно на 3,3%. После комбинированного лечения с эпифамином уровень мочевины в крови уменьшался на 12,1% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными, полученными до лечения. В третьей группе пациентов после комбинированного лечения с мелаксеном этот показатель уменьшался на 23,8% (U,  $p < 0,05$ ). Нельзя исключить, что мелатонин, коррекция уровня которого происходила под действием данных препаратов, проявлял в данном случае гипоазотемическое действие, что приводило к снижению содержания мочевины в сыворотке крови больных. Известно, что мелатонин обладает нефропротективным действием и может снижать уровень креатенина и мочевины сыворотки крови в эксперименте [584].

Состояние функции печени у больных первой, второй и третьей групп до лечения по сравнению с контрольной группой характеризовалось возрастанием уровня активности АлАт в среднем в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с верхней границей нормы (189 нмоль(с.л.)). Для активности АсАт также было характерно увеличение в крови больных в среднем в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с верхней границей нормы (125 нмоль(с.л.)). Данные биохимические показатели подтверждают, что при АГ у больных происходило нарушение метаболизма и повреждение гепатоцитов, что сопровождалось цитолизом клеток и выходом в кровь аминотрансфераз. После базисного лечения в первой группе больных, находящихся на базисной терапии, происходило уменьшение активности АлАт и АсАт в 1,5 ( $p < 0,05$ ) и 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Данные показатели подтверждают гепатопротекторное действие базисной терапии. Во второй группе пациентов, находящихся на комбинированной терапии с использованием эпифамина, происходили более выраженные изменения аминотрансфераз: уровень АлАт уменьшался в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а уровень АсАт (U,  $p < 0,05$ ) в 1,5 раза. В третьей группе больных, находящихся на комбинированной терапии с использованием мелаксена, происходило уменьшение активности АлАт и АсАт в среднем в 1,8 (U,  $p < 0,05$ ) и 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза соответственно. У больных всех групп до лечения активность ГГТП была повышена в среднем в 3,8 раза ( $p < 0,05$ )

по сравнению с контрольной группой (Таблица 9). После базисного лечения происходило уменьшение активности ГГТП в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ). Во второй группе пациентов, получавших комбинированную терапию с эпифамином, активность ГГТП снижалась в 2,5 (U,  $p < 0,05$ ) раза. В третьей группе при комбинированном лечении с мелаксеном – в 2,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Тимоловая проба в сыворотке крови у больных всех групп была выше в среднем на 5% перед лечением (норма 0-4 ед.). После проведения базисного лечения в первой группе пациентов происходило уменьшение тимоловой пробы на 17,1%, во второй группе больных, находящихся на комбинированном лечении с эпифамином, – на 26,2% ( $p < 0,05$ ), в третьей группе при комбинированном лечении с мелаксеном тимоловая проба снижалась на 34,1% ( $p < 0,05$ ). Активность ХЭ в сыворотке крови больных АГ была увеличена в 6,1 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольной группой. После базисного лечения активность ХЭ изменялась в сторону нормы, снижаясь в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза. После комбинированной терапии с эпифамином уровень активности ХЭ уменьшался в 2,4 (U,  $p < 0,05$ ) раза, после комбинированного лечения с мелаксеном – в 2,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза.

Таким образом, применение препаратов, корригирующих уровень мелатонина, у больных с АГ в стадии обострения оказывало благоприятное влияние на показатели общего, биохимического анализов крови, в частности, показатели липидного обмена и печеночные пробы, отражающие нарушение печеночной функции. Вероятно, за счет своей антиоксидантной активности мелатонин, коррекция содержания которого происходила после приема эпифамина или мелаксена, усиливал гепатопротекторное и антиокислительное действие базисной терапии. Побочных эффектов при применении эпифамина или мелаксена на фоне базисной терапии АГ выявлено не было.

### **3.2. Состояние иммунного статуса при алкогольном гепатите и применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

Согласно современным представлениям, в патогенезе хронического алкоголизма важную роль играют нарушения, возникающие в организме в результате включения алкоголя и продуктов его метаболизма в обменные процессы. Эти нарушения имеют место в различных физиологических системах организма, в том числе в иммунной. К основным изменениям иммунной системы при хроническом алкоголизме можно отнести угнетение Т- и дисрегуляцию В-зависимых иммунных реакций с увеличением уровня иммуноглобулинов, уменьшение уровня моноцитов (макрофагов) и подавление их функциональной активности, падение содержания в сыворотке крови лизоцима и комплемента [102].

Поскольку употребление алкоголя сопровождается серьезными повреждениями эпителия желудочно-кишечного тракта, то все эти процессы сопровождаются проникновением кишечных токсинов и пищевых аллергенов во внутреннюю среду организма. Алкоголь как цитотоксическое вещество воздействует на жизненно важные органы и системы в организме, в том числе и на печень, вызывая развитие хронического гепатита. Реагирующий на эти негативные последствия приема алкоголя В-зависимый гуморальный иммунитет становится неуправляемым из-за избыточного образования иммуноглобулинов разных классов. Это сопровождается замедленным разрушением иммунных белков в печени, в результате чего они накапливаются в сыворотке крови. Клетки различных органов испытывают на себе иммунную атаку и токсическое действие этилового спирта одновременно. Таким образом, изменения в работе иммунной системы, обладающей высокой чувствительностью к алкогольной интоксикации, могут приводить к нарушениям других систем организма, усугублению текущего процесса, развитию осложнений, в основе которых лежат агрессивные иммунопатологические реакции.

Проведенные нами исследования выявили существенные изменения ряда показателей иммунного статуса у больных АГ – IgA, IgM, IgG, а также содержания ЦИК. У большинства обследованных пациентов отмечалось

повышенное содержание ЦИК. Так, у пациентов первой, второй и третьей группуровень ЦИК превышал значение в контрольной группе в среднем 4,7 ( $p < 0,05$ ) раза. Как известно, патологические реакции на иммунные комплексы могут быть обусловлены повышением скорости их образования по сравнению со скоростью элиминации, дефицитом одного или нескольких компонентов комплемента или функциональными дефектами фагоцитарной системы [158]. Выявленная высокая концентрация ЦИК в крови у больных АГ свидетельствует о глубоком поражении макрофагов печени, что приводит к развитию хронического эндотоксикоза и иммунокомплексного синдрома.

Обнаруженные иммунопатологические сдвиги вызывают необходимость включения в программу лечения больных АГ иммуномодулирующих и антиоксидантных препаратов. В ходе наших исследований был осуществлен анализ воздействия эпифамина и мелаксена на содержание ЦИК в сыворотке крови пациентов с АГ. Включение мелатонин-корректирующих препаратов в комплексную терапию обеспечивало более существенное снижение уровня ЦИК по сравнению с базисным лечением. Так, после проведения базисной терапии в первой группе больных содержание ЦИК снижалось в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с соответствующим показателем до лечения (Таблица 10). Во второй группе пациентов после комбинированного лечения, включающего эпифамин, уровень ЦИК уменьшался в 2,1 ( $U, p < 0,05$ ) раза. В третьей группе больных, получавших комбинированное лечение с мелаксеном, содержание ЦИК снизилось в 2,8 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Можно предположить, что более значительное изменение содержания ЦИК в крови больных АГ по сравнению с уровнем иммуноглобулинов могло быть связано в определенной степени с изменением степени avidности антител. Имеются данные, что образование антител с аномальной конформацией при некоторых патологических состояниях может приводить к ряду последствий, среди которых наиболее важным в патогенетическом отношении являются образование с антигеном длительно циркулирующих в крови ЦИК [271].

В соответствии с результатами наших исследований у больных АГ во всех группах имела место гипериммуноглобулинемия А, М, G. Так, уровень IgA возрастал в среднем в 1,7 ( $p < 0,05$ ), IgM – в 1,2 ( $p < 0,05$ ), IgG – в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе. Проведение базисного лечения сопровождалось уменьшением содержания IgA на 6,6%. Комбинированная терапия с эпифамином обеспечивала снижение уровня данного иммуноглобулина на 19,1% (U,  $p < 0,05$ ). При приеме мелаксена на фоне стандартного лечения происходило уменьшение содержания IgA на 21,3% (U,  $p < 0,05$ ). Уровень IgG после проведения базисного лечения оставался высоким. Проведение базисной терапии приводило к его снижению лишь на 5,3% ( $p < 0,05$ ). После комбинированного лечения с эпифамином наблюдалась тенденция к уменьшению содержания данного иммуноглобулина на 6,1% ( $p < 0,05$ ), после терапии, включающей мелаксен – на 8,3% (U,  $p < 0,05$ ). Уровень IgM снижался при проведении базисного лечения на 6,4% ( $p < 0,05$ ). После комплексной терапии с эпифамином также наблюдалось уменьшение – на 6,8% ( $p < 0,05$ ), после приема мелаксена на фоне базисной терапии – на 8,2% ( $p < 0,05$ ). Таким образом, под действием мелатонин-корректирующих препаратов происходило изменение содержания иммуноглобулинов в сторону нормы, что согласуется с имеющимися данными о тесной взаимосвязи иммунной системы с нейроэндокринной системой, неотъемлемой составляющей которой является эпифиз и синтезируемые им гормоны [73, 261].

Полученные результаты соотносятся с литературными данными относительно иммуномодулирующих свойств мелатонина [161]. Согласно имеющимся сведениям, известны следующие факты взаимодействия мелатонина и иммунной системы. Присутствие рецепторов к мелатонину определено на мембранах человеческих лимфоцитов [458] и нейтрофилов, а также лейкоцитах, нейтрофилах и иммунокомпетентных клетках тимуса и селезенки [330, 628, 629].

Таблица 10. Изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов у пациентов с АГ при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Ig A	г/л	2,88±0,12	4,84±0,18*	4,52±0,14**	4,94±0,19*	4,01±0,10**,#	4,98±0,15*	3,89±0,13**,#
Ig M	г/л	1,81±0,05	2,10±0,08*	1,92±0,04**	2,12±0,09*	1,93±0,04**	2,19±0,08*	1,91±0,03**
Ig G	г/л	14,08±0,52	18,22±0,46*	17,26±0,21**	18,28±0,41*	16,93±0,16**	18,21±0,044*	16,61±0,20**,#
ЦИК	усл. ед.	72,3±2,6	332,5±4,6*	195,6±3,2**	333,6±4,9*	161,8±3,0**,#	339,8±4,57*	121,4±2,9**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

В основе иммуномодулирующих эффектов мелатонина может быть несколько механизмов: прямое воздействие через специфические рецепторы: MT1, MT2 и MT3 на функцию лимфоидных органов и клеточных элементов крови [394], а также опосредованное влияние через мобилизацию опиоидных механизмов и модификацию выработки кортикостероидов корой надпочечников [161].

В целом, полученные результаты свидетельствуют, что при применении комплексного лечения с мелатонин-корректирующими препаратами у пациентов, страдающих АГ, изменения иммунного статуса носят более благоприятный характер, что выражается в более существенном снижении уровня ЦИК, а также Ig A, IgM, IgG в сравнении с показателями больных, находившихся на базисной терапии.

### **3.3. Воздействие эпифамина и мелаксена на содержание б-сульфатоксимелатонина в организме пациентов с алкогольным гепатитом**

Известно, что б-сульфатоксимелатонин является основным продуктом превращения мелатонина в организме человека, и оценка его уровня в моче может служить объективным критерием содержания мелатонина в организме [304]. Согласно результатам проведенных нами исследований, содержание б-сульфатоксимелатонина в первой группе больных АГ было снижено в среднем в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза. Очевидно, это является следствием дисбаланса между активностью систем, реализующих развитие оксидативного стресса, с одной стороны, и активностью стресс-лимитирующих систем, – с другой. Существует мнение, что токсическое действие этанола опосредовано усилением СО биомолекул, являющимся следствием химической агрессивности ацетальдегида [307]. В то же время с нарушением СО связывают повреждение многих белков, в том числе ферментов [299, 593]. В условиях чрезмерной генерации АФК мелатонин, очевидно, может активно функционировать в качестве скавенджера активных кислородных метаболитов, превращаясь в различные продукты: 3-гидроксимелатонин, N[1]-ацетил-N[2]-формил-5-метоксикинумарин и



другие. После проведения базисного лечения уровень 6-сульфатоксимелатонина возрастал в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунок 4). Повышение содержания мелатонина в организме пациентов, по-видимому, было сопряжено с благоприятным влиянием гепатопротекторов и метаболической терапии, сопровождающемся положительными сдвигами в состоянии свободнорадикального гомеостаза.

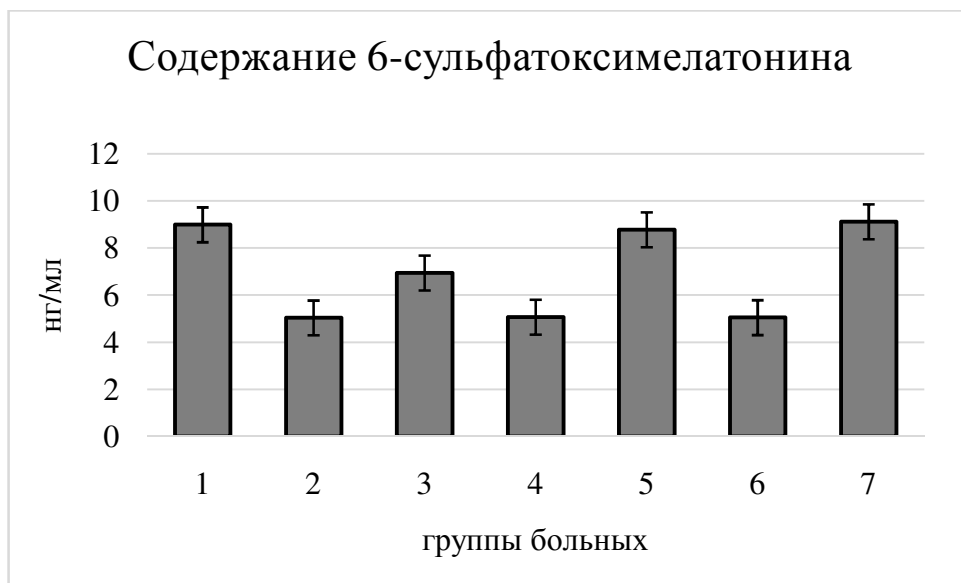


Рисунок 4. Содержание 6-сульфатоксимелатонина в моче пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Во второй и третьей группах больных АГ наблюдались сходные изменения содержания 6-сульфатоксимелатонина относительно контроля в сравнении с первой группой. Применение эпифамина на фоне базисной терапии приводило к возрастанию уровня 6-сульфатоксимелатонина в 1,7 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза. Комбинированное лечение, включающее прием мелаксена, сопровождалось повышением содержания 6-сульфатоксимелатонина в 1,8 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза. Таким образом, при использовании мелатонин-корректирующих препаратов наблюдалось

приближение содержания основного метаболита мелатонина, являющегося критерием оценки уровня гормона в организме, к контрольным значениям.

### **3.4. Анализ воздействия мелатонин-корректирующих препаратов на интенсивность свободнорадикальных процессов у больных с алкогольным гепатитом**

#### **3.4.1. Влияние эпифамина и мелаксена на параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови пациентов с алкогольным гепатитом**

Поскольку важным фактором в патогенезе АГ может быть окислительный стресс, то в этой связи для определения интенсивности СО и общей антиоксидантной активности был применен метод БХЛ.

В сыворотке крови больных первой группы, находящихся на базисном лечении, перед применением гепатопротекторов и метаболической терапии такие параметры БХЛ, как S и I<sub>max</sub>, отражающие интенсивность СО биомолекул, были выше в 2,6 (p<0,05) и 2,9 (p<0,05) раза, соответственно, по сравнению с нормой (Таблица 11). Это указывало на то, что при алкогольном поражении печени происходила значительная интенсификация ПОЛ. Известно, что в гепатоцитах этанол превращается в ацетальдегид главным образом под действием цитозольного фермента алкогольдегидрогеназы, микросомального фермента цитохрома P-450 2E1 (CYP2E1) и, в определенной степени, пероксисомальной каталазы [381, 382]. Ацетальдегид превращается в ацетат. АФК, возникающие при функционировании CYP2E1, вызывают ПОЛ и образование белковых карбониллов. Продукты ПОЛ могут соединяться с ацетальдегидом и протеинами с образованием неоантигенов, которые способны стимулировать аутоиммунный ответ. Такой показатель как tg $\alpha_2$ , отражающий степень функционирования антиоксидантной системы организма, был ниже в 1,3 (p<0,05) раза по сравнению с соответствующим значением в норме, что свидетельствовало о снижении антиоксидантного потенциала организма больных.

После проведения базисного лечения наблюдалось уменьшение  $S$  в 1,2 раза и  $I_{\max}$  в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза. При этом  $tg\alpha_2$  возрастал в среднем на 23,4% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, на фоне приема гепатопротекторов происходило снижение выраженности окислительного стресса, сопряженное с повышением активности АОС организма. Вероятно, это было связано с антиоксидантным действием силимарина и эссенциальных фосфолипидов, входящих в состав гепатопротекторов.

В сыворотке крови больных второй группы перед проведением терапии параметры БХЛ имели значения подобные показателям в первой группе, свидетельствующие о развитии окислительного стресса. После проведения комбинированного лечения с эпифамином происходило уменьшение  $S$  и  $I_{\max}$  в среднем в 1,2 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) и 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Величина  $tg\alpha_2$  увеличивалась на 30,9% ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, на фоне приема эпифамина происходило более значительное снижение интенсивности СО и возрастание активности АОС организма, чем у больных, получавших базисное лечение. По-видимому, под действием эпифамина происходила коррекция эндогенной концентрации мелатонина, что способствовало улучшению антиоксидантного статуса пациентов путем позитивного воздействия на свободнорадикальный гомеостаз организма.

В третьей группе больных перед проведением лечения параметры БХЛ, также имели подобные значения в сравнении с первой и второй группами больных (Таблица 11). После проведения комбинированной терапии с мелаксеном параметры  $S$  и  $I_{\max}$  уменьшались в 1,3 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) и 1,8 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза соответственно, по сравнению с результатами, полученными до лечения. Величина  $tg\alpha_2$  увеличивалась на 43,7% ( $U$ ,  $p < 0,05$ ), что выше показателей, полученных в первой и второй группах пациентов.

Таблица 11. Изменения показателей биохемилюминесценции у больных с алкогольным гепатитом при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели БХЛ	Контрольная группа	Группы больных					
		1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
S	279,9±10,2	738,1±21,5*	608,1±12,5**	739,6±20,6*	592,9±12,8**,#	739,1±22,2*	518,7±13,2**,#
Imax	47,1±2,3	140,5±6,8*	92,4±3,1**	142,1±6,6*	88,3±2,5**	141,6±6,9*	77,7±2,3**,#
tga2	32,9±1,5	25,6±1,1*	31,5±1,2**	25,4±1,2*	34,1±1,2**,#	25,5±1,0*	36,7±1,5**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # – достоверность по сравнению с базисным лечением.

Очевидно, мелатонин, входящий в состав данного препарата, достаточно эффективно воздействовал на СО биомолекул в гепатоцитах, проявляя свои антиоксидантные свойства, что и приводило к более выраженному повышению активности антиоксидантной системы, по сравнению с данными, полученными в предыдущих группах больных, за счет непосредственного антиокислительного действия мелатонина на АФК.

### **3.4.2 Влияние эпифамина и мелаксена на содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом**

Известно, что при алкогольной интоксикации происходит увеличение содержания продуктов ПОЛ, что характеризует развитие окислительного стресса и дисбаланс в антиоксидантном звене организма [391].

Перед лечением во всех группах больных наблюдалось повышение содержания ДК, являющихся первичными продуктами ПОЛ, в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с результатами, полученными в контрольной группе. Это свидетельствовало об интенсификации СО биомолекул при алкогольном поражении печени (Рис. 5). Согласно имеющимся данным, прием этанола приводит как к высвобождению митохондриального цитохрома С, так и экспрессии Fas лиганда, что ведет к печеночному апоптозу. При индуцировании данного механизма увеличивается выработка АФК и угнетение АОС организма, что в свою очередь приводит к развитию окислительного стресса [280]. После проведения лечения у больных первой группы происходило уменьшение уровня ДК в сыворотке крови в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению данными, полученными до лечения. Очевидно, под действием гепатопротекторов и витаминов происходило улучшение микроциркуляции и функциональной способности гепатоцитов, что в свою очередь приводило к уменьшению воспалительного процесса в печени [100].

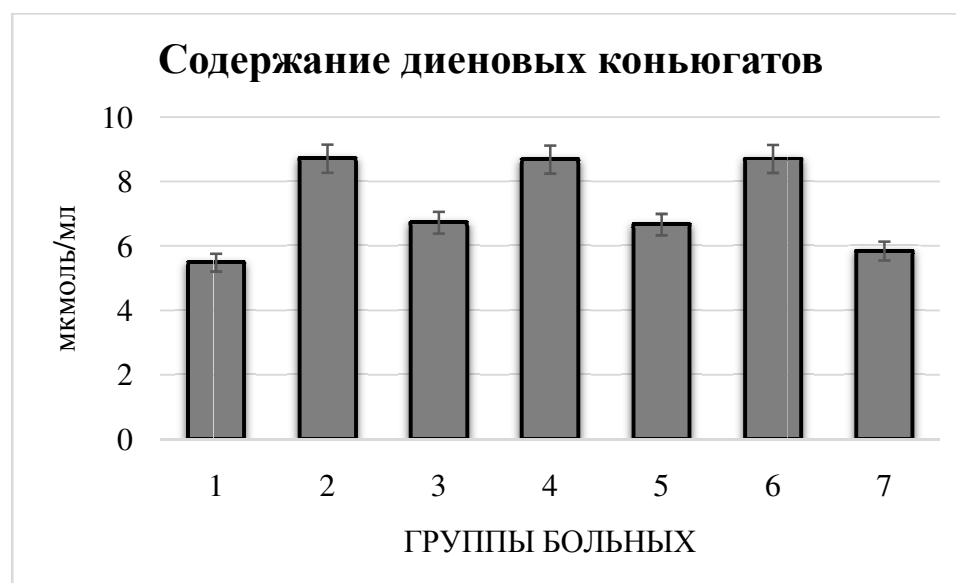


Рисунок 5. Концентрация диеновых конъюгатов в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Во второй группе пациентов после проведения комбинированной терапии с эпифамином содержание ДК в сыворотке уменьшалось также, как и в первой группе больных в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения. В третьей группе больных после проведения комбинированной терапии с мелаксеном, содержание ДК в сыворотке крови уменьшалось в большей степени, – в 1,5 раза ( $U, p < 0,05$ ), что свидетельствовало о благоприятном воздействии мелатонина на процессы ПОЛ.

### **3.4.3. Активность аконитатгидратазы в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом при применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

Показатель активности АкГ, как мишени действия свободных радикалов при АГ, в нашей научно-исследовательской работе определялся впервые, и полученные результаты могут служить основанием для включения его в оценку степени развития окислительного стресса при алкогольной болезни печени. В

этой связи следует отметить, что в последнее время все большее диагностическое значение приобретает энзимодиагностика, основанная на выявлении определенных ферментных констелляций, отражающих физиолого-биохимические сдвиги при различных патологических состояниях. Использование нового энзимопоказателя может иметь существенное значение как для понимания происходящих нарушений метаболизма, так и повышения информативности о степени развития негативных процессов при патологии и эффективности проводимого лечения.

Поскольку практически все ферменты являются белками, а содержание белков может варьировать в зависимости от скорости процессов их синтеза и деградации, часто модифицирующихся в патологическом состоянии, то нами осуществлялось определение ферментативной активности, выраженной как в виде ферментативных единиц (Е) на мл сыворотки крови, так и в виде удельной активности – в расчете Е на мг белка.

Установлено, что у больных с АГ всех групп, активность АкГ, выраженная в Е на мл сыворотки, была меньше в среднем в 1,6 ( $p < 0,01$ ) раза по сравнению с нормой. Удельная активность фермента снижалась в среднем в 2,9 ( $p < 0,01$ ) раза (Рисунки 6, 7). Изменения активности данного фермента, вероятно, связаны с тем, что при алкогольном гепатите в активированных Купферовских клетках и гепатоцитах происходит чрезмерная генерация АФК, особенно реактивных кислородных промежуточных форм, которые вырабатываются в ответ, как на короткие, так и продолжительные экспозиции алкоголя. Окислительный стресс стимулирует алкогольное повреждение печени, по крайней мере, через изменение активности цитохрома Р-450 2Е1, повреждение митохондрий, активацию апоптоза. При окислительном стрессе под действием АФК происходит разрушение железо-серных кластеров АкГ, что приводит к падению активности фермента. Полученные данные согласуются с мнением, что АкГ может выступать в качестве чувствительной мишени действия свободных радикалов [619].

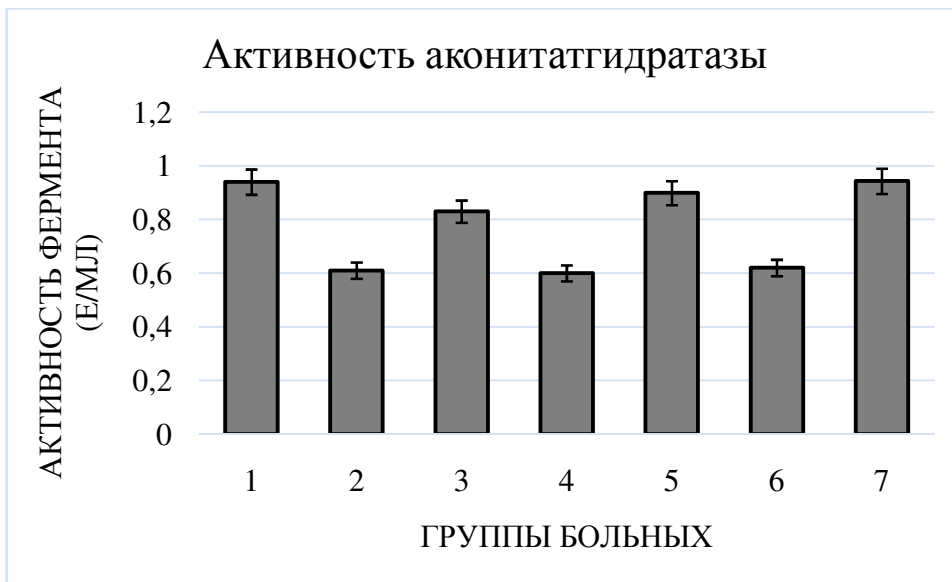


Рисунок 6. Активность аконитатгидратазы (E/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

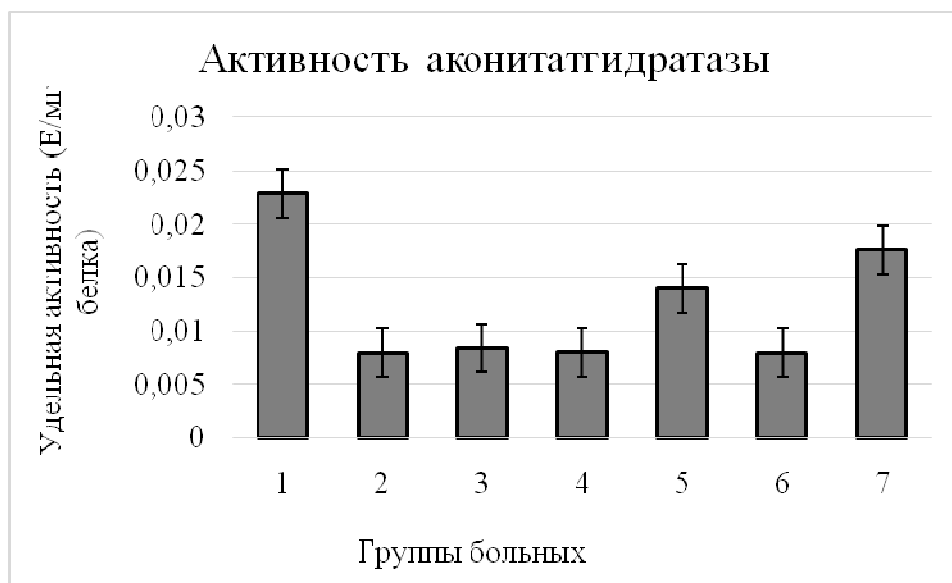


Рисунок 7. Удельная активность аконитатгидратазы (E/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).



После лечения путем проведения базисной терапии активность АкГ, выраженная в Е на мл сыворотки крови, повышалась в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность фермента увеличивалась в 1,1 раза, что могло быть связано с положительным действием гепатопротекторов и метаболической терапии на АОС организма. Во второй группе пациентов после приема эпифамина на фоне базисной терапии, активность АкГ, выраженная в Е на мл, увеличивалась в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность фермента – в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с соответствующими показателями до назначения эпифамина на фоне традиционного лечения. Очевидно, эпифамин, положительно влияя на функцию эпифиза, в частности, на синтез мелатонина и выброс его в кровяное русло, тем самым активизировал антиоксидантную систему организма, что приводило к защите молекулы аконитазы от губительного действия свободных радикалов. В третьей группе больных после проведения комбинированной терапии, включающей мелаксен, активность фермента, повышалась в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность – в 2,2 раза (U,  $p < 0,05$ ). Очевидно, повышение активности аконитазы объясняется снижением уровня АФК, связанным с положительным эффектом мелатонина, входящим в состав данного препарата, на свободнорадикальный гомеостаз организма, что обеспечивало защиту молекулы АкГ от негативного действия свободных радикалов.

Очевидно, повышение активности аконитазы объясняется снижением уровня АФК, связанным с положительным эффектом мелатонина, входящим в состав данного препарата, на свободнорадикальный гомеостаз организма, что обеспечивало защиту молекулы АкГ от негативного действия свободных радикалов.

### **3.5. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на антиоксидантный статус пациентов с алкогольным гепатитом**

### **3.5.1. Влияние мелатонин корригирующих препаратов на глутатионовую антиоксидантную систему у больных с алкогольным гепатитом**

При хронической алкогольной интоксикации прямое действие этанола приводит к высокой продукции свободных радикалов, образующихся в процессе его окисления, истощению антиоксидантных резервов организма, что приводит к развитию окислительного стресса. Содержание GSH и зависимых от него ферментов (ГП, ГР, Г-S-T), участвующих в инактивации АФК, определяется состоянием свободнорадикального гомеостаза организма. Глутатионовая АОС выступает в качестве одной из основных линий защиты от чрезмерного образования свободных радикалов на фоне развития патологии.

В первой группе больных с АГ до назначения базисной терапии содержание GSH в сыворотке крови уменьшалось в среднем в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) относительно контрольного уровня (Таблица 12). GSH принадлежит ключевая роль в системе низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов, он эффективно инактивирует АФК и является наиболее чувствительным компонентом в общей схеме неспецифической резистентности организма в условиях окислительного стресса [440, 441]. Известно, что данный метаболит может инактивировать свободные радикалы как прямо (является акцептором гидроксильного иона, синглетного кислорода), так и опосредовано за счет участия в качестве субстрата в ферментативных процессах. Поскольку микросомальные ферменты монооксигеназной системы, в частности CYP2E1, обладают способностью превращать ксенобиотики в высокотоксичные метаболиты [431], то происходящая при этом активация процессов свободнорадикального окисления (СО) биомолекул приводит к истощению уровня GSH. Уменьшение содержания GSH, вероятно, также связано с тем, что образующийся в ходе метаболизма этанола ацетальдегид способен реагировать с SH-группами белков, ферментов и других соединений, в том числе с SH-группами глутатиона, в результате чего последний подвергается окислению. Кроме того, согласно литературным данным, для обеспечения

необходимых условий метаболизма этанола важное значение имеет поддержание высокой скорости обмена КоА за счет активизации «цистеин-глутатионового» оборота при посредничестве ГГТП в условиях злоупотребления алкоголем [68]. Вероятно, при хронической алкогольной интоксикации включается механизм адапционно-регуляторного характера, направленный на синтез цистеина из GSH. При этом цистеин не только является предшественником КоА, но может оказывать сдерживающее влияние на жировую инфильтрацию печени. Значительное уменьшение количества GSH свидетельствует о снижении способности печени эффективно осуществлять детоксикацию.

После проведения базисного лечения наблюдалось увеличение концентрации GSH в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) Очевидно, это связано со снижением активности СО и, как следствие, уменьшением расходования данного тиола в результате положительного эффекта проводимой терапии.

Во второй группе больных при поступлении в стационар содержание GSH в сыворотке крови также в среднем снижалось в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой. После проведения комбинированной терапии с эпифамином наблюдалось возрастание концентрации GSH в сыворотке крови по сравнению с его уровнем перед лечением в 2,0 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Более значительное увеличение содержания глутатиона при приеме эпифамина, можно объяснить синергичным действием мелатонина, синтез которого стимулирует данный препарат, по отношению к восстановленному глутатиону. Известно, что мелатонин может способствовать восстановлению окисленной формы данного тиола [498]. Более существенное возрастание уровня GSH на фоне приема эпифамина, очевидно, могло оказывать позитивный эффект не только за счет протективного действия на гепатоциты, но и повышения антиоксидантного статуса организма больных АГ. В третьей группе больных после проведения комбинированной терапии с мелаксеном происходило увеличение содержания данного метаболита до уровня контроля (в 2,1 (U,  $p < 0,05$ ) раза). Таким образом, комбинированное лечение с мелаксеном восстанавливало концентрацию GSH до нормального уровня, что, очевидно, связано с мощным

антиоксидантным эффектом мелаксена и его положительным действием на глутатионовую систему.

В ходе проведенных нами исследований установлено, что активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл сыворотки, в 1–ой группе больных АГ до назначения базисной терапии снижались в среднем в 1,6 ( $p<0,05$ ) и 1,2 ( $p<0,05$ ) раза соответственно по сравнению с контрольным уровнем. Удельные активности ферментов уменьшались в 1,9 ( $p<0,05$ ) и 1,4 ( $p<0,05$ ) раза по сравнению с нормой. По-видимому, снижение активности ГР при алкогольном гепатите может вносить существенный вклад в уменьшение содержания GSH в данных условиях. Наблюдаемое падение активности ГП, возможно, взаимосвязано с тем, что при хронической алкогольной интоксикации наблюдается снижение содержания селена, который необходим для синтеза аминокислоты – селеноцистеина, играющего важную роль в катализе [428].

После проведения базисного лечения у больных с алкогольным гепатитом активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл сыворотки, возрастали в среднем в 1,8 ( $p<0,05$ ) и 2,0 ( $p<0,05$ ) раза соответственно по сравнению с результатами, полученными до назначения базисной терапии. Удельные активности ГП и ГР увеличивались в среднем в 1,4 ( $p<0,05$ ) раза. По-видимому, возрастание активности ГП-ГР (глутатиопероксидазной-глутатионредуктазной) системы было сопряжено с положительным действием гепатопротекторов на антиоксидантный статус больных.

Во второй группе больных с алкогольным поражением печени до проведения терапии активности ГП и ГР, выраженные в Е/мл сыворотки, и удельные активности ферментов уменьшались в тех же пределах, что и в 1-ой группе пациентов. После проведения комбинированной терапии с эпифамином, активности ГП и ГР, выраженные в Е на мл сыворотки крови, увеличивались в 2,7 и 2,6 (U,  $p<0,05$ ) раза соответственно, а удельные активности ферментов повышались в среднем в 1,8 и 2,1 (U,  $p<0,05$ ) раза соответственно по сравнению с результатами до лечения.

Таблица 12. Изменения показателей глутатионовой системы у больных с АГ при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	Группы больных					
			1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
GSH	Ммоль/л	0,873±0,036	0,419±0,012*	0,719±0,026**	0,416±0,015*	0,806±0,025**,#	0,417±0,013*	0,825±0,031**,#
ГП	Е/мл	0,123±0,008	0,0783±0,003*	0,143±0,007**	0,0779±0,004*	0,217±0,009**,#	0,078±0,002*	0,231±0,009**,#
ГП	Е/мг белка	0,002±0,0001	0,0011±0,0002*	0,0015±0,001**	0,001±0,0001*	0,0019±0,0002**,#	0,0012±0,0002*	0,0021±0,0002**,#
ГР	Е/мл	0,067±0,003	0,058±0,002*	0,115±0,009**	0,056±0,003*	0,147±0,011**,#	0,057±0,004*	0,162±0,01**,#
ГР	Е/мг белка	0,0015±0,0001	0,00109± 0,0001*	0,0015± 0,000011**	0,00108± 0,00014*	0,0022± 0,000012**,#	0,00109± 0,00012*	0,0024± 0,0001**,#
G-S-T	Е/мл	0,174±0,006	0,109±0,004*	0,129±0,006**	0,11±0,004*	0,147±0,008**,#	0,112±0,005*	0,162±0,007**,#
G-S-T	Е/мг белка	0,00099±0,00001	0,00057± 0,000013*	0,00064± 0,000012**	0,00059± 0,00001*	0,00076± 0,000011**,#	0,000575± 0,000015*	0,00081± 0,000014**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Таким образом, комбинированное лечение с эпифамином способствовало возрастанию активности ГП-ГР системы в большей степени, чем в 1-ой группе больных. В третьей группе пациентов перед лечением также происходило увеличение активности ГП и ГР, как и в предыдущих группах больных. После проведения комбинированной терапии, включающей прием мелаксена, активность ГП и ГР, выраженная в Е на мл, повышалась в 2,9 и 2,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза соответственно (Таблица 11). Удельная активность данных ферментов увеличивалась в 1,9 и 2,2 (U,  $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с результатами, полученными до лечения. Таким образом, в данной группе больных наблюдалось наибольшее повышение активности ГП-ГР системы.

Активность Г-S-T, выраженная в Е на мл сыворотки, в 1-ой группе больных АГ до назначения лечения уменьшалась в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольным уровнем. Удельная активность фермента уменьшалась в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой (Таблица 12). Очевидно, снижение активности Г-S-T происходило в результате значительных затрат GSH в ответ на избыточное образование АФК при данной патологии.

После проведения базисной терапии активность фермента, выраженная в Е на мл сыворотки, увеличивалась в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными полученными до лечения. При этом удельная активность повышалась в 1,1 ( $p < 0,05$ ) раза. Вероятно, возрастание активности Г-S-T было сопряжено с положительным действием базисной терапии на антиоксидантный статус больных.

Во второй группе больных после проведения комбинированного лечения, включающего прием эпифамина, активность данного фермента, выраженная в Е на мл, и удельная активность, увеличивались в 1,3 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, лечение с эпифамином способствовало повышению активности Г-S-T в большей степени, чем в первой группе больных.

В третьей группе больных АГ до проведения терапии активность Г-S-T изменялась в тех же пределах, что и в предыдущих группах. После

комбинированного лечения с мелаксеном, активность G-S-T, выраженная в Е на мл сыворотки крови, увеличивалась в 1,5 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность – в 1,4 раза (U,  $p < 0,05$ ), по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, прием мелаксена способствовал повышению активности GST в большей степени, чем у больных первой и второй групп. Полученные данные согласуются с предположениями о том, что антиоксидантная активность мелатонина может быть связана с его действием на антиоксидантные ферменты путем активации или стимуляции их синтеза [597].

### **3.5.2. Активность NADPH -генерирующих ферментов в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом при проведении базисной терапии и приеме эпифамина и мелаксена**

Одним из основных поставщиков NADPH для ГП-ГР системы является пентозофосфатный путь, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ. Альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая НАДФ-ИДГ [29].

Установлено, что при АГ в сыворотке крови больных наблюдалось уменьшение активности НАДФ-ИДГ, выраженной в Е на мл сыворотки, в среднем в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольной группой. При этом удельная ферментативная активность снижалась в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ) (Рисунки 8, 9). Имеются данные об ингибировании активности некоторых ферментов гликолиза при хронической алкогольной интоксикации, что сопровождается увеличением в печени уровня глюкозы и лактата [144]. По-видимому, в этих условиях может происходить и торможение активности ферментов, функционирование которых сопряжено с превращениями трикарбоновых кислот.

После проведения базисной терапии активность НАДФ-ИДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, возросла в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, удельная активность увеличивалась в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными до лечения.

Во второй группе больных при проведении комбинированной терапии с эпифамином активность НАДФ-ИДГ, выраженная в Е/мл сыворотки, повышалась в 1,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения. Удельная активность фермента увеличивалась в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза.

В третьей группе пациентов с АГ после проведения комбинированной терапии с мелаксеном тоже происходило повышение ферментативной активности. Активность НАДФ-ИДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, повышалась также, как и во второй группе в среднем в 1,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными до лечения, удельная ферментативная активность увеличивалась в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза.

Более значительное возрастание активности НАДФ-ИДГ в крови больных при приеме препаратов, способных осуществлять коррекцию уровня мелатонина в организме, по сравнению с пациентами, находящимися на стандартном лечении, может быть обусловлено индукцией синтеза фермента под действием данного гормона. Из литературных данных известно, что мелатонин может увеличивать экспрессию некоторых ферментов [351].

При АГ активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, снижалась в среднем в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), при этом удельная активность фермента уменьшалась в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольной группой (Рисунки 10,11). Как следует из полученных данных, активность этого NADPH-генерирующего фермента снижалась в меньшей степени, чем НАДФ-ИДГ. Возможно, это связано с ролью пентозофосфатного пути как поставщика восстановительных эквивалентов для биосинтеза жирных кислот, активация которого происходит в клетках печени в условиях ее жирового перерождения при хронической алкогольной интоксикации. Известно, что именно Г6ФДГ, как ключевой фермент пентозофосфатного пути, ответственна за основную долю NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот [29].



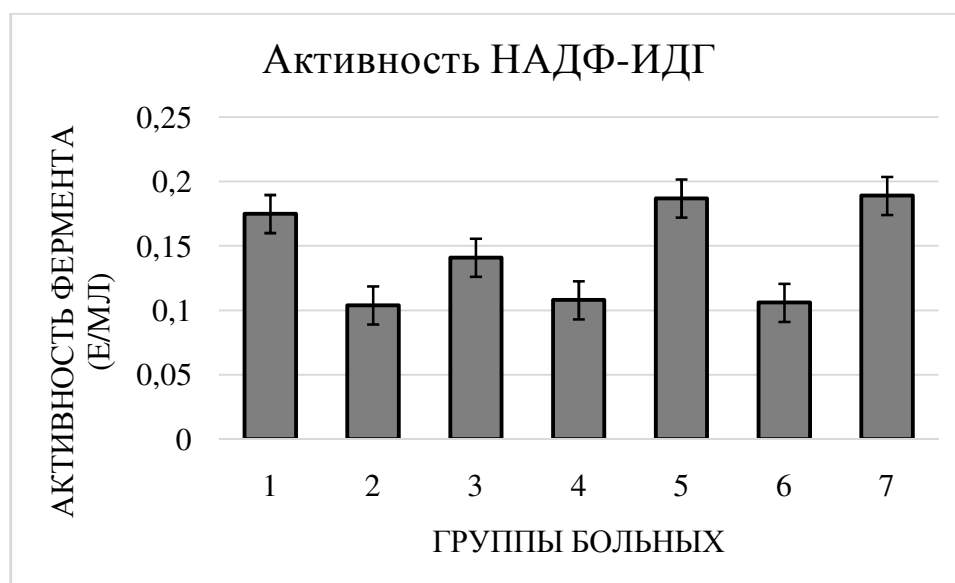


Рисунок 8. Активность НАДФ-ИДГ (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

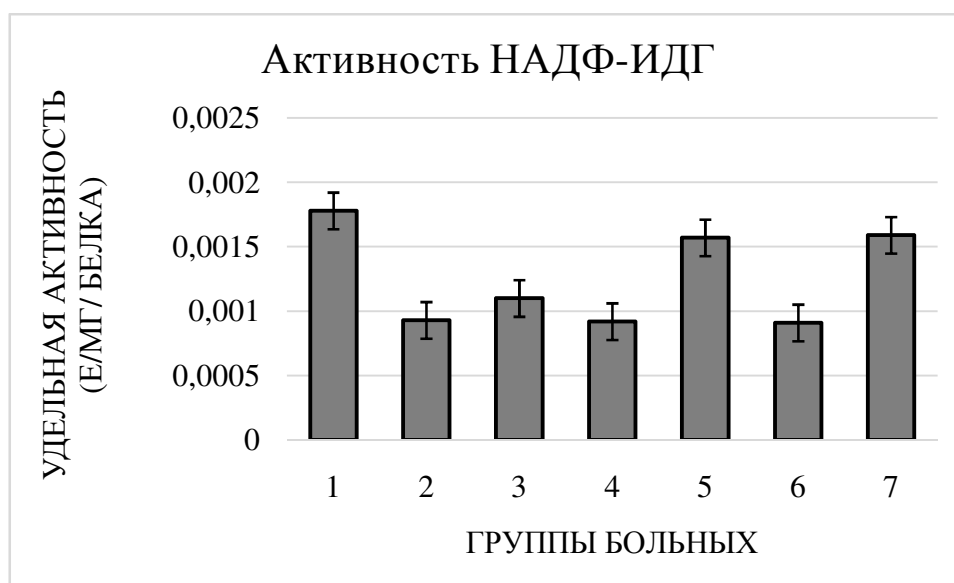


Рисунок 9. Удельная активность НАДФ-ИДГ (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

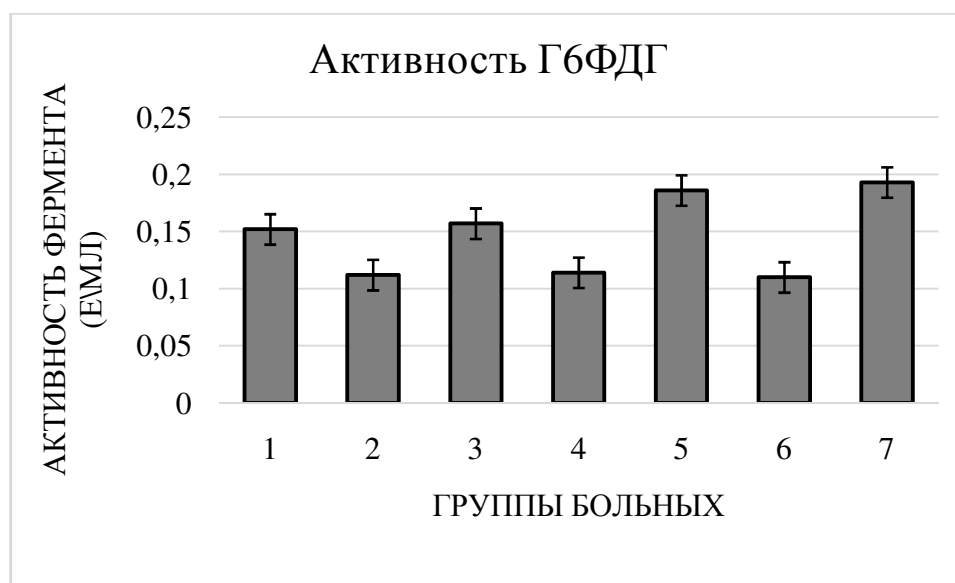


Рисунок 10. Активность Г6ФДГ (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

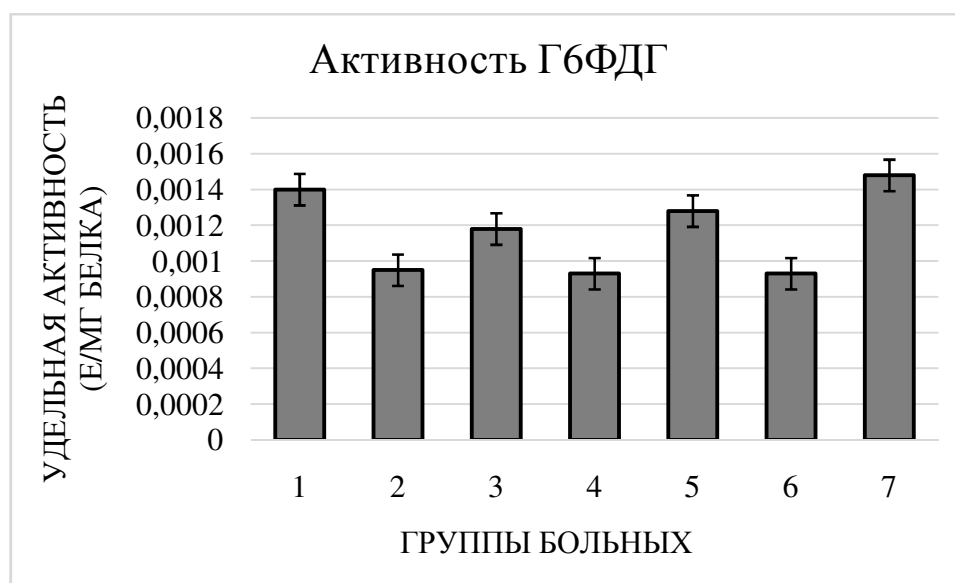


Рисунок 11. Удельная активность Г6ФДГ (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

После проведения базисной терапии активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, возрастала в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными до лечения, удельная ферментативная активность увеличивалась в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза.

При комбинированной терапии с эпифамином активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, повышалась в 1,7 ( $U, p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения. Удельная активность фермента увеличивалась в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) раза. В третьей группе пациентов с АГ после проведения комбинированной терапии с мелаксеном активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, повышалась в среднем в 1,7 ( $U, p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными до лечения. Удельная активность Г6ФДГ увеличивалась в 1,6 раза ( $U, p < 0,05$ ). Следует отметить, что торможение активности NADPH-генерирующих ферментов могло быть одной из причин снижения активности ГР при алкогольном гепатите. Причем существенное возрастание активности ГР после базисного лечения и еще более значительный подъем активности фермента при приеме препаратов, корригирующих уровень мелатонина, были сопряжены с увеличением активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ в данных условиях.

Наблюдающееся при этом превышение контрольного уровня активностей ГР и NADPH-генерирующих ферментов могло быть взаимосвязано с мощным эффектом проводимой антиоксидантной терапии, способствующей мобилизации АОС в условиях оксидативного стресса, приобретающего при хронической алкогольной интоксикации системный характер. Вероятно, мелатонин, коррекция содержания которого происходит под влиянием эпифамина и мелаксена, может выступать в роли адаптогена, регулирующего активность глутатионовой системы, а также ферментов, способных генерировать NADPH, в соответствии с воздействием патогенных факторов на организм.

### **3.5.3. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом при применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

Совместное действие СОД и каталазы значительно эффективнее защищает клетки от действия свободных радикалов, чем функционирование данных ферментов по отдельности.

При АГ активность СОД, выраженная, в виде Е на мл сыворотки крови, увеличивалась на 34,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой. Удельная активность фермента повышалась на 24,2% (Рисунки 12, 13). Полученные данные могут быть объяснены с той точки зрения, что при усилении свободнорадикальных процессов происходит мобилизация АОС, направленная на снижение их уровня. Известно, что при окислении этанола в клетках печени под действием ряда ферментных систем образуется ацетальдегид, дальнейшие превращения которого могут протекать с участием ксантиноксидазы и альдегидоксидазы [267]. Эти ферменты в качестве продуктов реакции образуют такие АФК, как  $O_2^{\bullet -}$  и  $H_2O_2$ . Для предотвращения токсического действия активированных кислородных метаболитов на клеточные компоненты должна происходить их инактивация. В связи с этим возрастание активности СОД имеет важное адаптивное значение.

При проведении базисной терапии активность СОД, выраженная в Е на мл сыворотки крови, незначительно уменьшалась (на 5,4%), однако удельная активность снижалась более существенно – на 19,2% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами, полученными до лечения. По-видимому, лекарственные препараты, входящие в базисную группу, за счет своих антиоксидантных свойств снижали интенсивность свободнорадикальных процессов, что и приводило к коррекции активности исследуемого фермента.

При комбинированной терапии с эпифамином во второй группе больных происходило уменьшение активности СОД, выраженной в Е/мл сыворотки крови, в среднем на 11,6% ( $p < 0,05$ ), а удельной активности на 20,9% ( $p < 0,05$ ). Несколько

большее снижение активности СОД в крови пациентов данной группы может быть связано со способностью мелатонина, коррекция уровня которого происходит под действием эпифамина, перехватывать свободные радикалы, выступая в качестве их универсальной ловушки [420]. Применение комбинированной терапии с мелаксеном сопровождалось снижением активности СОД, выраженной в Е на мл сыворотки, в среднем на 13,3% по сравнению с результатами до лечения. Удельная ферментативная активность в сыворотке крови больных с алкогольным поражением печени уменьшалась на 24,2%, достигая контрольного уровня. Полученные данные подтверждают антиоксидантное действие мелатонина, входящего в состав данного препарата, который обладает выраженной способностью связывать свободные радикалы, в том числе и  $O_2^{\bullet-}$ , который выступает по отношению к СОД в качестве индуцирующего и активирующего фактора. По-видимому, мелаксен быстрее влиял на антиоксидантный потенциал организма, что приводило к более выраженному антиокислительному эффекту.

Согласно полученным результатам, в сыворотке крови больных с АГ во всех группах до лечения активность каталазы, выраженная в Е на мл сыворотки, была выше в среднем в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой. При измерении удельной активности фермента наблюдалось ее повышение на 25,6% (Рисунки 14, 15). Как известно, активация каталазы при алкогольной интоксикации может иметь важное значение, во-первых, для ускорения процессов окисления алкоголя при его высоких концентрациях, во-вторых, для обезвреживания пероксидов, концентрация которых может при этом резко возрастать. Хотя в нормальных условиях каталазный путь окисления этанола малоактивен, так как скорость образования пероксида водорода существенно ниже способности к его утилизации, но он может приобретать определенное значение в ситуациях, сопровождающихся значительным ростом образования АФК [670]. Поскольку уровень ДК, а также параметры БХЛ свидетельствует о чрезмерной генерации АФК в организме больных, то повышение активности каталазы было, очевидно,

связано с необходимостью нейтрализации  $H_2O_2$ , образующегося в повышенных количествах. После проведения базисного лечения происходило снижение активности каталазы, выраженной в Е на мл сыворотки, на 10,2% ( $p < 0,05$ ), а удельной активности – на 10,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными, которые были получены перед лечением. После проведения комбинированной терапии с эпифамином происходило уменьшение активности каталазы, выраженной в Е на мл сыворотки на 16,7% (U,  $p < 0,05$ ), а удельной активности на 12,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. В третьей группе больных после проведения комплексной терапии с мелаксеном активность каталазы, выраженная в Е на мл сыворотки, уменьшалась на 16,9% (U,  $p < 0,05$ ) по сравнению с данными, полученными до лечения. Удельная активность фермента снижалась на 12,9%. Выявленное снижение активности каталазы может быть объяснено положительным влиянием проводимого лечения на общеметаболическое состояние организма, в том числе и на уровень АФК, снижение которого могло приводить к уменьшению степени мобилизации активности каталазы. Однако, по всей видимости, на активность данного фермента мог влиять ряд факторов, способных оказывать разнонаправленное воздействие. С одной стороны, сохраняющаяся повышенная активность фермента могла быть следствием его индукции в организме при АГ. С другой стороны, из литературных данных известно, что под действием мелатонина при окислительном стрессе происходит защита молекулы каталазы от АФК [77]. Это указывает на возможность более стабильного функционирования каталазы при проведении комбинированной терапии с применением препаратов, корригирующих содержание мелатонина в организме. Вместе с тем, при снижении интенсивности СО биомолекул под влиянием антиоксидантной терапии, очевидно, могла уменьшаться концентрация субстрата каталазы –  $H_2O_2$ , скоростью диффузии которого к активному центру лимитируется активность фермента.

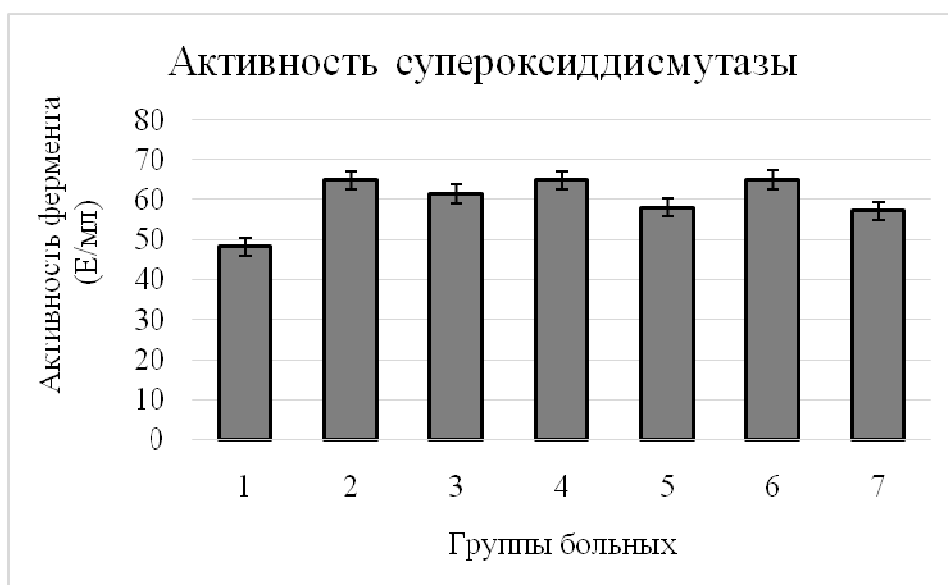


Рисунок 12. Активность СОД (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

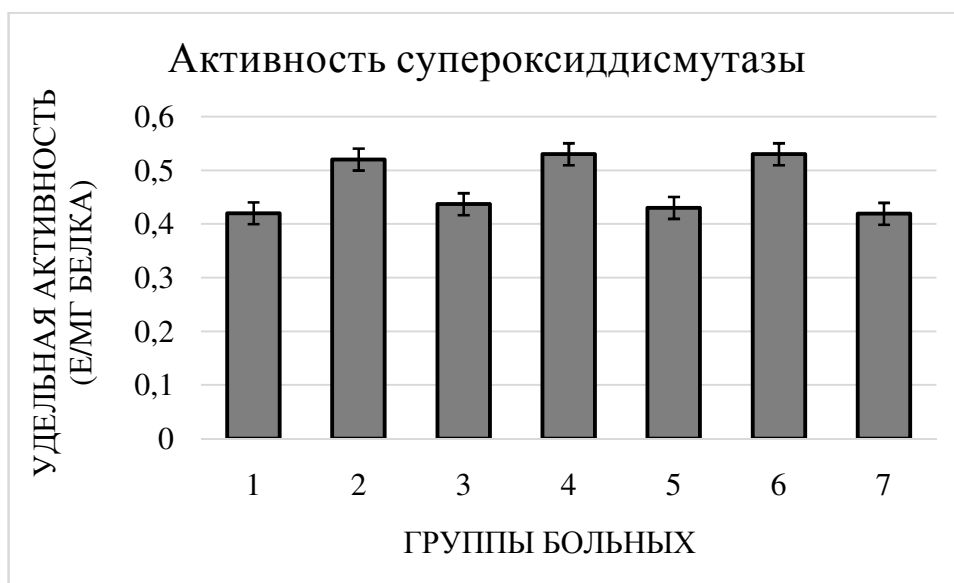


Рисунок 13. Удельная активность СОД (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).



Рисунок 14. Активность каталазы (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

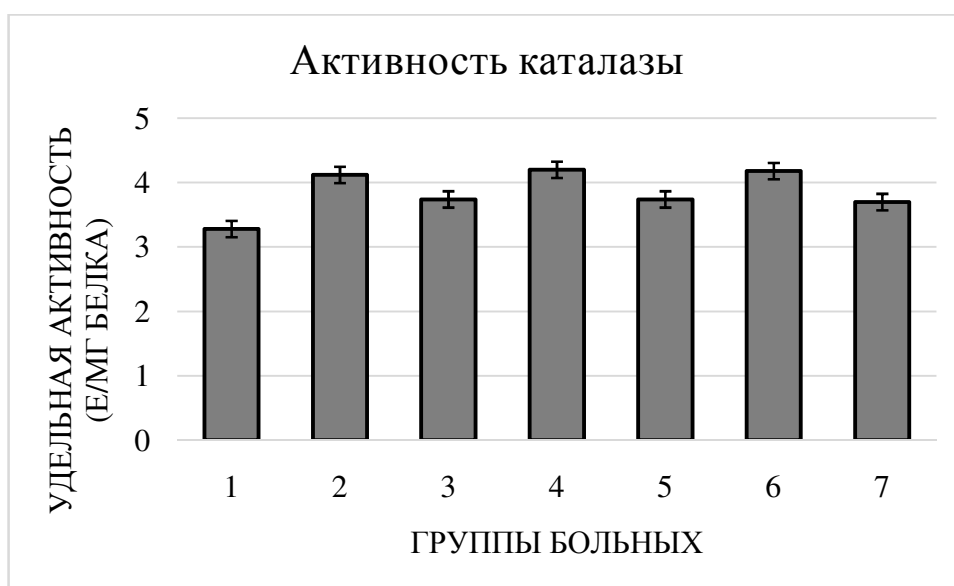


Рисунок 15. Удельная активность каталазы (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).



По-видимому, выявленные различия ферментативной активности в сыворотке крови пациентов после проведения базисного лечения и комбинированной терапии с применением препаратов, корригирующих уровень мелатонина, определяются суммарным эффектом действия вышеуказанных факторов. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения мелатонин-корригирующих препаратов в комплексной терапии алкогольной болезни печени.

### **3.5.4. Влияние эпифамина и мелаксена на концентрацию цитрата и альфа-токоферола в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом**

Интенсивность процессов СО в значительной мере зависит от уровня ионов металлов переменной валентности, в частности  $Fe^{2+}$ , концентрация которых увеличивается при окислительном стрессе за счет высвобождения из вне- и внутриклеточных депо, разрушения Fe-S- кластера аконитатгидратазы АФК [231, 324], а также распада других  $Fe^{2+}$ -содержащих белков и восстановления  $Fe^{3+}$  в составе ферритина с помощью SH-соединений и аскорбата [661]. Ионы  $Fe^{2+}$ , как известно, обладают прооксидантной активностью, так как, участвуя в реакциях Фентона и Хабера – Вайса приводят к образованию одной из наиболее агрессивных и опасных АФК – гидроксильного радикала [139, 656]. Известно, что снижение внутриклеточного уровня  $Fe^{2+}$  может достигаться за счет увеличения содержания цитрата. Так, после выхода из трансферрина ионы  $Fe^{2+}$  хелатируются цитратом, который осуществляет их доставку в различные клеточные компартменты [620]. При усиленном потреблении этанола в организме идет перестройка многих метаболических систем клетки, в связи с чем, изучение метаболизма цитрата – ключевого интермедиата ряда путей, регулятора многих ферментных систем, представляет значительный интерес.

При алкогольном гепатите содержание цитрата в сыворотке крови больных первой группы увеличивалось в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой (Рисунок 16). Возрастание содержания цитрата в сыворотке может быть результатом

нарушений его метаболизма в печени с последующим выходом в кровь в результате цитолиза гепатоцитов. Повышение уровня цитрата может иметь адаптивное значение благодаря хелаторным свойствам аниона лимонной кислоты по отношению к ионам двухвалентного железа. После проведения базисной терапии происходило уменьшение концентрации цитрата в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с результатами до лечения. По всей видимости, при базисной терапии происходило снижение интенсивности процессов СО, что могло отражаться на содержании цитрата. В сыворотке крови больных с алкогольным поражением печени второй группы наблюдалось также повышение содержания цитрата по сравнению с контрольными значениями (в среднем в 2,0 раза ( $p < 0,05$ )). После проведения базисной терапии с эпифамином происходило более значительное понижение концентрации цитрата по сравнению с пациентами, не получавшими данный препарат (в 1,4 раза (U,  $p < 0,05$ )). Вероятно, включение эпифамина в базисную терапию способствовало улучшению состояния свободнорадикального гомеостаза организма пациентов, что отражалось на активности АкГ и, как следствие, на содержании цитрата. Это предположение подтверждается результатами исследования активности данного фермента, приведенными выше. В третьей группе пациентов перед лечением концентрация цитрата была также повышена, как и в предыдущих группах. После проведения комбинированной терапии с мелаксеном содержание данного метаболита уменьшалось в среднем в 1,5 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до проведения терапии. Вероятно, более значительное снижение концентрации цитрата было связано с выраженными антиоксидантными свойствами мелатонина, непосредственно входящего в состав данного препарата. Мелатонин связывал свободные радикалы, способствуя снижению нагрузки на АОС, повышению активности АкГ, что сопровождалось уменьшением концентрации цитрата. Алкогольная интоксикация, сопровождающаяся снижением сдерживающего влияния АОС организма и нарушениями структурной организации клеток под действием продуктов СО, приобретает особо опасный характер, что, может быть,

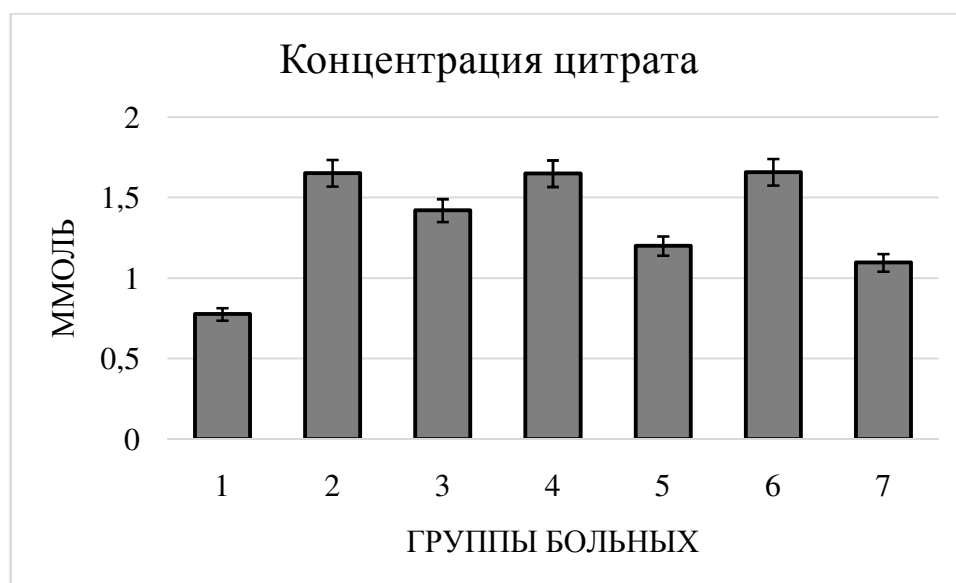


Рисунок 16. Концентрация цитрата в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

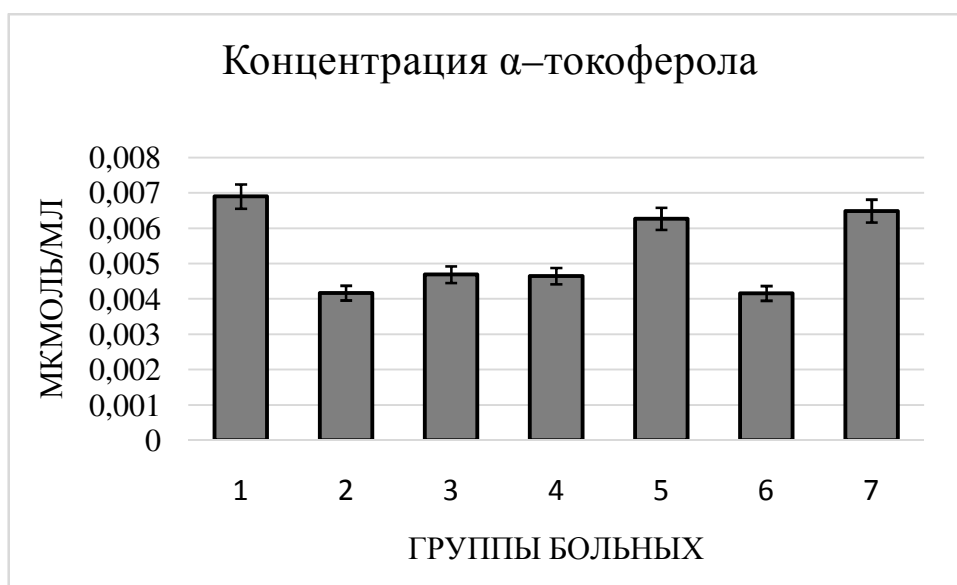


Рисунок 17. Концентрация альфа-токоферола в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

связано с изменением концентрации  $\alpha$ -токоферола, защищающим клеточные структуры от разрушения свободными радикалами.  $\alpha$ -Токоферол является биогенным антиоксидантом, существенно влияет на функциональное состояние разных систем организма, участвует в синтезе гормонов, поддержании иммунитета, обладает антиканцерогенным эффектом.

Полученные в ходе нашей работы данные указывают на существенное снижение уровня  $\alpha$ -токоферола у больных АГ. Так, во всех группах больных содержание  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови до назначения лечения было в среднем в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза ниже по сравнению с контрольным уровнем (Рисунок 17). После проведения базисного лечения уровень  $\alpha$ -токоферола увеличивался на 12,5% ( $p < 0,05$ ). Комбинированная терапия с эпифамином и мелаксеном приводила к возрастанию содержания данного антиоксиданта на 50,5% и 55,7%, соответственно ( $U$ ,  $p < 0,05$ ). По-видимому, повышение уровня  $\alpha$ -токоферола может быть следствием снижения интенсивности свободнорадикальных процессов при приеме мелатонин-корректирующих препаратов. Кроме того, известно, что ряд соединений с невысоким редокс-потенциалом, могут выступать в роли синергистов при функционировании других антиоксидантов, и прежде всего,  $\alpha$ -токоферола [439]. По всей видимости, позитивное воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на состояние свободнорадикального гомеостаза в организме больных способствовало нормализации окислительно-восстановительных процессов, что отражалось на интенсивности рецикла  $\alpha$ -токоферола, обеспечивающего поддержание данного антиоксиданта в активной восстановленной форме [151].

### **3.6. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на апоптотические процессы у больных с алкогольным гепатитом**

#### **3.6.1. Воздействие эпифамина и мелаксена на активность каспаз в сыворотке крови больных с алкогольным гепатитом**

Как свидетельствуют полученные нами результаты, а также некоторые литературные данные хроническое чрезмерное употребление алкоголя приводит к возрастанию продукции АФК, снижению антиоксидантного статуса и развитию оксидативного стресса в клетках печени [391]. Индуцированный этанолом окислительный стресс играет основополагающую роль в инициации механизмов, вызывающих повреждение печени. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при токсическом поражении печени может являться причиной активации процессов запрограммированной клеточной гибели – апоптоза, характеризующегося активацией каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз – каспаз [132]. Проведенные нами исследования показали, что у больных АГ наблюдается возрастание активности каспазы -1 и каспазы -3 в 1,7 и 1,4 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (Рисунки 18, 19). Очевидно, что чрезмерная генерация АФК при данной патологии приводила к активации апоптотических процессов. Так, продемонстрировано развитие апоптоза гепатоцитов на уровне экспериментальных моделей алкогольиндуцированных болезней печени [445]. Кроме того, выявлено, что при экспериментальном конканавалин-А-индуцированном гепатите повышалась активность каспазы – 3, что было связано, в частности, с инфильтрирующими печень лимфоцитами, подвергающимися апоптотической активационно – индуцированной клеточной гибели [329].

Применение базисной терапии приводило к изменению активности исследуемых каспаз в сторону нормы. Так, активность каспазы -1 снижалась в 1,6 раза, каспазы -3 – в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными, полученными до лечения. По-видимому, проводимое лечение способствовало снижению скорости генерации АФК и, как следствие, торможению апоптотических процессов.

Проведение комбинированного лечения с эпифамином сопровождалось уменьшением активности каспаз-1 и каспазы-3 в 1,6 ( $p < 0,05$ ) и 1,4 (U,  $p < 0,05$ ) раза соответственно. В группе пациентов, получавшим наряду с базисным лечением

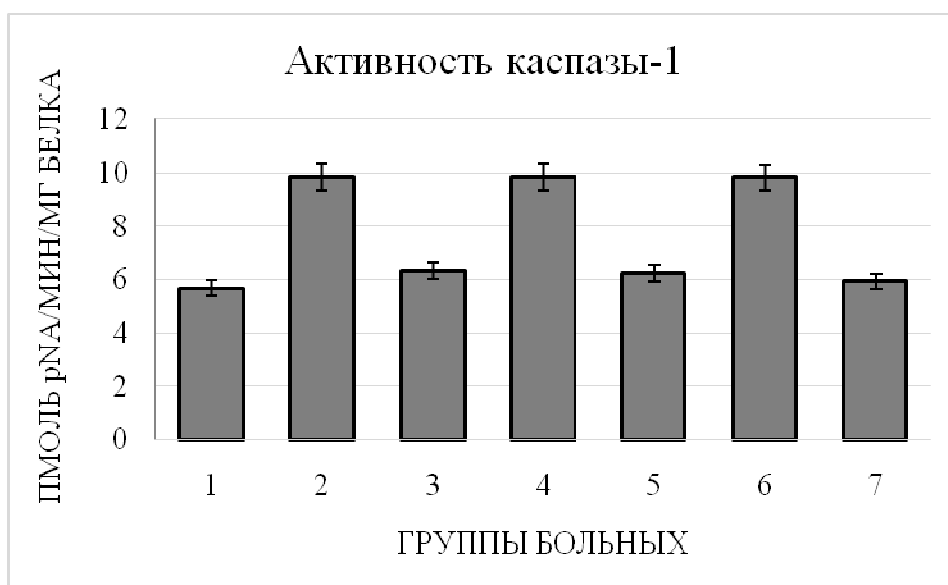


Рисунок 18. Активность каспазы-1 в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

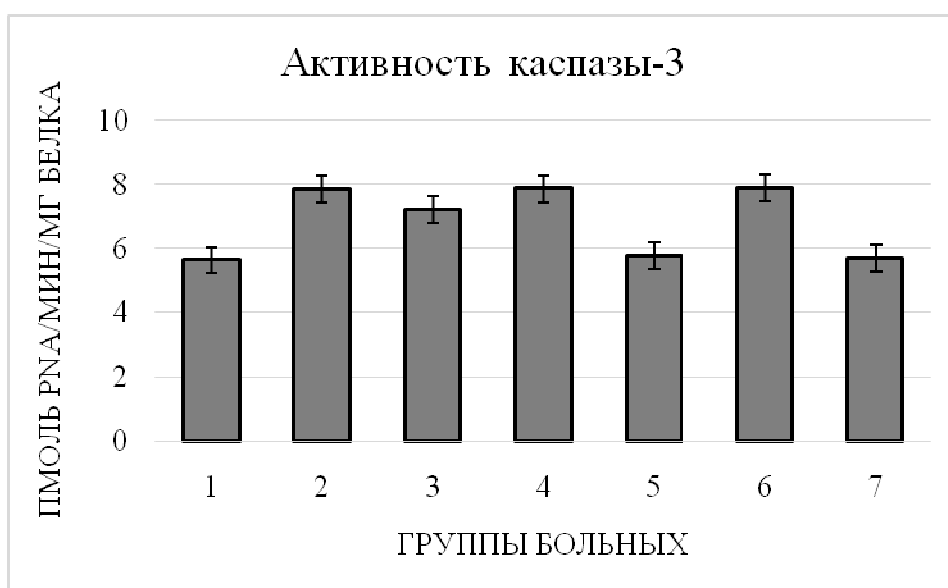


Рисунок 19. Активность каспазы-3 в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с АГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

мелаксен, отмечено снижение активности каспазы -1 в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза, каспазы-3 – в 1,4 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Более существенное торможение активностей каспаз, по-видимому, было связано с коррекцией уровня мелатонина. Известно, что мелатонин снижает уровень окислительного повреждения липидов, ДНК и митохондрий [503], увеличивает экспрессию антиапоптотических генов группы Bcl-2, защищая липиды от пероксидного окисления и последующего апоптоза клеток [516].

### **3.6.2. Оценка степени фрагментации ДНК в лимфоцитах крови больных с алкогольным гепатитом при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном**

Данные об изменении активности каспаз при АГ согласуются с результатами оценки степени фрагментации ДНК у пациентов. Путем электрофоретического анализа было выявлено, что в образцах крови доноров контрольной группы ДНК была представлена одним фрагментом в начале трека (Рисунок 20). ДНК, выделенная из лейкоцитов больных АГ была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб, что свидетельствовало об активации апоптотических процессов. По мнению исследователей, подобные фрагменты возникают при действии апоптоз-специфических нуклеаз [538]. После проведения стандартного лечения наблюдалось снижение степени фрагментации ДНК. В образцах крови больных, принимавших эпифамин или мелаксен на фоне базисной терапии, фрагментация ДНК в большинстве проб практически не визуализировалась. По-видимому, коррекция содержания мелатонина в организме пациентов под действием данных препаратов, способствуя снижению интенсификации СО биомолекул и, следовательно, подавлению степени выраженности оксидативного стресса, может приводить к уменьшению фрагментации ДНК. Полученные результаты соответствуют данным по изменению параметров биохемилюминесценции, содержания ДК и активности АОС при АГ, проведении базисного лечения и приеме эпифамина и мелаксена.

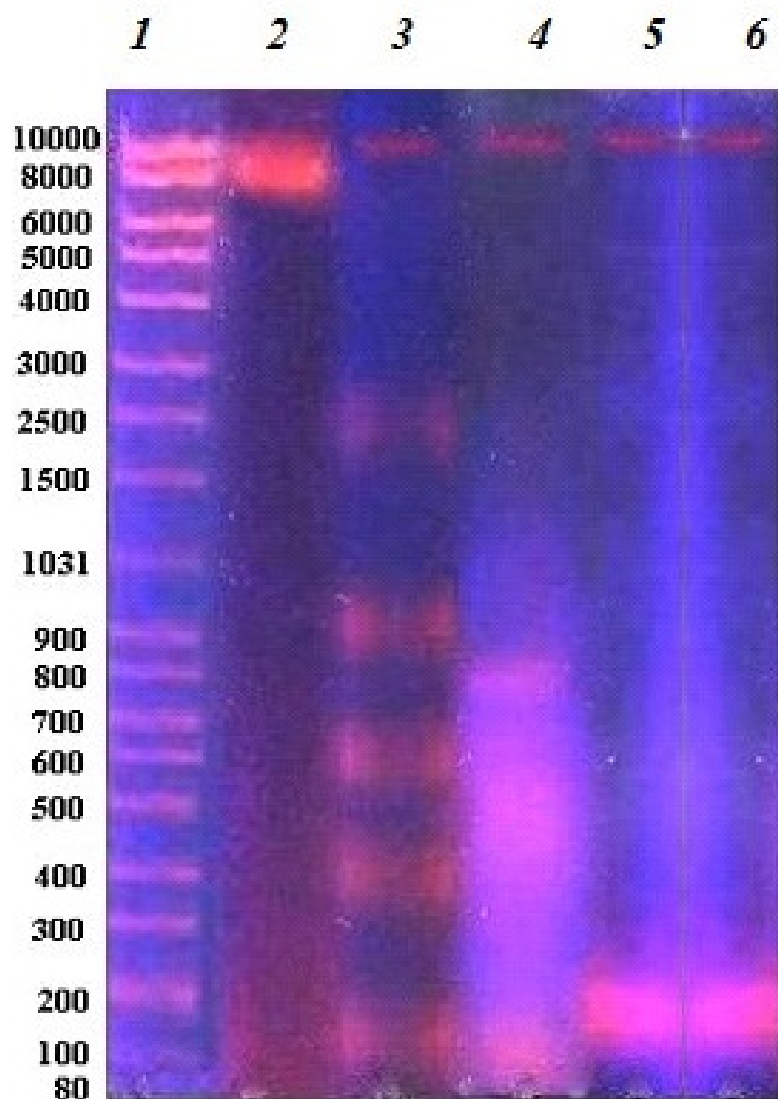


Рисунок 20. Степень фрагментации ДНК в лимфоцитах крови в норме (2), у больных с АГ перед лечением (3), при проведении базисного лечения (3) и комбинированной терапии с эпифамином (4) или мелаксеном (5).

### **3.7. Сравнительный анализ клинической эффективности базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном у больных с алкогольным гепатитом**

Клиническую эффективность базисной терапии, комбинированного лечения с эпифамином или мелаксеном оценивали по динамике изменений лабораторных



показателей в направлении нормальных значений при АГ (%), рассчитывая среднее значение (М) для каждого блока биохимических параметров.

Таблица 13. Эффективность базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном у больных с алкогольным гепатитом на основе оценки лабораторных показателей.

Показатели	Эффективность базисного лечения	Эффективность комбинированной терапии с эпифамином	Эффективность комбинированной терапии с мелаксеном
<b>Мочевина</b>	3,3%	12,1%	23,8%
<b>б-СМ</b>	27,5%	42,3%	44,7%
<i>Показатели липидного обмена</i>			
ЛПНП	8,4%	15,3%	34,0%
Холестерин	6,0%	12,8%	21,2%
<b>М</b>	<b>7,2%</b>	<b>14,1%</b>	<b>27,6%</b>
<i>Показатели функции печени</i>			
ГГТП	52,9%	61,4%	65,6%
АлАт	33,0%	41,2%	45,3%
АсАт	28,8%	34,8%	36,8%
Тимоловая проба	17,1%	26,2%	34,1%
ХЭ	38,8%	57,6%	64,5%
<b>М</b>	<b>34,1%</b>	<b>44,2%</b>	<b>49,2%</b>
<i>Показатели иммунного статуса</i>			
Ig A	6,6%	18,8%	21,9%
Ig M	8,6%	11,0%	15,8%

Ig G	5,3%	9,4%	11,8%
ЦИК	41,2%	57,5%	69,3%
<b>М</b>	<b>15,4%</b>	<b>24,2%</b>	<b>29,7%</b>
<i>Показатели интенсивности свободнорадикального окисления</i>			
S	17,6%	22,8%	33,8%
I <sub>max</sub>	34,2%	39,9%	47,1%
ДК	22,8%	25,3%	34,8%
АГ	26,5%	33,3%	34,3%
<b>М</b>	<b>25,3%</b>	<b>30,4%</b>	<b>37,5%</b>
<i>Показатели антиоксидантной системы</i>			
tgα <sub>2</sub>	18,7%	27,6%	33,6%
GSH	41,8%	50,4%	52,5%
ГП	45,5%	64,1%	66,3%
ГР	49,6%	61,9%	64,9%
Г-S-T	15,5%	25,2%	30,9%
СОД	5,1%	11,5%	14,0%
Каталаза	4,6%	14,5%	14,7%
Цитрат	14,0%	27,3%	33,9%
α-токоферол	11,1%	28,4%	33,7%
<b>М</b>	<b>22,9%</b>	<b>34,6%</b>	<b>38,3%</b>
<i>Показатели интенсивности апоптотических процессов</i>			
Каспаза-1	36%	38,6%	41,6%
Каспаза-3	8,1%	26,6%	32,0%
<b>М</b>	<b>22,1%</b>	<b>32,7%</b>	<b>36,9%</b>

После проведения базисного лечения у больных с алкогольным гепатитом происходило уменьшение уровня гиперлипидемии (М) на 7,0%, при комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном – на 14,1% и 27,6%

соответственно по сравнению с данными, полученными до лечения. При этом уровень ЛПНП снижался в большей степени, чем содержание общего холестерина. При базисном лечении имелась тенденция к снижению уровня мочевины в крови (на 3,3%), при комбинированном лечении с эпифамином – на 12,1%, при комбинированной терапии с мелаксеном – на 23,8%.

При оценке показателей функции печени эффективность базисной терапии составила 34,1%, при комбинированной терапии с эпифамином – 44,2%, при комбинированной терапии с мелаксеном – 49,2%. Следует отметить, что при применении мелатонин-корректирующих препаратов наибольшее изменение в сторону нормы было отмечено для ГГТП и ХЭ.

Параметры иммунного статуса при алкогольном гепатите после базисной терапии изменялись в сторону нормы (в среднем на 15,4%), при комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном – на 24,2% и 29,7% соответственно по сравнению с данными, полученными до лечения. При этом содержание Ig A и ЦИК уменьшалось в большей степени при применении комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном по сравнению с уровнем иммуноглобулинов M и G.

Интенсивность свободнорадикального окисления у пациентов с алкогольным гепатитом при проведении базисной терапии снижалась на 25,3%, при комбинированном лечении с эпифамином – на 30,4%, при комбинированной терапии с мелаксеном – на 37,5%. При этом наибольшее изменение в сторону нормальных значений было выявлено для параметров БХЛ, отражающих степень активности свободнорадикальных процессов в организме – S и I<sub>max</sub>. Активность антиоксидантной системы повышалась после базисного лечения на 22,9%, после комбинированной терапии с эпифамином – на 34,6%, при комбинированной терапии с мелаксеном – 38,3%. Наибольшие изменения были характерны для компонентов глутатионовой антиоксидантной системы (GSH, ГП, ГР, Г-S-T) и ферментативных антиоксидантов – цитрата и α-токоферола.

Интенсивность апоптотических процессов снижалась при базисном лечении на 22,1%, при комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном – на 32,7%

и 36,9% соответственно по сравнению с данными, полученными до лечения. При этом под действием комбинированной терапии с мелатонин-корректирующими препаратами уровень активности каспазы-3 снижался более значительно, чем каспазы-1, что свидетельствует об уменьшении активности основного эффектора, инициирующего апоптотическую программу клетки.

Следует отметить, что уровень 6-СМ, отражающий эндогенную концентрацию мелатонина в организме, после базисной терапии изменялся в сторону нормы, возрастая на 27,5%, после комбинированной терапии с эпифамином – на 42,3%, после комбинированной терапии с мелаксеном – на 44,7%.

Таким образом, при обобщении данных по всем исследуемым показателям эффективность базисного лечения составила 19,7%, комбинированной терапии с эпифамином – 29,3%, комбинированного лечения с мелаксеном – 36%, по сравнению с данными, полученными до лечения. Очевидно, включение в терапию эпифамина и мелаксена приводило к коррекции уровня эндогенного мелатонина и повышению антиоксидантного потенциала организма, что способствовало снижению интенсивности свободнорадикальных и апоптотических процессов в организме больных АГ, и как следствие, изменению показателей функции печени, иммунного статуса и липидного обмена в сторону нормы в большей степени, чем при проведении базисной терапии с применением гепатопротекторов.

### **3.8. Корреляционные связи биохимических показателей у больных алкогольным гепатитом при комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном**

С помощью комплекса статистических программ у обследованных лиц были определены умеренные и сильные связи между изученными лабораторными показателями с коэффициентом ранговой корреляции Спирмена более 0,3 при уровне значимости  $(p) < 0,05$ . Было осуществлено изучение ассоциации биохимических параметров (АлАт, АсАт, ГГТП, ХЭ, ОХ, ЛПНП, 6-СМ),

иммунологических показателей (IgA, IgM, IgG, ЦИК), показателей свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>, ДК, АкГ), антиоксидантной системы (GSH, ГП, ГР, Г-S-T, каталаза, СОД, цитрат, α-токоферол) и апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3).

Анализ ассоциативных связей лабораторных параметров 1-й группы больных с АГ до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (2), ГГТП (3), ХЭ (3), ОХ (4), ЛПНП (1), 6-СМ (4 связи) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, подтверждая роль последних в патогенезе АГ (Таблица 14). Так, тесные прямые связи были найдены между показателями, отражающими степень повреждения гепатоцитов (АлАт, АсАт, ГГТП) и гиперпродукцией IgA, IgG и ЦИК, а также с S, СОД и цитратом, что свидетельствует о взаимном влиянии интенсивности СО биомолекул и снижении активности АОС организма на повреждение клеток печени и нарушение иммунологического статуса при АГ. Показатели липидного спектра - ОХ и β-ЛП, были прямо сопряжены как с нарушением свободнорадикального гомеостаза, так и с повреждением гепатоцитов и низкой концентрацией 6-СМ. Следует отметить, что обратные связи между низкой концентрацией в моче 6-СМ и АлАт, ОХ, каспазой-1, и прямая связь с уменьшением активности АкГ доказывают роль эндогенного мелатонина в регуляции свободнорадикального гомеостаза и апоптотических процессов.

При корреляционном анализе иммунологических показателей: IgA (2), IgM (1), IgG (4), ЦИК (7), они проявляли множественные внутри- и межсистемные ассоциации, прямо взаимодействовали между собой, отражая степень дисбаланса иммунной системы. Прямая ассоциация иммуноглобулинов и ЦИК с концентрациями цитрата и ДК, и обратная связь с уменьшением уровня восстановленного глутатиона указывает на сопряженность процессов СО биомолекул и иммунологических параметров при воспалительном процессе в печени при АГ.

Таблица 14. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных первой группы с алкогольным гепатитом.

Показатель	1-ая группа (базисная терапия; n=28)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	ЦИК (r=+0,48; p=0,017) Цитрат (r=+0,48; p=0,011) Имак (r=+0,58; p=0,001) Каспаза-1 (r=+0,38; p=0,049)	6-СМ (r=-0,51; p=0,007)	Каталаза (r=+0,56; p=0,002) S (r=+0,49; p=0,011) ХЭ (r=+0,58; p=0,002)	Цитрат (r=-0,43; p=0,021)
АсАт	IgG (r=+0,38; p=0,049) ХЭ (r=+0,51; p=0,006)		ДК (r=+0,40; p=0,037)	
ГГТП	IgA (r=+0,37; p=0,047) ЛПНП (r=+0,47; p=0,011) S (r=+0,55; p=0,002)		ЦИК (r=+0,51; p=0,005) IgG (r=+0,39; p=0,041) IgA (r=+0,51; p=0,004)	α-токоферол (r=-0,42; p=0,026) АкГ (r=-0,46; p=0,014)
ХЭ	АсАт (r=+0,51; p=0,006) СОД (r=+0,39; p=0,038)	GSH (r=-0,48; p=0,01)	АлАт (r=-0,58; p=0,002)	
ОХ	S (r=+0,59; p=0,002) ЦИК (r=+0,39; p=0,041)	GSH (r=-0,45; p=0,017) 6-СМ (r=-0,37; p=0,049)	ЛПНП (r=+0,37; p=0,049) Каталаза (r=+0,49; p=0,022)	ГР (r=-0,38; p=0,045)

ЛПНП	ГГТП (r=+0,47; p=0,011)		IgA (r=+0,40; p=0,035) ОХ (r=+0,37; p=0,049) ЦИК (r=+0,39; p=0,036)	
6-СМ	АкГ(r=+0,45; p=0,017)	ОХ (r=-0,37; p=0,049) АлАт (r=-0,51; p=0,007) Каспаза-1(r=-0,41; p=0,032)		АлАт (r=-0,37; p=0,049) Цитрат (r=-0,38; p=0,045)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	ГГТП (r=+0,37; p=0,047) Цитрат (r=+0,41; p=0,029)		ЛПНП (r=+0,40; p=0,035) ГГТП (r=+0,51; p=0,004) Каспаза-3 (r=+0,48; p=0,029)	-
IgM	ЦИК (r=+0,40; p=0,037)		IgG (r=+0,54; p=0,003)	-
IgG	АсАт (r=+0,38; p=0,049) ЦИК (r=+0,46; p=0,014) Каспаза-3 (r=+0,52; p=0,005)	GSH (r=-0,43; p=0,022)	IgM (r=+0,54; p=0,003) ЦИК (r=+0,41; p=0,031) ГГТП (r=+0,39; p=0,041)	-
ЦИК	АлАт (r=+0,48; p=0,017) ДК (r=+0,43; p=0,031) ОХ (r=+0,39; p=0,041) IgM (r=+0,40; p=0,037) IgG (r=+0,46; p=0,014)	GSH (r=-0,40; p=0,037)	ГГТП (r=+0,51; p=0,005) Каспаза-1 (r=+0,38; p=0,049) IgG (r=+0,41; p=0,031) ЛПНП (r=+0,39; p=0,036)	-

	Цитрат (r=+0,54; p=0,003)			
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	ГГТП (r=+0,55; p=0,002) ОХ (r=+0,59; p=0,002) ДК (r=+0,54; p=0,003)	ГП (r=-0,48; p=0,01)	АлАт (r=+0,49; p=0,011)	GSH (r=+0,52; p=0,004)
Imax	АлАт (r=+0,58; p=0,001)	GSH (r=-0,63; p=0,001)	-	-
ДК	ЦИК (r=+0,43; p=0,031) Каспаза-1 (r=+0,53; p=0,007) S (r=+0,54; p=0,003)	ГР (r=-0,43; p=0,02)	СОД (r=+0,38; p=0,044) АсАт (r=+0,40; p=0,037)	
АкГ	6-СМ (r=+0,45; p=0,017)	Каспаза-3 (r=-0,58; p=0,005)	ГР (r=+0,37; p=0,046)	ГГТП (r=-0,46; p=0,014) Каспаза-3 (r=-0,44; p=0,021)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	ЦИК (r=+0,40; p=0,037) ГР (r=+0,56; p=0,003) ГП (r=+0,54; p=0,003)	ОХ (r=-0,45; p=0,017) IgG (r=-0,43; p=0,022) Цитрат (r=-0,39; p=0,043) ХЭ (r=-0,48; p=0,01) Imax (r=-0,63; p=0,001) Каспаза-3 (r=-0,39; p=0,043)	ГП (r=+0,49; p=0,022) Г-S-T (r=+0,55; p=0,013)	Каспаза-1 (r=-0,38; p=0,048) S (r=+0,52; p=0,004)
ГР	GSH (r=+0,56; p=0,003) Г-S-T (r=+0,52; p=0,007)	ДК (r=-0,43; p=0,02)	АкГ (r=+0,37; p=0,046)	ОХ (r=-0,38; p=0,045)



ГП	GSH (r=+0,54; p=0,003) α-токоферол (r=+0,37; p=0,045)	S (r=-0,48; p=0,01)	GSH (r=+0,49; p=0,022)	Каспаза -3 (r=-0,51; p=0,008)
Г-S-T	ГР (r=+0,52; p=0,007)		GSH (r=+0,55; p=0,013)	Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,012)
Каталаза	СОД (r=+0,67; p=0,001)	ЧСС (r=-0,39; p=0,041)	АлАт (r=+0,56; p=0,002) ОХ (r=+0,49; p=0,022) СОД (r=-0,66; p=0,002)	
СОД	ХЭ (r=+0,39; p=0,038) Каталаза (r=+0,67; p=0,001)		ДК (r=+0,38; p=0,044) Каталаза (r=-0,66; p=0,002)	
Цитрат	АлАт (r=+0,48; p=0,011) Iмах (r=+0,51; p=0,009) IgA (r=+0,41; p=0,029) ЦИК (r=+0,54; p=0,003)	GSH (r=-0,39; p=0,043) Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,013)	АлАт (r=-0,43; p=0,021)	6-СМ (r=-0,38; p=0,045)
α-токоферол	ГП (r=+0,37; p=0,045)			ГГТП (r=-0,42; p=0,026)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	Каспаза-1 (r=+0,53; p=0,007) АлАт (r=-0,38; p=0,049)	6-СМ (r=+0,41; p=0,032)	ЦИК (r=+0,38; p=0,049)	GSH (r=-0,38; p=0,048) ГП (r=-0,51; p=0,008)
Каспаза-3	IgG (r=+0,52; p=0,005) Цитрат (r=+0,46; p=0,013)	GSH (r=-0,39; p=0,043) АкГ (r=-0,58; p=0,005)	IgA (r=+0,48; p=0,029)	АГ (r=-0,44; p=0,021) Г-S-T (r=-0,46; p=0,012)

Параметры свободнорадикального окисления: S (4), I<sub>max</sub> (2), ДК (4), АкГ (2) были тесно ассоциированы с показателями апоптотических процессов (каспаза-1 и каспаза-3), что подтверждает роль окислительного стресса в инициации механизмов запрограммированной клеточной гибели, характеризующейся активацией каскада внутриклеточных каспаз.

Показатели антиоксидантной системы: GSH (9), ГР (2), ГП (3), каталаза (2), СОД (2), цитрат (6), α-токоферол (1) проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Таким образом, АОЗ организма при АГ была непосредственно связана со степенью поражения гепатоцитов, нарушением липидного и иммунологического спектра крови, интенсивностью СО биомолекул и активностью апоптотических процессов.

После проведения базисного лечения взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись. Полученные результаты представлены в таблице 14. Так, биохимические показатели: АлАт (3), АсАт (1), ГГТП (5), ХЭ (1), ОХ (2), ЛПНП (2), 6-СМ (2 связи) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, подтверждая роль последних в патогенезе АГ. Активности аминотрансфераз и ГГТП были тесно ассоциированы с показателями СО биомолекул (S, ДК), антиоксидантной (каталаза, цитрат, α-токоферол) и иммунной системы (IgA, IgG, ЦИК). Это указывает, что при нормализации метаболических и свободнорадикальных процессов, происходило уменьшение цитолиза гепатоцитов и иммунологического статуса у пациентов. Уменьшение активности ХЭ, являющейся одним из маркеров белково-синтезирующей функции печени при хроническом алкоголизме, характеризовалось сильной связью с уменьшением активности АлАт, что свидетельствует о нормализации метаболизма в гепатоцитах. Для показателей липидного обмена (ОХ, ЛПНП), снижающихся после базисного лечения, была обнаружена ассоциация, как с ферментативным звеном АОС, так и

с иммунологическими параметрами крови. Интересно, что незначительная нормализация концентрации 6-СМ имела отрицательную связь со степенью повреждения гепатоцитов, а именно с активностью АлАт и концентрацией цитрата. Это подтверждает предположение о том, что мелатонин играет важную роль в регуляции СО биомолекул и АОС организма.

Анализ ассоциативных связей иммунологических показателей: IgA (2), IgM (1), IgG (3), ЦИК (4) показал, что они проявляли прямую положительную связь с параметрами апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3) и ГГТП, снижающихся после базисного лечения, включающего прием гепатопротекторов, витаминов и метаболической терапии. Параметры свободнорадикального окисления: S (2), ДК (2), АкГ (3) были тесно ассоциированы с АлАт, АсАт, ГГТП и компонентами АОС организма (GSH, ГР, СОД), что указывает на уменьшение выраженности цитолитического синдрома и интенсивности ПОЛ при нормализации активности АОЗ у больных с АГ при базисном лечении.

Показатели антиоксидантной системы: GSH (4), ГР (2), ГП (2), Г-S-T (2) каталаза (3), СОД (2), цитрат (2),  $\alpha$ -токоферол (1) проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Компоненты глутатионовой системы (GSH, ГП, Г-S-T) имели обратную корреляционную связь с апоптотическими процессами, что указывает на торможение процессов запрограммированной клеточной смерти при АГ после базисного лечения. С активностью АлАт и ГГТП, которые уменьшались после проводимого лечения, наибольшую связь демонстрировали каталаза, цитрат и  $\alpha$ -токоферол. По-видимому, именно изменение данных показателей АОС в сторону нормы и уменьшение СО было связано с уменьшением цитолитического синдрома.

Модификации корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (3), каспаза-3 (3), свидетельствовали об уменьшении апоптотических процессов в организме больных АГ при снижении выраженности цитолитического синдрома

и СО биомолекул, а также изменений в сторону нормы иммунных показателей и содержания восстановленного глутатиона.

Анализ ассоциативных связей лабораторных параметров 2-й группы больных с АГ до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (2), ГГТП (3), ХЭ (3), ОХ (4), ЛПНП (1), 6-СМ (4 связей), проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, подтверждая роль последних в патогенезе АГ, как и в 1-ой группе больных.

После комбинированной терапии с эпифамином взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись (Таблица 15). Биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (3), ГГТП (4), ХЭ (2), ОХ (2), ЛПНП (2), 6-СМ (7 связи) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов. Показатели цитолитического синдрома (АлАт, АсАт, ГГТП) проявляли тесную корреляцию с параметрами, отражающими активность свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>, ДК) и иммунный статус организма (ЦИК, IgG), отрицательную связь с показателями глутатионовой системы (GSH, ГР, ГП). При этом 6-СМ был положительно ассоциирован с показателями глутатионовой системы и отрицательно с цитратом, ХЭ и каспазой-3. Таким образом, по-видимому, повышение уровня эндогенного мелатонина под действием эпифамина оказывало положительное влияние на функционирование глутатионовой системы и на свободнорадикальный гомеостаз в целом, что приводило к нормализации печеночных, иммунных параметров и процессов ПОЛ в организме. Следует отметить, что показатели липидного обмена ОХ и ЛПНП имели корреляцию с компонентами ферментативного (каталаза) и неферментативного (цитрат) звеньев АОС, а также с 6-СМ. Данные подтверждают предположение об антиоксидантном и гиполипидемическом действии

мелатонина, уровень которого корректируется при комбинированном лечении с эпифамином.

При корреляционном анализе иммунологических показателей: IgA (2), IgM (1), IgG (3), ЦИК (2) было выявлено, что они проявляют множественные внутри- и межсистемные ассоциации. Эти показатели взаимодействовали между собой параметрами антиоксидантной системы (СОД, каталаза, цитрат,  $\alpha$ -токоферол, ГП), отражая степень нормализации функционирования иммунной системы при активизации антиоксидантной защиты организма.

Параметры свободнорадикального окисления: S (3), I<sub>max</sub> (1), ДК (2), АкГ (1), были тесно ассоциированы с печеночными пробами (АсАт, ГГТП), показателями апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3) и содержанием  $\alpha$ -токоферола. Очевидно, что повышение уровня мелатонина под действием эпифамина приводило к снижению интенсивности свободнорадикальных процессов, и как следствие к нормализации концентрации  $\alpha$ -токоферола, уровня апоптотических процессов и активности аминотрансфераз.

Показатели антиоксидантной системы: GSH (2), ГР (3), ГП (3), Г-S-T (2) каталаза (4), СОД (4), цитрат (4),  $\alpha$ -токоферол (5), проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Компоненты глутатионовой системы (GSH, ГП, ГР) имели положительную корреляционную связь с концентрацией 6-СМ. По всей вероятности, повышение в организме уровня эндогенного мелатонина под действием комбинированной терапии с эпифамином, приводило к активации антиоксидантных ферментов и восстанавливало концентрацию глутатиона до нормального уровня. Другие компоненты АОЗ (каталаза, СОД, цитрат,  $\alpha$ -токоферол) имели положительные и отрицательные связи с показателями иммунной системы, свободнорадикального окисления и апоптотических процессов, доказывая непосредственную роль АОЗ в метаболических процессах организма. Изменение корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (3), каспаза-3 (3), свидетельствовали о уменьшении процессов апоптоза в организме больных АГ

Таблица 15. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных второй группы с алкогольным гепатитом.

Показатель	2-ая группа (комбинированное лечение с эпифамином; n=22)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	ЛПНП (r=+0,55; p=0,009) S (r=+0,49; p=0,011) Цитрат (r=+0,42; p=0,024) IgA (r=+0,47; p=0,027) IgG (r=+0,48; p=0,025)		ЦИК (r=+0,58; p=0,004) IgG (r=+0,48; p=0,025) Каспаза-1 (r=+0,42; p=0,023)	ГР (r=-0,43; p=0,048) GSH (r=-0,59; p=0,005)
АсАт	СОД (r=+0,6; p=0,003) ХЭ (r=+0,39; p=0,04)	GSH (r=-0,51; p=0,016)	Иmax (r=+0,49; p=0,019) ДК (r=+0,53; p=0,008)	ГП (r=-0,44; p=0,033)
ГГТП	ЛПНП (r=+0,62; p=0,003) ЦИК (r=+0,44; p=0,035) Каспаза-3 (r=+0,57; p=0,01)		S (r=+0,41; p=0,029) Каталаза (r=+0,45; p=0,023)	ГР (r=-0,54; p=0,023) α-токоферол (r=-0,46; p=0,033)
ХЭ	АсАт (r=+0,39; p=0,04)			6-СМ (r=-0,52; p=0,013) Г-S-T (r=-0,44; p=0,042)
ОХ	IgM (r=+0,44; p=0,023)	GSH (r=-0,49; p=0,012)	Каталаза (r=+0,48; p=0,025) Цитрат (r=+0,57; p=0,006)	
ЛПНП	АлАт (r=+0,55; p=0,009)			α-токоферол (r=-0,4;

	ГГТП (r=+0,62; p=0,003)			p=0,041) 6-СМ (r=+0,42; p=0,032)
6-СМ	АкГ (r=+0,62; p=0,002)	Каталаза (r=-0,47; p=0,019) Каспаза-3 (r=-0,61; p=0,001) I <sub>max</sub> (r=-0,49; p=0,022)	GSH (r=+0,42; p=0,038) ГР (r=+0,44; p=0,043) ГП (r=+0,54; p=0,008)	ХЭ (r=-0,52; p=0,013) Цитрат (r=-0,54; p=0,01) Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,03) β-ЛПНП (r=-0,42; p=0,032)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	АлАт (r=+0,47; p=0,027) α-токоферол (r=+0,39; p=0,037)		СОД(r=+0,43; p=0,038)	α-токоферол (r=-0,41; p=0,036)
IgM	Каталаза (r=+0,45; p=0,036) ОХ (r=+0,44; p=0,023)	ГР (r=-0,47; p=0,026)	Цитрат (r=+0,45; p=0,01)	
IgG	АлАт (r=+0,48; p=0,025)		Каспаза-3 (r=+0,56; p=0,007) АлАт (r=+0,48; p=0,025)	ГП (r=-0,49; p=0,029)
ЦИК	ГГТП (r=+0,44; p=0,035) СОД (r=+0,49; p=0,033) Цитрат (r=-0,47; p=0,026)		АлАт (r=+0,58; p=0,004) Каталаза (r=+0,46; p=0,03)	
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	АлАт (r=+0,49; p=0,011)	GSH(r=-0,48; p=0,029)	ГГТП (r=+0,41; p=0,029) Каспаза-3 (r=+0,58; p=0,011)	α-токоферол (r=-0,66; p=0,001)
I <sub>max</sub>		6-СМ (r=-0,49; p=0,022)	АсАт (r=+0,49; p=0,019)	

ДК	Каспаза-1 (r=+0,47; p=0,025) Каспаза-3 (r=+0,61; p=0,003)	ГП (r=-0,49; p=0,029)	АсАт (r=+0,53; p=0,008) Каспаза-1 (r=+0,5; p=0,014)	
АкГ		6-СМ (r=-0,62; p=0,002) Каспаза-1 (r=-0,45; p=0,025)	α-токоферол (r=+0,51; p=0,012)	
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	ГП (r=+0,58; p=0,013)	α-токоферол (r=-0,51; p=0,014) S (r=-0,48; p=0,029) АсАт (r=-0,51; p=0,016) ОХ (r=-0,49; p=0,012)	6-СМ (r=+0,42; p=0,038)	АлАт (r=-0,59; p=0,005)
ГР	Г-S-T (r=+0,44; p=0,04)	IgM (r=-0,47; p=0,026)	6-СМ (r=+0,44; p=0,043)	ГГТП (r=-0,54; p=0,023) АлАт (r=-0,43; p=0,048)
ГП	Цитрат (r=+0,47; p=0,027) GSH (r=+0,58; p=0,013) α-токоферол (r=+0,43; p=0,034)	ДК (r=-0,49; p=0,029)	6-СМ (r=+0,54; p=0,008)	IgG (r=-0,49; p=0,029) АсАт (r=-0,44; p=0,033)
Г-S-T	ГР (r=+0,44; p=0,04)			ХЭ (r=-0,44; p=0,042) Каталаза (r=-0,47; p=0,027)
Каталаза	IgM (r=+0,45; p=0,036) Цитрат (r=+0,55; p=0,039)		ОХ (r=+0,48; p=0,025) ГГТП (r=+0,45; p=0,023) ЦИК (r=+0,46; p=0,03)	Г-S-T (r=-0,47; p=0,027)



СОД	ЦИК (r=+0,49; p=0,033) АсАт (r=+0,6; p=0,003)	6-СМ (r=-0,47; p=0,019)	IgA(r=+0,43; p=0,038) Цитрат (r=+0,5; p=0,018) Каспаза-1 (r=+0,45; p=0,034)	
Цитрат	ЦИК (r=+0,47; p=0,026) Каспаза-3 (r=+0,44; p=0,04) каталаза (r=+0,55; p=0,039)		IgM (r=+0,45; p=0,01) ОХ (r=+0,57; p=0,006) СОД (r=+0,5; p=0,018)	6-СМ (r=-0,54; p=0,01)
α-токоферол	ГП (r=+0,47; p=0,027) IgA (r=+0,39; p=0,037)	GSH (r=-0,51; p=0,014)	АкГ (r=+0,51; p=0,012)	ГГТП (r=-0,46; p=0,033) IgA (r=-0,41; p=0,036) S (r=-0,66; p=0,001)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	ДК (r=+0,47; p=0,025) Каспаза-3 (r=+0,64; p=0,001)	АкГ(r=-0,45; p=0,025)	ДК (r=+0,5; p=0,014) АлАт (r=+0,42; p=0,023) СОД (r=+0,45; p=0,034)	
Каспаза-3	ДК (r=+0,61; p=0,003) Каспаза-1 (r=+0,64; p=0,001) ГГТП (r=+0,57; p=0,01) Цитрат (r=+0,44; p=0,04)	6-СМ (r=-0,61; p=0,001)	IgG (r=+0,56; p=0,007) S (r=+0,58; p=0,011)	6-СМ (r=-0,46; p=0,03)

при нормализации концентрации 6-СМ, отражающего уровень мелатонина, и снижении степени выраженности свободнорадикальных процессов. Известно, что мелатонин уменьшает уровень окислительного повреждения липидов и ДНК [503], увеличивает экспрессию антиапоптотических генов группы Bcl-2, защищая липиды от пероксидного окисления и последующего апоптоза клеток [516].

Как и в предыдущих двух группах больных с АГ, анализ ассоциативных связей лабораторных параметров 3-ей группы пациентов до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (2), ГГТП (4), ХЭ (5), ОХ (3), ЛПНП (6), 6-СМ (2 связи), проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса (IgA (2), IgM (2), IgG (2), ЦИК (4 связи), свободнорадикального окисления (S (3), I<sub>max</sub> (2), ДК (3), АкГ (3 связи)), антиоксидантной системы (GSH (5), ГР (3), ГП (6), Г-S-T (5), каталаза (4), СОД (2), цитрат (1), α-токоферол (2 связи) и апоптотических процессов (каспаза-1 (3), каспаза-3 (3 связи)) (Таблица 16). Полученные данные подтверждают роль процессов СО биомолекул в патогенезе АГ, а именно в развитии цитолитического синдрома, нарушениях липидного обмена и иммунного статуса. Важную роль нарушение свободнорадикального гомеостаза играет также в развитии апоптотических процессов, активация которых происходит при данном патологическом состоянии. Следует отметить, что во всех группах больных до лечения были обнаружены ассоциативные связи между нарушением антиоксидантного статуса и пониженным уровнем в организме эндогенного мелатонина, концентрация которого оценивалась по содержанию в моче 6-СМ.

После комбинированного лечения с мелаксеном взаимоотношения всех показателей изменялись. Биохимические показатели: АлАт (4), АсАт (2), ГГТП (2), ХЭ (4), ЛПНП (2), β-ЛП (2), 6-СМ (7 связи), проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов.

Таблица 16. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных третьей группы с алкогольным гепатитом.

Показатель	3-я группа (комбинированное лечение с мелаксеном; n=24)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	ЛПНП (r=+0,53; p=0,007) IgM (r=+0,43; p=0,032) ХЭ (r=+0,53; p=0,006) Каталаза (r=+0,41; p=0,033)	АкГ (r=-0,44; p=0,024)	ГГТП (r=+0,42; p=0,037) ЦИК (r=+0,41; p=0,042) ХЭ (r=+0,4; p=0,039)	GSH (r=-0,51; p=0,008)
АсАт	IgG (r=+0,41; p=0,039) I <sub>max</sub> (r=+0,55; p=0,005)		S (r=+0,57; p=0,003) Цитрат (r=+0,44; p=0,031)	
ГГТП	IgA (r=+0,42; p=0,047) Каспаза-1 (r=+0,49; p=0,013)	АкГ (r=-0,43; p=0,028) α-токоферол (r=-0,54; p=0,006)	АлАт (r=+0,42; p=0,037) S (r=+0,47; p=0,029)	
ХЭ	АлАт (r=+0,53; p=0,006) ЛПНП (r=+0,52; p=0,011) ЦИК (r=+0,44; p=0,03) ДК (r=+0,46; p=0,02) ГП (r=+0,49; p=0,013)		АлАт (r=+0,4; p=0,039) I <sub>max</sub> (r=+0,47; p=0,031) СОД (r=+0,40; p=0,048) Каталаза (r=+0,45; p=0,021)	
ОХ	ЛПНП (r=+0,49; p=0,014) ЦИК (r=+0,41; p=0,031)	GSH (r=-0,42; p=0,026)	ЛПНП (r=+0,52; p=0,012)	Цитрат (r=-0,55; p=0,004)

ЛПНП	АлАт (r=+0,53; p=0,007) ОХ (r=+0,49; p=0,014) СОД (r=+0,40; p=0,045)	ХЭ (r=-0,52; p=0,011) IgM (r=-0,48; p=0,015) Г-S-T (r=-0,44; p=0,029)	ОХ (r=+0,52; p=0,012)	6-СМ (r=-0,52; p=0,008)
6-СМ		S (r=-0,47; p=0,024) Каталаза (r=-0,51; p=0,014)	GSH (r=+0,66; p=0,002) ГП (r=+0,71; p=0,000) α-токоферол (r=+0,5; p=0,012)	IgG (r=-0,45; p=0,024) IgA (r=-0,48; p=0,015) Каспаза-1 (r=-0,62; p=0,001) ЛПНП (r=-0,52; p=0,008)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	ГГТП (r=+0,42; p=0,047)	ГП (r=-0,41; p=0,032)		6-СМ (r=-0,48; p=0,015) ГР (r=-0,42; p=0,039)
IgM	АлАт (r=+0,43; p=0,032) ЛПНП (r=+0,48; p=0,015)		Каспаза-3 (r=+0,41; p=0,042)	ГП (r=-0,45; p=0,023)
IgG	АсАт (r=+0,41; p=0,039) ГП (r=+0,42; p=0,03)		Каспаза-3 (r=+0,43; p=0,033) Каспаза-1 (r=+0,52; p=0,008)	6-СМ (r=-0,45; p=0,024)
ЦИК	ОХ (r=+0,41; p=0,031) ХЭ (r=+0,44; p=0,03) Каспаза-3 (r=+0,40; p=0,048) ДК (r=+0,51; p=0,011)		Каспаза-1 (r=+0,48; p=0,017) АлАт (r=+0,41; p=0,042)	
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	Каспаза-3 (r=+0,54; p=0,006)	6-СМ (r=-0,47; p=0,024) ГР (r=-0,44; p=0,02)	АсАт (r=+0,57; p=0,003) СОД (r=+0,48; p=0,017)	

			ГТПП (r=+0,47; p=0,029)	
Imax	AcAT (r=+0,55; p=0,005)	GSH (r=-0,53; p=0,008)	Каталаза (r=+0,52; p=0,009) ХЭ (r=+0,47; p=0,031)	α-токоферол (r=-0,43; p=0,038)
ДК	ХЭ (r=+0,46; p=0,02) ЦИК (r=+0,51; p=0,011)	ГП (r=-0,48; p=0,012)	Каспаза-1 (r=+0,53; p=0,007) Каспаза-3 (r=+0,42; p=0,037)	GSH (r=-0,60; p=0,002) Г-S-T (r=-0,47; p=0,022)
АкГ		АлАТ (r=-0,44; p=0,024) ГТПП (r=-0,43; p=0,028) Каспаза-1 (r=-0,46; p=0,034)	ГР (r=+0,41; p=0,04) Г-S-T (r=+0,42; p=0,035) α-токоферол (r=+0,41; p=0,033)	
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	α-токоферол (r=+0,43; p=0,026) ГР (r=+0,57; p=0,005) Г-S-T (r=+0,51; p=0,011)	ОХ (r=-0,42; p=0,026) Imax (r=-0,53; p=0,008)	6-СМ(r=+0,06; p=0,002) ГП (r=+0,66; p=0,001)	ДК (r=-0,60; p=0,002) АлАТ (r=-0,51; p=0,008)
ГР	Г-S-T (r=+0,47; p=0,019) GSH (r=+0,57; p=0,005)	S (r=-0,44; p=0,02)	Г-S-T (r=+0,75; p=0,000) АкГ (r=+0,41; p=0,04)	IgA (r=-0,42; p=0,039)
ГП	Г-S-T (r=+0,4; p=0,05)	ХЭ (r=-0,49; p=0,013) Каталаза (r=-0,41; p=0,04) IgA (r=-0,41; p=0,032) IgG (r=-0,42; p=0,03) ДК (r=-0,48; p=0,012)	6-СМ (r=+0,71; p=0,000) GSH(r=+0,66; p=0,001)	IgM (r=-0,45; p=0,023)
Г-S-T	ГР (r=+0,47; p=0,019)	ЛПНП (r=-0,44; p=0,029) Каталаза (r=-0,47;	ГР (r=+0,75; p=0,000) АкГ (r=+0,42; p=0,035)	ДК (r=-0,47; p=0,022)

	ГП (r=+0,4; p=0,05) GSH (r=+0,51; p=0,011)	p=0,014)		
Каталаза	АлАт (r=+0,41; p=0,033)	ГП (r=-0,41; p=0,04) 6-СМ (r=-0,51; p=0,014) Г-S-T (r=-0,47; p=0,014)	ХЭ (r=+0,45; p=0,021) I <sub>max</sub> (r=+0,52; p=0,009)	
СОД	ЛПНП (r=+0,40; p=0,045) Каспаза-1 (r=+0,42; p=0,029)		ХЭ (r=+0,40; p=0,048) Каспаза-3 (r=+0,46; p=0,021) S (r=+0,48; p=0,017)	
Цитрат	Каспаза-3 (r=+0,46; p=0,022)		АсАт (r=+0,44; p=0,031) Каспаза-1 (r=+0,55; p=0,004)	ОХ (r=-0,55; p=0,004)
α-токоферол	GSH (r=+0,43; p=0,026)	ГГТП (r=-0,54; p=0,006)	6-СМ (r=+0,5; p=0,012) АкГ (r=-0,41; p=0,033)	I <sub>max</sub> (r=-0,43; p=0,038)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	ГГТП (r=+0,49; p=0,013) СОД (r=+0,42; p=0,029)	АкГ (r=-0,46; p=0,034)	Цитрат (r=+0,55; p=0,004) ЦИК (r=+0,48; p=0,017) ДК (r=+0,53; p=0,007) IgG (r=+0,52; p=0,008)	6-СМ (r=-0,62; p=0,001)
Каспаза-3	Цитрат (r=+0,46; p=0,022) S (r=+0,54; p=0,006)	ЦИК (r=-0,40; p=0,048)	IgM (r=+0,41; p=0,042) IgG (r=+0,43; p=0,033) ДК (r=+0,423; p=0,037) СОД (r=+0,46; p=0,021)	

Так, АлАт, АсАт, ГГТП, ХЭ проявляли корреляционные связи как с параметрами, отражающими активность свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>), так и показателями ферментативного (СОД, каталаза) и неферментативного (цитрат, GSH) звеньев АОС организма. 6-СМ имел более выраженные, чем при комбинированном лечении с эпифамином, тесные положительные связи с показателями глутатионовой системы (GSH, ГП) и α-токоферолом и отрицательные с каспазой-1 и параметрами иммунного статуса (IgA, IgG). Липидные показатели, нормализация которых происходила после комбинированной терапии с мелаксеном, были ассоциированы с повышением концентрации 6-СМ в моче и цитратов крови. Полученные данные подтверждают, что мелатонин обладает антиокислительными и гиполипидемическими свойствами.

Показатели иммунологического статуса: IgA (2), IgM (2), IgG (3), ЦИК (2), при корреляционном анализе проявляли множественные и межсистемные ассоциации в первую очередь с параметрами апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3) и концентрацией в моче 6-СМ. Благоприятное влияние применения мелаксена при лечении пациентов, страдающих АГ, выражается в более существенном снижении уровня апоптотических процессов. Согласно имеющимся данным, каспазы не только принимают участие в апоптозе, но и непосредственно связаны с силой иммунного ответа при патологических состояниях. Данный эффект объясняется тем, что каспазы участвует в формировании сигналов пролиферации Т-лимфоцитов. Таким образом, ингибирование активностей каспазы-1 и каспазы-3 после комбинированного лечения с мелаксеном, приводит к нормализации иммунного ответа организма у больных с АГ.

Параметры свободнорадикального окисления: S (3), I<sub>max</sub> (3), ДК (4), АкГ (3), были ассоциированы с компонентами глутатионовой системы (GSH, ГР, Г-S-T), и также как и во 2-ой группе больных после комбинированной терапии с эпифамином, с печеночными пробами (АсАт, ГГТП) и показателями

апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3). Очевидно, что мелатонин входящий в состав мелаксена, проявляет антиоксидантные свойства, выступая в роли сквенджера по отношению к АФК, чрезмерно генерируемых при АГ, и активизирует глутатионовую систему, что приводит к подавлению свободнорадикальных и апоптотических процессов, и снижению цитолиза гепатоцитов.

Параметры АОС организма: GSH (4), ГР (3), ГП (3), Г-S-T (2), каталаза (2), СОД (3), цитрат (3),  $\alpha$ -токоферол (3), проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Компоненты глутатионовой системы (GSH, ГП, ГР, Г-S-T), как было отмечено выше, проявляли положительную корреляционную связь с концентрацией 6-СМв моче, были ассоциированы с параметрами свободнорадикальных и апоптотических процессов, а также биохимическими показателями, свидетельствующими о уменьшении цитолитического синдрома у больных с АГ после комбинированной терапии с мелаксеном. Другие компоненты АОЗ организма (каталаза, СОД, цитрат,  $\alpha$ -токоферол) имели положительные связи с параметрами свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>, АкГ), апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3) и возрастанием содержания в моче 6-СМ. Таким образом, после применения мелаксена происходила нормализация функционирования всех исследуемых компонентов АОС, что сопровождалось уменьшением процессов ПОЛ и запрограммированной клеточной смерти – апоптоза.

Как было сказано ранее, изменение корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (5), каспаза-3 (4), свидетельствовали об уменьшении апоптотических процессов в организме больных АГ, нормализации иммунного статуса организма, что связано с непосредственным влиянием мелаксена на свободнорадикальные процессы, а также ферментативное и неферментативное звенья АОС организма.



## **ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛИНИЧЕСКУЮ КАРТИНУ, СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ, АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БОЛЬНЫХ С НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ**

### **4.1. Изменения клинической картины и показателей лабораторных, инструментальных исследований при неалкогольном стеатогепатите, развивающимся при сахарном диабете 2 типа, и применении препаратов, корректирующих уровень мелатонина**

До проведения терапии у больных с НАСГ, развивающимся при СД2, были выражены признаки, характерные для данной патологии. После курса базисного лечения происходило улучшение общего состояния пациентов (Таблица 17). Прием гепатопротекторов оказывал положительное влияние на клеточный метаболизм и регенерацию гепатоцитов [375]. Так, после базисной терапии болезненность в правом подреберье снижалась у 48,5 % пациентов. Очевидно, под действием гепатопротекторов и метаболической терапии происходило улучшение микроциркуляции и функциональной способности гепатоцитов, что в свою очередь приводило к уменьшению и воспалительного процесса в печени. Такие клинические признаки, как гепатомегалия и спленомегалия не изменялись. Диспепсические расстройства исчезали у 33,3% больных, а иктеричность склер у 21,2%. После проведения базисной терапии НАСГ происходило улучшение психо-эмоционального состояния: общая утомляемость уменьшалась у 81,8%, нарушение сна у 78,7 % больных по сравнению с данными до лечения. Аппетит нормализовался у 24,2% больных. Таким образом, улучшение общего состояния при проведении базисной терапии у пациентов с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, отмечалось у 55,9 % больных.

Таблица 17. Изменение общего состояния больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа, после проведения базисного лечения.

Клинические симптомы	1-ая группа			
	Количество больных (n=33)			
	До лечения		После лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	27	81,8	11	33,3
Диспепсия	16	48,5	5	15,2
Иктеричность склер	10	30,4	3	9,1
Гепатомегалия	31	93,9	31	93,9
Спленомегалия	8	24,2	8	24,2
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	33	100	6	18,2
Снижение аппетита	13	39,4	5	15,2
Нарушение сна	32	96,9	6	18,2

Средние значения систолического АД при поступлении пациентов 1-й группы в стационар составили 159,1 мм рт. ст., диастолического АД – 91,9 мм рт. ст. После проведения базисной терапии наблюдалась тенденция к снижению систолического АД у обследованной группы больных в среднем до 138,9 мм рт. ст. Существенных изменений средних значений диастолического АД не наблюдалось, его показатель составил в среднем 87,1 мм рт. ст. Число сердечных сокращений (ЧСС) до лечения составляло 87,2 удара в минуту, после базисного лечения 80,2 удара в минуту. Очевидно, что после применения

антигипертензивной терапии, включенной в базисное лечение, происходили изменения данных показателей в сторону нормы.

У больных с НАСГ, получавших дополнительно к базисной терапии эпифамин, после окончания курса лечения наблюдалось более значительное улучшение общего состояния по сравнению с результатами стандартного лечения (Таблица 18). Так, общая утомляемость уменьшалась у 92,8 % пациентов, что выше, чем в 1-ой группе больных. После проведения комбинированной терапии с эпифамином наблюдалось улучшение сна у 89,2 % больных. Очевидно, обладая антидепрессивным и снотворным эффектом, мелатонин, коррекция уровня которого происходила под действием данного препарата, позитивно влиял на астено-вегетативные расстройства [162]. Нормализация аппетита наблюдалась у 28,5%. Болезненность в правом подреберье уменьшалась у 53,5 % пациентов. Частота встречаемости гепатомегалии и спленомегалии после лечения также, как и в первой группе, не изменялась. Диспепсия уменьшалась у 35,7% пациентов, иктеричность склер – у 21,4% больных. Как показали результаты лечения, положительный клинический эффект при комбинированной терапии с эпифамином, проводимой при НАСГ, наблюдался у 62,1% больных, что выше, чем в первой группе пациентов.

Таблица 18. Изменение общего состояния больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета типа, после комбинированного лечения с эпифамином.

Клинические симптомы	2-ая группа			
	Количество больных (n=28)			
	До лечения		После лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	23	82,1	8	28,6

Диспепсия	13	46,4	3	10,7
Иктеричность склер	10	32,1	3	10,7
Гепатомегалия	26	92,9	26	92,9
Спленомегалия	8	28,6	8	28,6
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	28	100	2	7,2
Снижение аппетита	11	39,2	3	10,7
Нарушение сна	27	96,4	2	7,2

Во второй группе больных с НАСГ средние значения систолического АД составляли 157,4 мм рт. ст., диастолического АД – 91,8 мм рт. ст. При проведении комбинированной терапии с эпифамином значительных отличий в изменении АД между группами больных не отмечалось. Так, после лечения с эпифамином средние значения систолического АД были 141,7 мм рт. ст., диастолического АД – 81,3 мм рт. ст. ЧСС до лечения составляло 87,8 удара в минуту, после базисного лечения с эпифамином – 76,8 удара в минуту. Вероятно, что изменения ЧСС могли быть связаны с влиянием мелатонина, уровень которого корригировался под действием эпифамина, о чем свидетельствует уровень 6-СМ в моче. Положительное влияние мелатонина может быть связано с тем, что он обладает тормозным эффектом на ЦНС и, по мнению некоторых авторов, способен оказывать кардиопротекторное действие [349].

Таблица 19. Изменение общего состояния больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа, после комбинированного лечения с мелаксеном.

Клинические симптомы	3-я группа			
	Количество больных (n=26)			
	До лечения		После лечения	
	Абс.	%	Абс.	%

<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	22	84,6	6	23,1
Диспепсия	14	53,8	2	7,6
Иктеричность склер	9	34,6	2	7,6
Гепатомегалия	25	96,2	25	96,2
Спленомегалия	6	23,1	6	23,1
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	26	100	2	7,6
Снижение аппетита	11	42,3	2	7,6
Нарушение сна	25	96,2	1	3,8

У больных с НАСГ, получавших дополнительно к базисной терапии мелаксен, после окончания курса лечения наблюдалось более значительное улучшение общего состояния по сравнению с результатами базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином (Таблица 19). Так, общая утомляемость и нарушение сна после проведения комбинированного лечения с мелаксеном уменьшались у 92,4 % пациентов, что выше, чем в первой и второй группах больных. Очевидно, обладая антидепрессивным и снотворным эффектом, мелатонин, входящий в состав препарата, позитивно влиял на астено-вегетативные расстройства [162]. Являясь естественным хронобиотиком, синхронизирующим циркадианные биоритмы, мелатонин способен обеспечивать нормализацию различных сторон деятельности ЦНС. Анксиолитический эффект мелатонина реализуется за счет модулирующего влияния на ГАМК-ергические рецепторы, приводящего к повышению сродства ГАМК-рецепторов к ГАМК [573]. Нормализация аппетита наблюдалась у 34,7%. Болезненность в правом подреберье уменьшалась у 61,5 % пациентов. Частота встречаемости гепатомегалии и спленомегалии после лечения также, как и в первой и второй

группах, не изменялась. Диспепсия уменьшалась у 46,2% пациентов, иктеричность склер – у 27,0% больных. Как показали результаты лечения, положительный клинический эффект при комбинированной терапии с мелаксеном, проводимой при НАСГ, наблюдался у 66,7% пациентов, что выше, чем в предыдущих группах больных.

В третьей группе больных с НАСГ средние значения систолического АД составляли 160,2 мм рт. ст., диастолического АД 93,9 – мм рт. ст. При проведении комбинированной терапии с мелаксеном значительных отличий в изменении АД между группами больных не отмечалось. Так, после лечения с мелаксеном средние значения систолического АД были 142,1 мм рт. ст., диастолического АД – 81,1 мм рт. ст. ЧСС до лечения составляло 88,6 удара в минуту, после комбинированного лечения с мелаксеном – 70,1 удара в минуту. Вероятно, что изменения ЧСС могли быть связаны с влиянием мелатонина на сосудистый тонус за счет воздействия на адренергические и пептидергические окончания периваскулярных нервов [22,23], на адренергические рецепторы или вторичные мессенджеры в цепи адренергической стимуляции мышечного сокращения и стимуляцией продукции NO-синтазы клетками эндотелия сосудов с последующим увеличением продукции оксида азота и вазодилатацией [350, 667].

По данным электрокардиографического исследования у больных первой и второй групп отмечались патологические изменения в миокарде: гипертрофия миокарда левых отделов сердца (79,6%), постинфарктный кардиосклероз (27,1%), нарушение проводимости по ножкам пучка Гиса (18,6%). Существенных изменений показателей электрокардиографического исследования у пациентов обеих групп после проведенного лечения не наблюдалось.

У всех групп больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, до проведения терапии при ультразвуковом исследовании (УЗИ) печени определялось диффузное изменение печени, которое регистрировалось и после проведения базисного и комбинированного лечения в стационаре.

Таблица 20. Влияние эпифамина и мелаксена на показатели артериального давления и частоту сердечных сокращений у больных с неалкогольным стеатогепатитом на фоне базисной терапии.

Показатели	Единицы измерения	1-ая группа (базисное лечение; n=33)		2-я группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=28)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=26)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
АД (систолическое)	мм рт. ст. (норма: 120-135)	159,1±4,9*	138,9±3,1**	157,4 ±3,8*	141,7±3,3**,#	160,2±4,4*	142,1±4,6**
АД (диастолическое)	мм рт. ст. (норма: 70-85)	91,9±2,1*	87,1±2,3**	91,8±3,2*	81,3±1,9**,#	93,9±2,6*	81,1±2,1**,#
ЧСС	ударов в минуту (норма: 60-80)	87,2±3,2*	80,2±1,8**	87,8±1,9*	76,8±2,3**,#	88,6±1,9*	70,1±2,2**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Таблица 21. Влияние эпифамина и мелаксена на показатели общего анализа крови у больных неалкогольным стеатогепатитом на фоне базисной терапии.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (n=35)		2-ая группа (n=39)		3-я группа (n=31)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Гемоглобин	г/л	134,0±7,4	126,1±5,6	127,5±3,6	131,3±6,0	130,2±3,2	130,8±4,4	132,1±4,8
Эритроциты	×10 <sup>12</sup>	4,2±0,2	3,8 ±0,3	4,0±0,2	4,0±0,4	4,1±0,3	4,2±0,3	4,1±0,4
Лейкоциты	×10 <sup>9</sup>	4,9±0,5	5,6 ±0,8	5,4±0,6	5,0±0,7	4,9±0,8	4,9±0,6	5,1±0,8
Эозинофилы	% в 1мкл	2,4±0,9	2,1± 0,9	2,2±0,8	2,5±0,7	2,4±0,6	2,2±0,9	2,4±0,7
Лимфоциты	% в 1мкл	31,7±2,2	33,5±3,4	31,6± 2,2	29,7± 2,1	31,1± 2,2	32,5±2,2	30,9±2,0
Моноциты	% в 1мкл	6,2±1,5	6,0± 1,1	5,6±0,7	5,8±2,3	5,7±1,9	5,9±1,9	5,8±1,0
Нейтрофилы:								
Сегментоядерные	% в 1мкл	57,8±4,2	55,1± 4,4	52,6± 2,5	54,9± 5,6	53,9± 3,2	53,8±4,3	53,7±4,1
Палочкоядерные	% в 1мкл	5,1±0,2	5,0 ±1,5	5,3±1,2	5,4±2,0	4,8±1,5	5,5±1,9	5,2±0,8
Скорость оседания эритроцитов	мм/ч	6,7±1,8	7,6± 2,3	7,3± 1,9	7,4± 1,8	7,0±1,9	7,3±1,8	6,9±1,9



Таблица 22. Влияние комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном на биохимические показатели крови у больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (базисное лечение; n=33)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=28)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=26)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Глюкоза (натощак)	ммоль/л	4,8±0,8	11,7±1,6*	8,6±1,7**	11,3±2,9*	6,9±0,9**,#	12,3±2,3*	6,8±0,8**,#
Глюкоза (постпрандиальная)	ммоль/л	5,6±0,9	13,4±2,1*	9,6±1,9**	13,1±2,3*	8,7±1,3**	13,9±1,9*	8,3±0,9**,#
HbA1c	%	5,2±0,9	8,9±0,8*	7,2±0,4**	8,7±0,8*	6,4±0,4**,#	9,2±1,2*	6,3±0,3**,#
С-пептид	нг/мл	0,3 - 3,7	2,4±0,9	3,1±0,8	2,5±0,6	3,3±0,9	2,6±0,8	3,6±0,7
Инсулин	мкЕД/мл	6,7±0,5	10,6±1,4	13,5±1,5	10,3±1,6	14,1±1,3	10,4±1,4	14,6±1,7
Индекс НОМА-IR	>2,7	1,4±0,2	5,5±0,4*	5,1±0,4	5,2±0,5*	4,3±0,4**,#	5,7±0,6*	4,3±0,5**,#
Общий белок	г/л	65-85	74,9± 2,6	73,0± 1,4	71,3±2,5	69,7±3,1	73,9±2,3	80,1±2,9
Мочевина	ммоль/л	2,5-6,4	5,3± 1,5	5,6± 1,9	6,5±1,6	6,1±1,2	6,2±1,2	5,6±1,3
ЛПНП	ммоль/л	1,7-4,5	12,7± 2,1*	10,3±0,7	10,7±2,5*	7,1±0,5**,#	12,1±2,5*	6,8±0,4**,#
ЛПВП	ммоль/л	> 1,55	1,34±0,7	1,42±0,5	1,12±0,6	1,39±0,8**	1,13±0,8	1,43±0,7**
Общий холестерин	ммоль/л	4,1±0,2	6,8±2,1*	5,3±1,3**	6,5±2,3*	4,8±1,1**,#	6,7±1,9*	4,6±1,0**,#
Коэффициент атерогенности	≤ 3	1,3±0,2	4,0±0,6*	2,8±0,4**	4,5±0,7*	2,6±0,5**,#	4,7±0,5*	2,2±0,4**,#
Креатинин	мкмоль/л	56—104	83,6±10,5	71,7±9,4	82,8±12,1	76,5±10,3	85,8±11,9	76,9±11,7
ПТИ	%	80-110	93,6±4,7	95,3±3,3	90,8±2,9	97,8±3,9	93,2±5,1	94,1±4,8

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Перед лечением уровни ЛПНП и общего холестерина были повышены в обеих группах больных в среднем в 2,8 и 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с контрольными значениями. В первой группе пациентов, находящихся на базисном лечении, включающем гепатопротекторы, происходило уменьшение уровня ЛПНП и общего холестерина в 1,2 и 1,3 раза соответственно (Таблица 22). Известно, что статины и силимарин, обладают положительным действием при дислипидемии [216]. Во второй группе больных после комбинированного лечения с эпифамином происходило более значительное уменьшение содержания ЛПНП – в 1,5, и холестерина – в 1,4 (U,  $p < 0,05$ ) раза, по сравнению с результатами до лечения. В третьей группе пациентов происходило снижение содержания ЛПНП в 1,8 и холестерина в 1,5 (U,  $p < 0,05$ ) раза, что более значительно, чем в 1-ой и 2-ой группах пациентов. Известно, что мелатонин, уровень которого корректируется при приеме эпифамина и мелаксена, уменьшает содержание липопротеидов низкой плотности, вызывает снижение индекса атерогенности, а также ингибирует действие оксида азота, занимающее ведущее место в патогенезе атеросклероза [344]. Так, индекс атерогенности после базисного лечения уменьшался в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, после комбинированной терапии с эпифамином – в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а после комбинированного лечения с мелаксеном – в 2,1 (U,  $p < 0,05$ ) раза.

Концентрации С-пептида и инсулина во всех группах больных до и после лечения находились в пределах нормы. Однако наблюдались тенденции к возрастанию данных метаболитов после проводимой терапии. Так, в первой группе уровень С-пептида увеличивался на 29% ( $p < 0,05$ ), инсулина – на 27% ( $p < 0,05$ ). Во второй группе уровень С-пептида возрастал на 32% ( $p < 0,05$ ), инсулина – на 38% ( $p < 0,05$ ). В третьей группе наблюдалось возрастание уровня С-пептида на 38% ( $p < 0,05$ ), инсулина – на 43% ( $p < 0,05$ ). Концентрация уровня глюкозы натощак в крови пациентов первой группы после базисного лечения уменьшалась в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), после комбинированной терапии с эпифамином – в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ), а после комбинированной терапии с мелаксеном – в 1,8 раза

( $p < 0,05$ ). Постпрандиальный уровень глюкозы в крови пациентов первой группы после базисного лечения снижался в среднем в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). После комбинированной терапии с эпифамином постпрандиальная гипергликемия уменьшалась в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ), а послекомбинированного лечения с мелаксеном – в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) (Таблица 22). Индекс НОМА-IR в первой группе больных был выше в 3,9 ( $p < 0,05$ ) раза, во второй – в 3,7 ( $p < 0,05$ ) раза, в третьей – в 4,0 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. После проведения базисного лечения индекс НОМА-IR уменьшался на 7,3%, после комбинированного лечения с эпифамином – на 17,3% (U,  $p < 0,05$ ), после комбинированной терапии с мелаксеном – на 24,6% (U,  $p < 0,05$ ). По-видимому, это было связано со способностью мелатонина регулировать экспрессию генов белков GLUT-4, увеличивать пролиферацию и неогенез  $\beta$ -клеток, улучшать чувствительность к инсулину и уменьшать степень выраженности окислительного стресса в бета-клетках поджелудочной железы [125, 518].

Состояние функции печени у больных первой, второй и третьей групп до лечения по сравнению с контрольной группой характеризовалось возрастанием уровня активности АлАт в среднем в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с верхней границей нормы (40 ЕД). Для уровня АсАт также было характерно увеличение во всех группах пациентов в среднем в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с верхней границей нормы (40 ЕД). Данные биохимические показатели подтверждают, что у больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, происходило нарушение метаболизма и повреждение гепатоцитов, что сопровождалось цитолизом клеток и выходом в кровь аминотрансфераз. После базисного лечения гепатопротекторами наблюдалось уменьшение активности АлАт и АсАт в 1,8 ( $p < 0,05$ ) и 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. После комбинированной терапии с эпифамином происходило более существенное снижение активности АлАт и АсАт в среднем в 1,9 (U,  $p < 0,05$ ) и 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно (Таблица 23).

Таблица 23. Влияние комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном на показатели функции печени в крови больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа.

Показатель	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (базисное лечение; n=33)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=28)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=26)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
АлАт	ЕД/л	0-40	68,2±9,5*	38,9±4,4**	64,4±9,1*	34,1±4,9**,#	68,6±11,1*	34,8±4,4**,#
АсАт	ЕД/л	0-40	49,9±7,8*	36,7±5,1**	46,5±7,7*	30,5±4,6**	51,4±7,2*	32,3±4,1**
ГГТП	мккат/л	0,88±0,4	2,78±0,6*	1,36±0,7**	2,71±0,8*	1,06±0,4**,#	2,76±0,8*	1,01±0,2**,#
Холинэстераза	мккат/л	77,6±9,8 (76-230)	512,1±13,2*	388,9±11,1**	517,6±14,3*	320,9±13,6**,#	513,9±16,9*	305,1±12,5**,#
Общий билирубин	мкмоль/л	9,6±2,7	15,7±6,0*	11,8±3,1**	14,0±2,5*	11,1±3,1**	17,5±6,4*	12,1±4,3**
Щелочная фосфатаза	ЕД/л	<270	94±6,8	96±6,7	97±6,8	94±6,2	98±7,0	93±6,1
Тимоловая проба	Ед.	2,5±0,4	3,8±0,7*	3,6±0,4	3,9±0,3*	3,5±0,4	3,9±0,4*	3,3±0,3**

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

После комбинированного лечения с мелаксеном происходило снижение активности АлАт и АсАт еще в большей степени – в среднем в 2,0 (U,  $p < 0,05$ ) и 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. О нарушении функционирования печени у больных свидетельствовала также активность ГГТП, которая до назначения лечения была в среднем в 3,2 ( $p < 0,05$ ) раза выше по сравнению с нормой. После проведения базисного лечения активность данного фермента снижалась в 2,0 ( $p < 0,05$ ) раза, после комбинированной терапии с эпифамином – в 2,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза, после комбинированного лечения с мелаксеном – в 2,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Активность ХЭ – фермента, который также служит показателем функции печени, а именно ее синтетической активности, в сыворотке крови больных НАСГ, развивающимся на фоне СД2, была увеличена в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с верхней границей нормы (76-230 мккат/л). Это согласуется с данными о возрастании активности фермента у больных СД2 с ожирением и нарушением липидного профиля [416]. Механизм повреждения печени при СД2 связан со снижением запасов гликогена в гепатоцитах, переполнением печеночных клеток липидами, способствующими развитию стеатоза печени. После проведения базисного лечения активность ХЭ изменялась в сторону нормы, снижаясь в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза. После комбинированной терапии с эпифамином активность ХЭ уменьшалась в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Применение мелаксена на фоне базисной терапии приводило к снижению активности ХЭ в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Скорее всего, данный эффект связан с гиполипидемическим и антиоксидантным действием мелатонина, уровень которого корректируется под действием используемых препаратов.

Таким образом, положительный эффект комбинированного лечения с применением мелатонин-корректирующих препаратов подтверждался клинико-биохимическими показателями, оцениваемыми при данной патологии. Следует отметить, что побочных эффектов при применении эпифамина на фоне базисной терапии НАСГ, развивающимся при СД 2 типа, выявлено не было. Проведение комбинированной терапии, включающей эпифамин или мелаксен, при лечении

больных оказывало благоприятное влияние на общее состояние пациентов, показатели биохимического анализа крови и печеночные пробы. Вероятно, за счет своей антиоксидантной активности мелатонин, уровень которого корректируется под действием данных препаратов, усиливал гепатопротекторное, антиокислительное, липотропное действие базисного лечения. Следует отметить, что исходя из полученных данных видно, что мелаксен более активен, чем эпифамин. По-видимому, это связано с тем, что эпифамин усиливает синтез мелатонина в эпифизе, тогда как мелаксен непосредственно в своем составе имеет данный гормон.

#### **4.2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на показатели иммунного статуса при неалкогольном стеатогепатите, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа**

Немаловажную роль в патогенезе СД2 могут играть изменения в иммунной системе организма. Имеются данные о том, что у больных СД2, как правило, выявляется гиперактивация В-системы иммунитета, что сопровождается увеличением в крови количества В-лимфоцитов, возрастанием числа плазматических клеток, уровня иммуноглобулинов (Ig) и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [271]. В некоторых работах отмечается наличие корреляционной связи между содержанием в крови ЦИК, системой комплимента и тяжестью течения метаболических заболеваний [366]. Хотя представление о сахарном диабете как иммунодефицитном состоянии получает все большее признание, тем не менее, литературные данные об изменениях параметров клеточного и гуморального иммунитета при этой патологии достаточно противоречивы. Несмотря на многочисленные исследования, вопрос о взаимосвязи иммунных сдвигов в организме с метаболическими нарушениями у пациентов с СД, не ясен. В этой связи нами было исследовано влияние мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина и мелаксена, на иммунологические показатели у больных с НАСГ при СД2.

Одним из индикаторов иммунного статуса организма и развития аутоиммунных процессов может служить уровень ЦИК в крови. Известно, что длительная циркуляция ЦИК в организме даже при незначительном повышении содержания может приводить к формированию их отложений в тканях, повышенной агрегации и адгезии тромбоцитов. Это, в свою очередь, способствует возникновению нарушений микроциркуляции крови, закупорке сосудов, повреждению и некрозу тканей со всеми вытекающими негативными последствиями, ведущими к развитию осложнений СД [271].

Полученные в ходе наших исследований результаты свидетельствуют о повышенной по сравнению с нормой концентрации ЦИК в крови пациентов с НАСГ. У больных первой группы содержание ЦИК превышало контрольный уровень в 3,2 ( $p < 0,05$ ) раза (Таблица 24).

После проведения базисного лечения концентрация ЦИК снижалась в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, что, по-видимому, было связано с положительными сдвигами в протекании метаболических процессов в организме в результате компенсаторных изменений, происходящих под влиянием сахаропонижающей терапии и гепатопротекторов.

Во второй и третьей группах больных изменения содержания ЦИК характеризовались значениями подобными соответствующему показателю в первой группе пациентов. При включении эпифамина в базисную терапию уровень ЦИК уменьшался в среднем в 1,5 ( $U, p < 0,05$ ) раза, при приеме мелаксена – в 1,6 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Данные о положительном воздействии мелатонин-корректирующих препаратов свидетельствуют о возможности проявления мелатонином иммуномодулирующей активности, что соотносится с представлениями об адаптогенной роли эпифиза в целом. В основе иммуномодулирующего влияния гормона, по-видимому, может лежать его воздействие через специфические рецепторы MT1, MN2, и MT3 на функцию клеток лимфоидных органов и клеточных элементов крови [394].

Таблица 24. Изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов у пациентов с НАСГ, развивающимся при СД2, при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (базисное лечение; n=33)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=28)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=26)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Ig A	г/л	2,9±0,12	4,6±0,14*	4,2±0,12**	4,5±0,13**	3,8±0,08**,#	4,7±0,19*	3,8±0,11**,#
Ig M	г/л	1,8±0,05	2,1±0,16*	1,9±0,06**	2,1±0,07**	1,8±0,05**	2,2±0,17*	1,8±0,06**
Ig G	г/л	14,1±0,52	18,8±0,3*	17,8±0,41**	18,9±0,58**	17,4±0,40**	18,8±0,71*	17,1±0,41**,#
ЦИК	усл. ед.	72,3±2,61	231,4±8,3*	166,4±7,1**	236,6±9,2**	156,8±6,84**,#	239,2±8,9*	148,3±7,9**,#

Примечание: достоверность значений ( $p < 0,05$ ) (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.



В ходе проведенных исследований динамика изменений основных классов иммуноглобулинов – IgA, IgM, IgG, отмечена у 87% больных НАСГ, развивающегося на фоне СД2. Таким образом, полученные результаты показывают на то, что у большинства пациентов имеются нарушения в иммунологических показателях, которые проявляются диссиммуноглобулинемией и повышением уровня ЦИК.

Данные могут объясняться аутоинтоксикацией организма и интенсификацией цитолитического синдрома при НАСГ. Применение различных способов лечения приводило к изменению динамики уровня сывороточных иммуноглобулинов. Так, концентрация IgA, возрастающая при патологии в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза, снижалась после базисной терапии на 13,1% ( $p < 0,05$ ), а после применения эпифамина на фоне базисного лечения – на 18,9% (U,  $p < 0,05$ ), после комбинированной терапии с мелаксеном – на 23,7% (U,  $p < 0,05$ ). Содержание IgG, которое в патологическом состоянии возрастало в среднем в 1,3 ( $p \leq 0,05$ ) раза по сравнению с нормой, снижалось после базисного лечения на 5,2% ( $p < 0,05$ ), после комбинированной терапии с эпифамином – на 7,3% ( $p < 0,05$ ), после комбинированного лечения с мелаксеном – на 9,3% (U,  $p < 0,05$ ). Уровень IgM, повышающийся в условиях патологии в среднем в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза, уменьшался после базисного лечения – на 10,5%; после комбинированной терапии с эпифамином – на 16,7% ( $p < 0,05$ ); после комбинированного лечения с мелаксеном – на 22,2% ( $p < 0,05$ ). Полученные данные соотносятся с представлениями о возможном участии мелатонина в регуляции функций иммунной системы организма человека [73, 105, 145]. Результаты проведенных исследований и имеющиеся литературные данные позволяют считать мелатонин универсальным эндогенным адаптером, способным участвовать в поддержании баланса иммунного статуса организма на определенном уровне. Имеются сведения, что основополагающую роль в иммунологическом распознавании чужеродных антигенов играют антитела подклассов G1-G3, запускающих каскад молекулярных и клеточно-опосредованных механизмов защиты организма.

Вместе с тем, секреция низкоавидных антител класса G с аномальной конформацией и, как следствие, низкой функциональной активностью приводит к негативным последствиям, включая формирование с антигеном растворимых длительно циркулирующих в крови иммунных комплексов, не способных активировать по классическому пути систему комплемента и, соответственно, включать клеточные механизмы защиты. Эти ЦИК, обладая цитофильностью, способны связываться с тканями. Полагают, что это может, в конечном счете, вести к гиперактивации В- и Т-звеньев иммунитета [271].

Полученные в ходе проведенных исследований результаты свидетельствуют, что повышение уровня иммунноглобулинов и ЦИК крови связано с заболеванием печени и, возможно, инсулитом у больных с СД2. Применение мелатонин-корректирующих препаратов при лечении пациентов с НАСГ оказывало благоприятное влияние на ряд показателей иммунного статуса организма, вероятно, за счет их антиоксидантного действия и уменьшения воспалительного процесса, наблюдающегося при данной патологии.

#### **4.3. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на содержание 6-сульфатоксимелатонина в организме пациентов при неалкогольном стеатогепатите, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа**

В ходе проведенных нами исследований было выявлено, что у пациентов с НАСГ уровень 6-сульфатоксимелатонина в моче был снижен в среднем в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем (Рисунок 21). По-видимому, снижение содержания основного метаболита мелатонина при НАСГ было связано с биотрансформацией гормона в ходе его взаимодействия с АФК с образованием его различных производных, а также активизацией процессов ПОЛ при СД2 и поздних осложнениях, сопровождающих его развития.

Данное предположение согласуется с литературными данными о важнейшей роли окислительного стресса в патогенезе сахарного диабета и развивающихся на его фоне осложнений. Считают, что хроническая

гипергликемия, являющаяся объективным признаком СД2, взаимосвязана с возрастанием скорости аутоокисления глюкозы, сопровождающимся интенсификацией СО и развитием оксидативного стресса [8,20, 21,87,103]

Чрезмерная генерация АФК в условиях данной патологии, по-видимому, может быть сопряжена со снижением уровня мелатонина в связи с его участием в реакциях нейтрализации активных кислородных метаболитов. Как известно, мелатонин, выполняя функции перехватчика свободных радикалов, может трансформироваться с образованием ряда соединений, отличных по структуре от 6-гидроксимелатонинсульфата [541,613, 511,528].

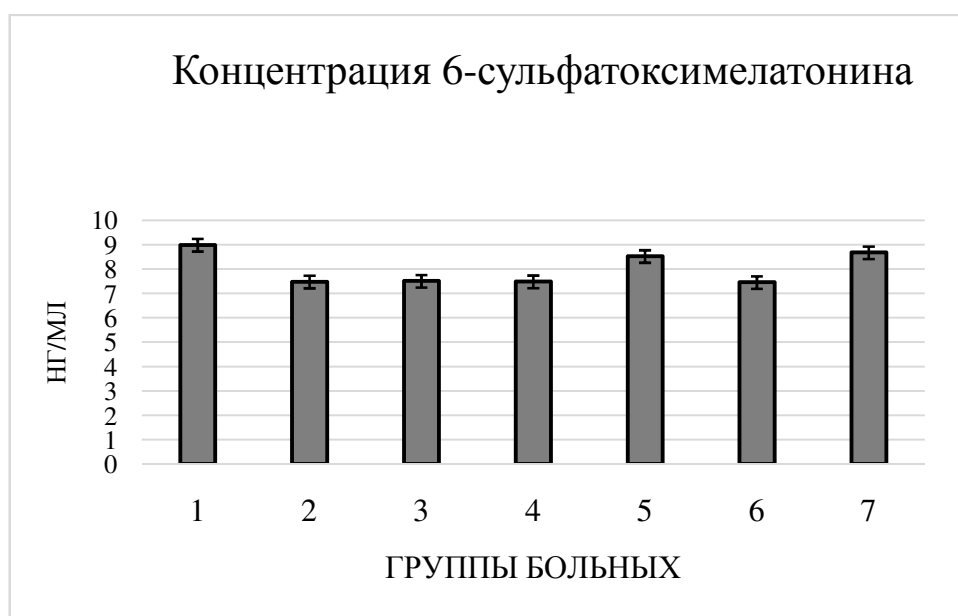


Рисунок 21. Содержание 6-сульфатоксимелатонина в моче пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

После проведения базисного лечения достоверных изменений содержания 6-гидроксимелатонинсульфата у больных НАСГ, развивающимся при СД2, выявлено не было, хотя у 12% пациентов отмечалась тенденция к возрастанию уровня данного метаболита.

После комбинированного лечения с эпифамином содержание 6-гидроксимелатонинсульфата у пациентов возрастало в среднем на 13,9% ( $p < 0,05$ ). При применении мелаксена на фоне базисной терапии уровень 6-гидроксимелатонинсульфата повышался на 16,4% ( $U, p < 0,05$ ). Поскольку профиль экскреции 6-сульфатоксимелатонина в моче позволяет судить об уровне мелатонина в организме, то, исходя из полученных результатов, можно сделать заключение о коррекции содержания гормона у больных НАСГ при использовании в ходе лечения эпифамина или мелаксена.

#### **4.4. Влияние эпифамина и мелаксена на интенсивность свободнорадикальных процессов у больных неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа**

##### **4.4.1. Влияние эпифамина и мелаксена на параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови больных неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа**

Нами были определены параметры биохемилюминесценции, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов и общую антиоксидантную активность организма при неалкогольном стеатогепатите. При НАСГ, развивающемся при СД2, значение светосуммы биохемилюминесценции ( $S$ ) увеличивалось в сыворотке крови больных в среднем в 2,7 ( $p < 0,05$ ) раза относительно показателя в норме. У пациентов также наблюдалось увеличение значения интенсивности максимальной вспышки биохемилюминесценции ( $I_{max}$ ) в сыворотке крови в 2,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем. Это свидетельствует о возрастании интенсивности свободнорадикального окисления в организме больных с НАСГ. Одной из причин усиления свободнорадикальных процессов у больных с НАСГ, развивающимся при СД2, может являться активация полиолового пути, в котором глюкоза превращается в сорбитол с участием альдозоредуктазы. При этом используется большое количество NADPH, концентрация которого лимитирует функционирование глутатионовой

антиоксидантной системы. В последующем сорбитол с участием сорбитолдегидрогеназы превращается во фруктозу, что сопровождается увеличением соотношения NADH/NAD, как это имеет место при развитии тканевой гипоксии. Данное состояние получило название «редуктивный стресс», или «гипергликемическая псевдогипоксия». Следствием данного состояния может быть изменение степени восстановленности компонентов электронтранспортной цепи, приводящее к повышению вероятности образования АФК. В условиях гипергликемии свободные радикалы также образуются в процессе аутоокисления глюкозы в ходе формирования конечных продуктов гликозилирования, которые, в свою очередь, участвуют в патогенезе ангиопатий, способствуют нарастанию ишемии и интенсификации свободнорадикальных процессов в тканях при СД. Усиление гликозилирования гемоглобина приводит к вторичной тканевой гипоксии [20, 21].

В результате проведенных исследований у пациентов с НАСГ, развивающимся при СД2, было выявлено уменьшение значения тангенса угла падения кинетической кривой ( $tg\alpha_2$ ) – параметра биохемилюминесценции, характеризующего общую антиоксидантную активность. В сыворотке крови больных  $tg\alpha_2$  был понижен в среднем на 27,4% ( $p<0,05$ ) по сравнению с соответствующим показателем у доноров контрольной группы. Можно предположить, что течение НАСГ сопровождается истощением компенсаторных механизмов, направленных на снижение интенсивности свободнорадикальных процессов, что, очевидно, может также играть существенную роль в дисбалансе антиоксидантного статуса при СД2. Полученные данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями, что у больных с СД2 была выявлена усиленная продукция супероксидного анион-радикала в сыворотке крови, коррелирующая с уровнем глюкозы и содержанием гликозилированных белков в плазме [532].

Таблица 25. Изменения показателей биохемилюминесценции у больных с НАСГ при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели БХЛ	Контрольная группа	Группы больных					
		1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
S	279,9±11,4	755,7±26,2*	580,4±11,6**	749,4±28,1*	443,7±11,1**,#	751,3±20,3*	412,1±10,1**,#
Imax	47,1±1,2	128,5±7,8*	87,9±2,0**	128,3±6,5*	77,4±1,5**,#	127,9±7,6*	68,1±1,3**,#
tga2	32,9±1,5	25,8±1,1*	30,8±1,1**	25,1±0,9*	31,9±1,2**,#	25,5±1,0*	32,5±1,2**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Установлено, что после базисного лечения при НАСГ наблюдалось снижение параметров БХЛ: S и I<sub>max</sub>, отражающих активность СО биомолекул, в сыворотке крови в среднем в 1,3 (p<0,05) и 1,5 (p<0,05) раза соответственно по сравнению с данными, полученными до проведения терапии (Таблица 25). По-видимому, это было взаимосвязано со снижением уровня гликемии, с одной стороны, а также с уменьшением цитолитического синдрома, – с другой.

При проведении комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном наблюдалось более значительное снижение S в сыворотке крови пациентов. Так, величина S при приеме эпифамина уменьшалась в среднем в 1,7 (U, p<0,05) раза, при приеме мелаксена – в 1,8 (U, p<0,05) раза. Значение I<sub>max</sub> после комбинированного лечения с мелатонин-корректирующими препаратами также снижалось в большей степени. Включение эпифамина в терапию приводило к уменьшению данного показателя в 1,6 (U, p<0,05) раза; мелаксена – в 1,9 (U, p<0,05) раза. Очевидно, что наблюдаемые эффекты эпифамина и мелаксена объясняются повышением уровня эндогенного мелатонина в организме. Снижение интенсивности свободнорадикальных процессов может быть результатом проявления антиоксидантных свойств эндогенного мелатонина в организме [77]. Мелатонин, проникая в клетку, способен обеспечивать нейтрализацию свободных радикалов, отдавая им электронные группы. При этом свободные радикалы теряют свою агрессивность и токсичность. В частности, мелатонин нейтрализует гидроксильный радикал – одну из самых реакционноспособных АФК [105].

В ходе проведенных исследований было выявлено возрастание tgα<sub>2</sub> в сыворотке крови больных после базисного лечения в среднем на 19,3% (p<0,05), что, очевидно, свидетельствует о положительном действии гепатопротекторов и гипогликемических препаратов на оксидативные и метаболические процессы в организме. После комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном данный показатель увеличивался на 23,7% и 25,8% (U, p<0,05) соответственно по сравнению с данными, полученными до лечения. Очевидно, включение данных

препаратов в терапию ведет к усилению антиоксидантной системы организма, что может оказывать позитивный эффект на свободнорадикальный гомеостаз и углеводный обмен, а следовательно, и на клиническую картину при данной патологии.

#### **4.4.2. Влияние эпифамина и мелаксена на содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови больных неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа**

О развитии оксидативного стресса в организме пациентов с НАСГ свидетельствует также повышение уровня первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), представляющих собой токсичные соединения, оказывающие повреждающее действие на мембраны и другие клеточные структуры. У больных наблюдается повышение содержания ДК в сыворотке крови по сравнению с показателем в контрольной группе в среднем в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза, что свидетельствует об интенсификации протекания ПОЛ при патологии (Рисунок 22). Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что у больных СД2 содержание ДК в эритроцитах на 37% превышает их уровень у здоровых доноров [234]. Имеются сведения и о более значительной активации у таких больных процессов свободнорадикального окисления (на 153%) в плазме и эритроцитах [319].

В ходе наших исследований показано, что после проведения базисной терапии содержание ДК снижалось в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза. При этом у пациентов показатели интенсивности свободнорадикального окисления остаются выше значений, характерных для практически здоровых лиц. Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует, что назначение базисного лечения не устраняет полностью проявления оксидативного стресса. Комбинированная терапия с эпифамином способствовала уменьшению уровня ДК в 1,5 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Прием мелаксена на фоне базисного лечения приводил к еще более значительному снижению концентрации ДК – в 1,6 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Очевидно,



это связано с тем, что мелатонин, коррекция уровня которого происходит под действием данных препаратов, являясь амфифильным веществом, может действовать как эффективный антиоксидант, что проявляется, в частности, в обрыве реакций ПОЛ в фосфолипидном слое биомембран [4].

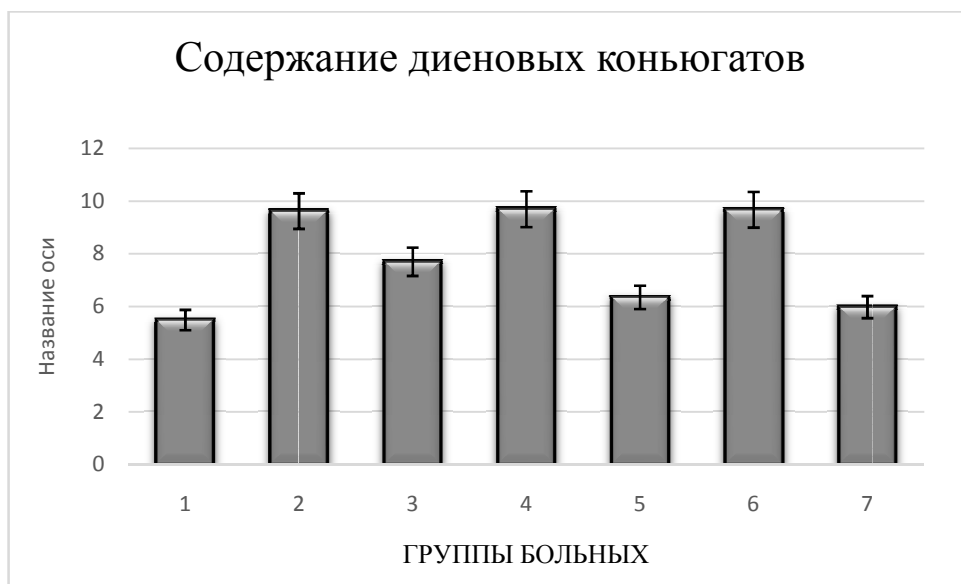


Рисунок 22. Концентрация диеновых конъюгатов в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Таким образом, включение эпифамина и мелаксена в базисную терапию больных с НАСГ, развивающимся при СД2, приводило к более существенному изменению содержания ДК в сторону нормы за счет антиокислительного действия на клеточном уровне мелатонина, уровень которого корректируется под влиянием данных препаратов.

#### **4.4.3. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы в сыворотке крови пациентов с неалкогольным гепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа**

В ходе наших исследований установлено, что у больных с НАСГ активность АсГ, выраженная в Е на мл, была меньше в среднем в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. Удельная активность фермента уменьшалась в среднем в 2,3 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунки 23, 24). Эти изменения были выявлены во всех группах больных. Существуют две изоформы АсГ: цитоплазматическая (цАсГ) и митохондриальная (мАсГ). Несмотря на различия по физико-химическим и структурным свойствам, оба изофермента АсГ имеют железо-серный кластер, связанный с остатками Cys437, Cys503 и Cys506 [157]. Известно, что при окислительном стрессе происходит разрушение железо-серных кластеров АсГ, что сопровождается инактивацией фермента [426]. Имеются литературные данные об участии супероксидных анион-радикалов в разрушении железо-серных кластеров АсГ, приводящем к инактивации фермента [447]. Известно, что мАсГ и цАсГ выполняют различные физиологические функции, связанные с их участием в окислительных и биосинтетических процессах соответственно. Реакция, катализируемая мАсГ, служит иницирующим этапом цикла Кребса, и данный изофермент весьма чувствителен к АФК, причем в большей степени, чем цитозольная форма [157]. Супероксид, образование которого происходит в электронтранспортной цепи митохондрий, очевидно, может снижать активность мАсГ, что сопровождается замедлением цикла трикарбоновых кислот и снижением потока электронов через митохондриальную дыхательную цепь [665]. Функционирование цАсГ связано с регуляцией накопления и утилизации цитрата в процессах липогенеза, а также с синтезом глутамата.

Предшественником глутамата является 2-кетоглутарат, образующийся под действием цитоплазматической НАДФ-ИДГ из изоцитрата, источником которого служит реакция, катализируемая цАсГ. Кроме того, реакция, катализируемая НАДФ-ИДГ, обеспечивает генерирование NADPH, как было рассмотрено выше [579]. Полученные нами данные о существенном снижении активности АсГ по сравнению со значением в контрольной группе согласуются с предположениями,

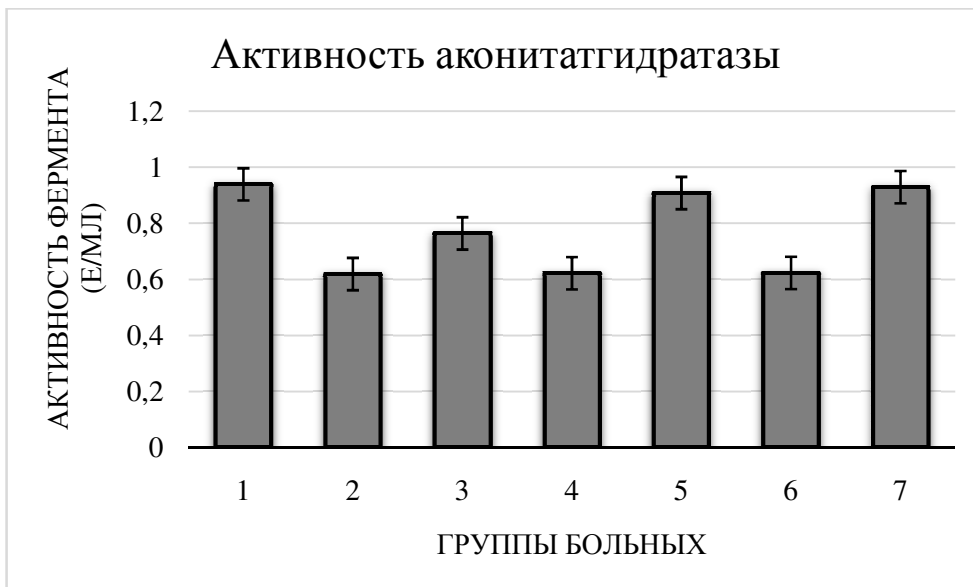


Рисунок 23. Активность аспартатаминотрансферазы (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

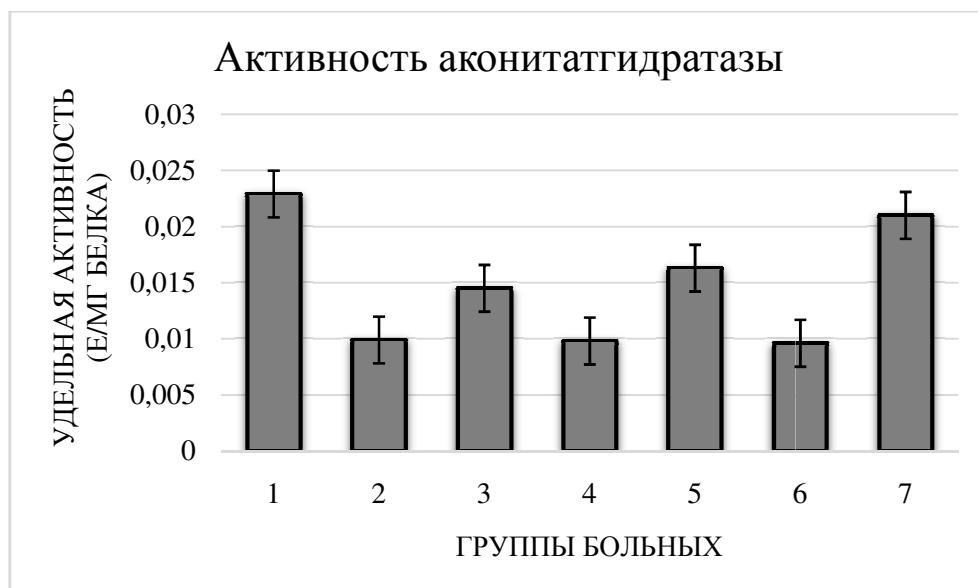


Рисунок 24. Удельная активность аспартатаминотрансферазы (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

что АГ может выступать в качестве чувствительной мишени действия свободных радикалов.

Следует отметить, что существует ряд данных о падении активности АкГ в тканях животных при патологических состояниях, сопряженных с оксидативным стрессом [189, 576]. Следует отметить, что оценка активности АкГ, как мишени действия свободных радикалов при ДЗП в нашем исследовании проводится впервые, и доказывает необходимость определения данного фермента для оценки активности свободнорадикальных процессов.

После проведения базисного лечения активность АкГ, выраженная в Е на мл сыворотки крови, увеличилась в 1,2 ( $p < 0,05$ ), удельная активность фермента – в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) раза. Включение эпифамина в терапию приводило к возрастанию активности АкГ, представленной в виде Е на мл сыворотки, в 1,4 (U,  $p < 0,05$ ) раза, удельной активности – в 1,6 ( $p < 0,05$ ). При проведении комбинированной терапии с мелаксеном, активность АкГ, выраженная в Е на мл, увеличилась в 1,5 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность – в 2,1 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению данными до назначения лечения.

Очевидно, коррекция уровня мелатонина при приеме эпифамина или мелаксена оказывала позитивное влияние на свободнорадикальный гомеостаз организма, что, могло быть, связано, в частности, с положительным действием мелатонина на функционирование ферментов АОС. Изменение активности АкГ в сторону нормы, очевидно, может рассматриваться как позитивный критерий, в связи с важнейшими физиолого-биохимическими функциями данного фермента.

#### **4.5. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на антиоксидантный статус пациентов с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа**

##### **4.5.1. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на глутатионовую систему пациентов с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа**

Как известно, глутатионовая АОС выступает в качестве одной из основных линий защиты от чрезмерного образования АФК на фоне развития патологии. Антиоксидантные свойства глутатиона определяются непосредственным взаимодействием его со свободными радикалами и гидропероксидами [134]. Этот тиол может или сам по себе служить ловушкой для супероксида и гидроксил-радикала, реагируя с ними неэнзиматически, или функционировать в качестве субстрата для ферментов, участвующих в детоксикации АФК. Реакция восстановления окисленной формы глутатиона до восстановленной катализируется ГР, использующей NADPH как источник восстановительных эквивалентов, окисляя его до NADP. ГР функционирует вместе с ГП. Эти ферменты образуют единую ГП-ГР антиоксидантную систему, осуществляющую глутатионовый редокс-цикл. Однако, поскольку далеко не всегда внутренних резервов АОС организма достаточно для борьбы с чрезмерным образованием АФК при патологии, то в ходе нашей работы было предпринято исследование активности компонентов глутатионовой системы при проведении базисного лечения и комбинированной терапии, включающей эпифамин и мелаксен.

Результаты проведенных исследований показали, что в первой группе больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, при поступлении в стационар содержание GSH в сыворотке крови было ниже в среднем в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза относительно контрольного уровня (Таблица 26). Вероятно, восстановленная форма данного антиоксиданта расходовалась на обезвреживание образующихся интермедиатов и продуктов СО и на поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, нарушенного при патологии. Кроме того, причиной падения концентрации глутатиона может быть снижение интенсивности функционирования пентозофосфатного пути при СД, вследствие чего уменьшается доступность NADPH, необходимого для регенерации восстановленного глутатиона [332]. Полученные нами результаты соотносятся с литературными данными, согласно которым снижение концентрации глутатиона также было выявлено в плазме и эритроцитах больных с сахарным диабетом 1

типа и длительно протекающим сахарным диабетом 2 типа [60]. Наиболее чувствительным компонентом в общей схеме неспецифической резистентности организма в условиях окислительного стресса является тиолдисульфидная система вследствие высокой реакционной способности сульфгидрильных (-SH) функциональных групп, входящих в состав тиоловых соединений. Ключевая роль в системе низкомолекулярных тиоловых антиоксидантов принадлежит глутатиону, который является одним из наиболее важных внутриклеточных антиоксидантных агентов.

После проведения базисного лечения наблюдалось незначительное увеличение концентрации GSH, но достоверных различий по сравнению с данными до лечения выявлено не было.

Во 2-ой группе больных при поступлении в стационар содержание GSH в сыворотке крови было ниже в среднем в 2,1 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем. После проведения базисной терапии с эпифамином наблюдалось увеличение концентрации GSH в сыворотке крови на 21,5% (U,  $p < 0,05$ ) по сравнению с данными до лечения, т.е. его уровень изменялся в сторону нормы. По-видимому, это является аддитивным результатом, который обусловлен понижением расходования GSH при действии мелатонина как ловушки АФК, а также синергичного эффекта гормона с глутатионовой АОС, способствующего восстановлению GSSG до GSH [604]. Полученные данные согласуются с результатами, полученными нами при применении экзогенного мелатонина при экспериментальном гепатите у животных [190].

В третьей группе больных при поступлении в стационар уровень GSH в сыворотке крови был ниже в среднем в 2,0 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. После проведения комбинированного лечения, включающего мелаксен, происходило повышение содержания GSH в среднем на 26,2% (U,  $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами, полученными до лечения. По-видимому, за счет реализации антиоксидантного действия мелатонина, входящего в состав применяемого препарата, происходило уменьшение степени развития

оксидативного стресса и, как следствие, расходования восстановленной формы глутатиона в организме больных.

Следует отметить, что существенное возрастание уровня GSH на фоне приема эпифамина и мелаксена, очевидно, могло оказывать позитивный эффект не только за счет протективного действия на гепатоциты, но и повышения антиоксидантного статуса организма больных СД2 в целом.

В ходе наших исследований выявлено увеличение активности ГР, выраженной в виде Е на мл сыворотки, в первой группе больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, до назначения базисной терапии в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольным уровнем. Удельная ферментативная активность была выше в 1,1 ( $p < 0,05$ ) раза. Повышение активности данного фермента, катализирующего восстановление глутатиона за счет восстановительных эквивалентов NADPH, может иметь адаптивное значение для формирования ответной реакции на развитие оксидативного стресса, так как это способствует возрастанию активности ГП, непосредственно участвующей в обезвреживании продуктов реакций СО при участии GSH. Так, на фоне НАСГ, развивающимся при СД2, было выявлено увеличение активности ГП, выраженной в виде Е на мл сыворотки, в первой группе больных в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза. Удельная активность фермента возрастала в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза (Таблица 26). Вместе с тем, очевидно, что уменьшение уровня GSH не могло быть уравновешено даже повышением активности ГР, имеющим место при данной патологии. В этой связи следует отметить, что скорость редокс-циклирования глутатиона, то есть NADPH – зависимого восстановления GSSG под действием ГР, намного превосходит возможности синтеза GSH в тканях [332].

После проведения базисного лечения больных с НАСГ, развивающимся при СД2, активности ГР и ГП, выраженные в Е на мл, увеличивались в среднем в 1,7 и 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с результатами, полученными до назначения карсила и/или эссенциале. Удельные активности ГР и ГП увеличивались в 1,4 и 1,1 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно.

Таблица 26. Изменения показателей глутатионовой системы у больных с НАСГ при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	Группы больных					
			1-ая группа (базисное лечение; n=28)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=22)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=24)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
GSH	мМоль/л	0,873±0,036	0,455±0,015*	0,461±0,011	0,451±0,016*	0,554±0,019**,#	0,458±0,012*	0,575±0,022**,#
ГП	Е/мл	0,123±0,008	0,177±0,010*	0,208±0,018**	0,179±0,011*	0,471±0,017**,#	0,176±0,009*	0,513±0,021**,#
ГП	Е/мг белка	0,002±0,0001	0,0027±0,0001*	0,0029±0,0002	0,0026±0,0001*	0,0046±0,0003**,#	0,0027±0,0001*	0,0061±0,0006**,#
ГР	Е/мл	0,067±0,003	0,087±0,004*	0,148±0,007**	0,088±0,004*	0,188±0,009**,#	0,087±0,006*	0,215±0,008**,#
ГР	Е/мг белка	0,0015±0,0001	0,0016±0,0001	0,0022±0,0002**	0,0016±0,0001	0,0027±0,0002**,#	0,0016±0,0001	0,0031±0,0003**,#
GST	Е/мл	0,174±0,006	0,087±0,002*	0,094±0,003**	0,086±0,003*	0,112±0,005**,#	0,088±0,002*	0,140±0,006**,#
GST	Е/мг белка	0,00099±0,00001	0,00046±0,000006*	0,00052±0,000007**	0,00047±0,000007*	0,00075±0,000008**,#	0,00045±0,000005*	0,00098±0,00001**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.



Очевидно, возрастание активности ГП-ГР АОС было сопряжено с положительным действием на антиоксидантный статус больных гепатопротекторов, что также отражалось на увеличении в сыворотке крови такого параметра БХЛ, как  $\text{tg}\alpha_2$ , характеризующего общий антиоксидантный потенциал организма (в среднем на 19,3%).

Во второй группе больных с НАСГ, развивающимся при СД2, до проведения терапии активности ГР и ГП изменялись в тех же пределах, что и в 1-ой группе. После проведения комбинированной терапии, включающей эпифамин, активности ГР и ГП, выраженные в Е на мл сыворотки, увеличивались в 2,1 (U,  $p < 0,05$ ) и 2,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза соответственно, удельные активности ферментов повышались в среднем в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с результатами до лечения. В третьей группе пациентов с данной патологией были выявлены изменения активностей ГР и ГП в тех же пределах, что и в первой и второй группах. После комбинированного лечения с мелаксеном активности ГР и ГП, выраженные в Е на мл сыворотки, увеличивались в среднем в 2,5 (U,  $p < 0,05$ ) и 2,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза, удельные активности ферментов повышались в 1,9 (U,  $p < 0,05$ ) и 2,3 (U,  $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, лечение с применением мелатонин-корректирующих препаратов способствовало повышению активности ГП - ГР системы в большей степени, чем в группе больных находящихся на базисном лечении. Полученные данные согласуются с предположениями о том, что антиоксидантная активность мелатонина может быть связана с его действием на антиоксидантные ферменты путем активации или стимуляции их синтеза [520, 596].

Немаловажная роль в обезвреживании продуктов свободнорадикальных реакций принадлежит Г-S-T – ферменту, использующему GSH для обезвреживания экзо- и эндогенных токсикантов. Установлено, что в 1-ой группе больных НАСГ, развивающимся при СД2, активность Г-S-T, выраженная в Е/мл сыворотки, была ниже в среднем в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой, а удельная активность фермента – в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза.

Выявленное снижение активности Г-S-T в сыворотке крови больных по сравнению с нормой было, очевидно, связано со значительными затратами восстановленного глутатиона в ответ на избыточное образование АФК при развитии окислительного стресса, индуцированного патологическим состоянием. Как известно, Г-S-T использует GSH для конъюгации с гидрофобными веществами, их восстановления и изомеризации. GSH является необходимым компонентом реакций обезвреживания токсических продуктов ПОЛ, восстановления гидроперекисей, биотрансформации ксенобиотиков, катализируемых мультифункциональной Г-S-T [61, 114]. По всей видимости, наблюдаемое уменьшение активности Г-S-T происходило вследствие уменьшения содержания GSH, необходимого для протекания реакций, катализируемых данным ферментом.

Это предположение согласуется с полученными данными о повышении активности Г-S-T на фоне возрастания уровня GSH после проведения лечения. Так, после базисной терапии наблюдалась тенденция к увеличению активности фермента, выраженной в Е на мл, (в среднем на 7,2%), и удельной активности на 10,8% (Таблица 26). Выявленные изменения ферментативной активности, по-видимому, могут быть связаны с действием силимарина, входящего в активное вещество карсила, что согласуется с имеющимися литературными данными [618].

Во второй группе пациентов, при поступлении в стационар, также наблюдалось снижение активности Г-S-T, выраженной в Е на мл сыворотки, в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольным уровнем. Удельная активность фермента уменьшалась в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. После проведения комбинированной терапии с эпифамином активность данного фермента, выраженная в Е на мл, увеличивалась в 1,3 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза, по сравнению с результатами до лечения. Таким образом, лечение с эпифамином способствовало повышению активности Г-S-T в большей степени, чем в первой группе больных.

В третьей группе больных НАСГ, развивающимся на фоне СД2, до проведения терапии активность Г-S-T изменялась в тех же пределах, что и в 1-ой и 2-ой группах. Комбинированное лечение с мелаксеном приводило к возрастанию активности Г-S-T, выраженной в Е на мл сыворотки, в среднем в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Удельная ферментативная активность повышалась в среднем в 2,0 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Таким образом, применение мелаксена в ходе лечения обеспечивало наиболее значительное возрастание активности Г-S-T по сравнению с первой и второй группами пациентов. Полученные результаты согласуются с данными из литературы, в которых говорится, что мелатонин активирует Г-S-T. Таким образом, мелатонин способен предотвращать чрезмерное образование АФК путем интенсификации ГТ-реакции, в ходе которой происходит обезвреживание органических соединений почти всех классов, биотрансформация ксенобиотиков [617].

Таким образом, при НАСГ, развивающемся при СД2, перед назначением терапии наблюдался дисбаланс в функционировании глутатионовой системы. Вероятно, это было связано, с негативным влиянием на антиоксидантный статус организма патофизиологических воздействий, как возникающих при СД2, так и развивающихся при жировой дистрофии печени. Однако, под влиянием базисного лечения, и еще в большей степени, препаратов, корригирующих уровень мелатонина в организме, происходила синхронизация функционального состояния глутатионовой системы, что было подтверждено степенью ее мобилизации.

#### **4.5.2. Влияние мелатонин-корригирующих препаратов на активность NADPH-генерирующих ферментов у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета 2 типа**

Как было отмечено выше, при обсуждении функционирования глутатионовой АОС, в качестве источника восстановительных эквивалентов для ГТ-реакции необходим NADPH. Известно, что одним из основных поставщиков

NADPH для работы глутатионовой системы является ключевой фермент пентозофосфатного пути – Г6ФДГ [84]. Альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая НАДФ-ИДГ [104].

В сыворотке крови пациентов с НАСГ активность НАДФ-ИДГ, выраженная в Е на мл, была ниже в среднем в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза, удельная ферментативная активность – в 2,1 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой (Рисунки 25, 26). Подавление процесса гликолиза при СД, по-видимому, может негативно отражаться на метаболических превращениях ди- и трикарбоновых кислот. Нарушения процессов тканевого дыхания, происходящие при патологии, очевидно, приводят к торможению функционирования ряда ферментов окислительного метаболизма, в том числе и активности НАДФ-ИДГ, выявленному в наших исследованиях. Снижение активности NADPH-генерирующих ферментов, по-видимому, могло негативно сказаться на функционировании глутатионовой АОС, нуждающейся в поставке NADPH.

Установлено, что при НАСГ, развивающимся на фоне СД<sub>2</sub>, активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки крови, уменьшается в среднем в 2,0 ( $p < 0,05$ ) раза, удельная активность снижается в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой (Рисунки 27, 28). В условиях инсулярной недостаточности особенно усиливается активность фосфоенолкарбоксикиназы, определяющей возможность и скорость глюконеогенеза в печени и почках. Существенную роль в нарушении регуляции метаболизма играет снижение уровня фруктозо-2,6-бисфосфата, что приводит к снижению скорости гликолиза и усилению глюконеогенеза [21]. По-видимому, отмеченные нарушения метаболизма углеводов отражаются и на активности ключевого фермента пентозофосфатного пути – Г6ФДГ. Вероятно, в этих условиях снижение активности Г6ФДГ может быть сопряжено с торможением интенсивности пентозофосфатного пути, что связано с перераспределением глюкозо-6-фосфата между различными путями метаболизма углеводов.

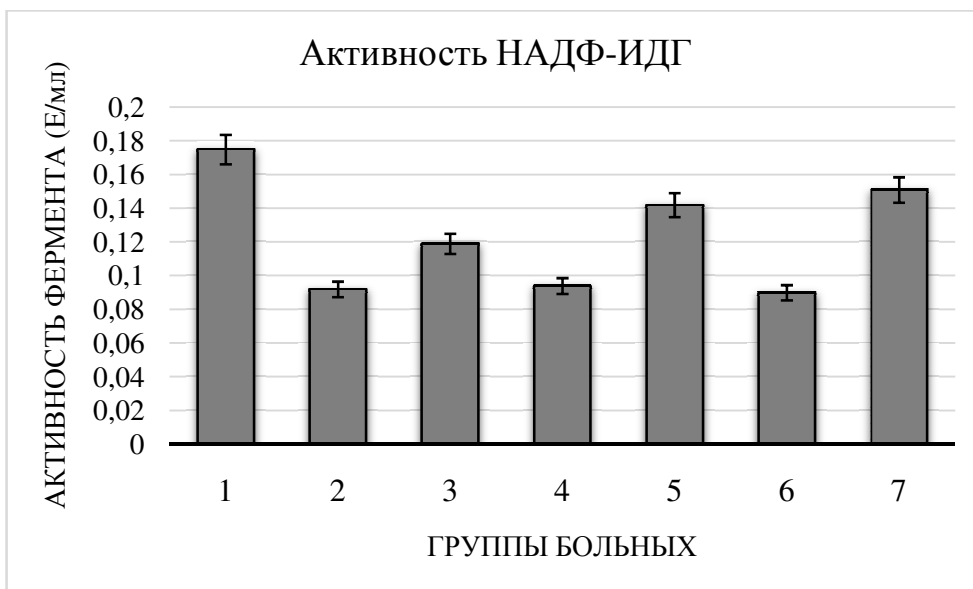


Рисунок 25. Активность НАДФ-ИДГ (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

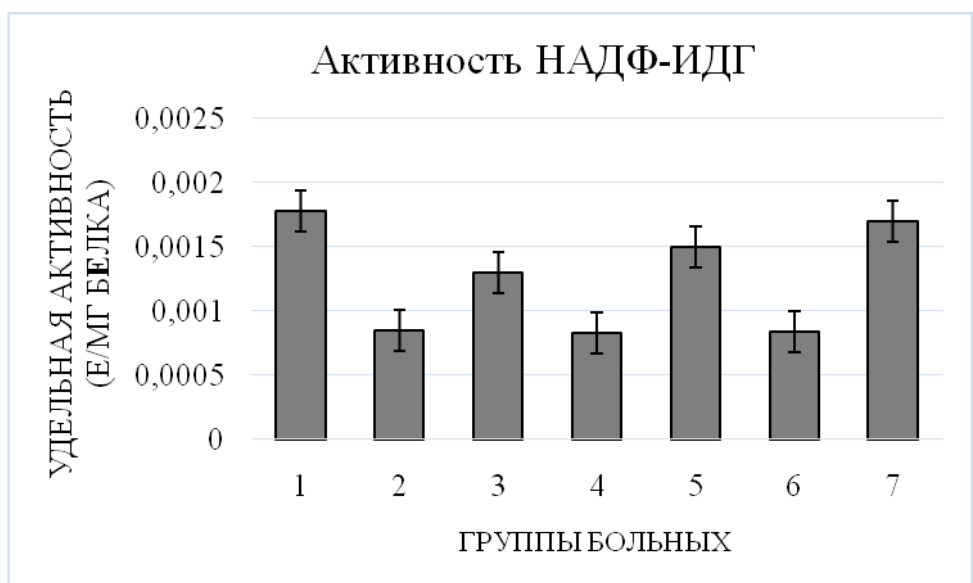


Рисунок 26. Удельная активность НАДФ-ИДГ (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

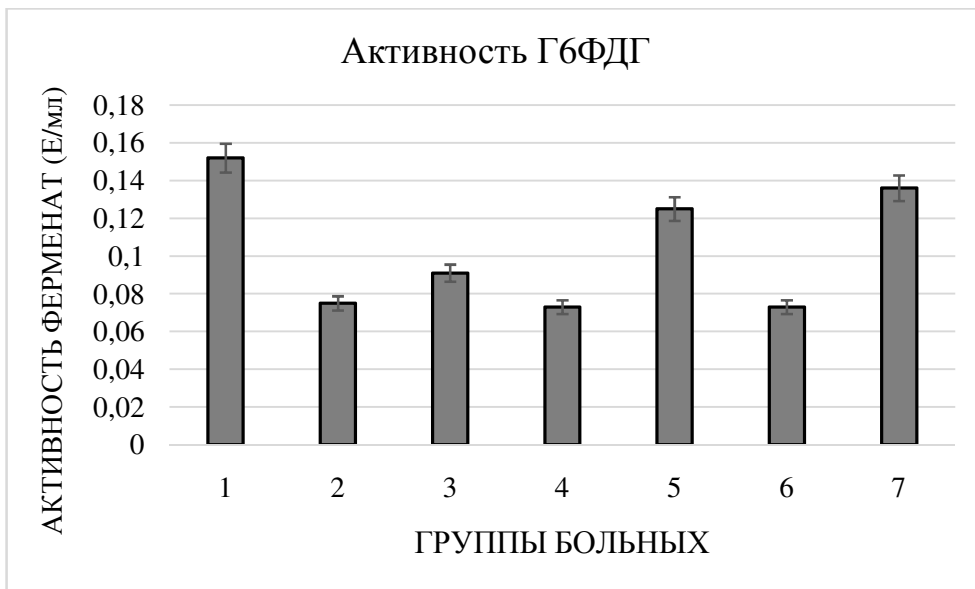


Рисунок 27. Активность Г6ФДГ (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

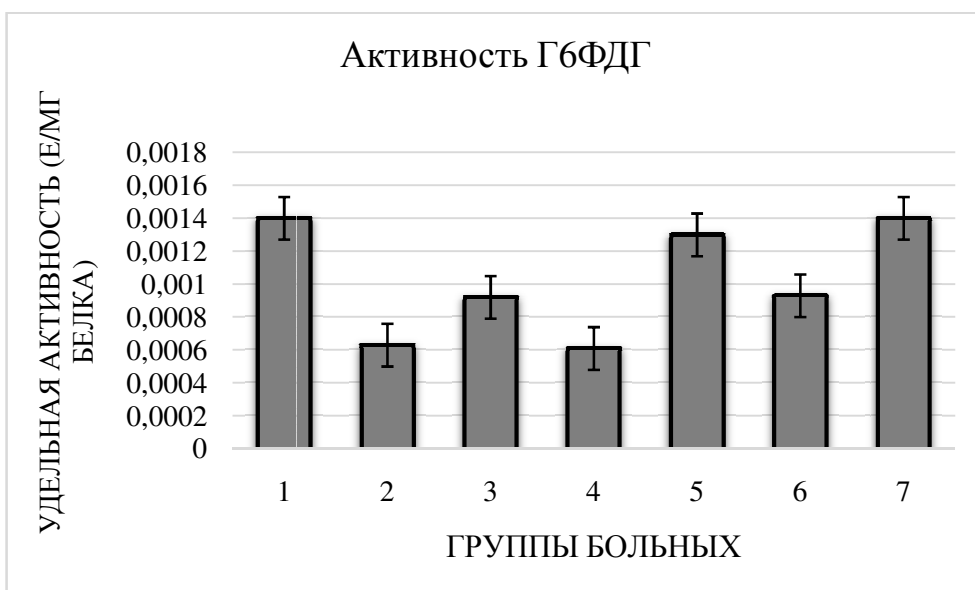


Рисунок 28. Удельная активность Г6ФДГ (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

После проведения базисного лечения наблюдалось повышение активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, выраженных в Е на мл, в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза и в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза, соответственно, по сравнению с ферментативной активностью до лечения. Удельная активность Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ увеличивалась в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза и 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза, соответственно, по сравнению с данными до лечения (Рисунки 24, 25, 26, 27).

Во второй группе больных НАСГ до проведения лечения активности исследуемых NADPH -продуцирующих ферментов изменялись в тех же пределах, что и в первой группе. После проведения базисной терапии, включающей эпифамин, активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, выраженные в Е на мл, увеличивались в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза и в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза, соответственно, по сравнению с результатами до лечения. При расчете удельной активности ферментов изменения сохраняли подобную тенденцию. При этом удельная активность Г6ФДГ в сыворотке больных увеличивалась в 2,1 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения, а удельная активность НАДФ-ИДГ – в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза.

В третьей группе пациентов до лечения изменения активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ имели тот же характер, что и в первой и во второй группах больных. После проведения базисной терапии, включающей мелаксен, активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, увеличивалась в 1,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза, удельная активность – в 2,3 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения. При этом происходило возрастание активности НАДФ-ИДГ, выраженной в Е на мл в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а удельной ферментативной активности – в 1,9 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с результатами до лечения.

По-видимому, применение мелатонин-корректирующих препаратов в комплексной терапии НАСГ может нивелировать истощение собственного антирадикального потенциала и способствовать нормализации свободнорадикального гомеостаза организма. Это, в свою очередь, приводит к

коррекции сдвигов метаболизма, индуцированных патологическим состоянием, и изменению активности исследуемых ферментов окислительного метаболизма в сторону нормы. Возрастание активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ при проведении комбинированного лечения, включающего эпифамин или мелаксен, по всей видимости, могло существенным образом отражаться на скорости образования GSH под действием ГР, что способствовало снижению его дефицита. Как следствие, это позитивно влияло на функционирование ГП и ГТ. Таким образом, возрастание активностей NADPH-продуцирующих ферментов в условиях коррекции уровня мелатонина может быть важным фактором, обеспечивающим повышение эффективности работы глутатионовой АОС организма.

**Активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа, при применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

При неалкогольном стеатогепатите, развивающимся при СД2, активность СОД, выраженная в Е на мл сыворотки крови, уменьшалась в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. При этом удельная активность фермента снижалась на 30,6% ( $p < 0,05$ ) (Рисунки 29, 30). Выявленные изменения могут быть связаны как с истощением активности данного компонента АОС, так и с повышением уровня антител к СОД в условиях патологии, что может приводить к угнетению функционирования фермента [12].

После базисной терапии имела место тенденция к повышению как активности СОД, выраженной в виде Е на мл сыворотки (в среднем на 9,6% ( $p < 0,05$ )), так и удельной ферментативной активности (в среднем на 6,3%) по сравнению с соответствующими показателями, полученными до проведения лечения. Комбинированное лечение с эпифамином способствовало увеличению активности СОД, выраженной на Е на мл сыворотки, на 10,9%; удельная



активности фермента возрастала в среднем на 9,8%. Включение мелаксена в базисную терапию приводило к возрастанию активности СОД, представленной в виде Е на мл, в среднем на 24,4% (U,  $p < 0,05$ ). Активность, выраженная как Е на мг белка, увеличивалась на 20,7% (U,  $p < 0,05$ ). Таким образом, согласно полученным результатам, при НАСГ, развивающимся на фоне СД2, прием эпифамина и мелаксена способствует более существенной активации СОД и ее изменению в направлении нормы. Это, вероятно, может быть связано с антиоксидантным действием мелатонина, уровень которого корректируется при назначении этих препаратов, и снижением уровня антител к ферменту. Как следствие, происходила стимуляция ферментативной активности СОД, обеспечивающей торможение процессов СО биомолекул.

При НАСГ, развивающемся при СД 2 типа, активность каталазы, выраженная в Е на мл сыворотки крови, возрастала в среднем в 2,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. При этом удельная активность фермента повышалась в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунки 31, 32). Полученные данные отражают мобилизацию данного звена АОС в ответ на развитие оксидативного стресса в организме пациентов. После базисной терапии изменений, как удельной ферментативной активности, так и активности каталазы, выраженной в расчете на мл сыворотки, не наблюдалось. При комбинированном лечении с эпифамином наблюдалась тенденция к увеличению активности, выраженной в виде Е на мл сыворотки, в среднем на 8,0%, удельной активности – на 7,1%. Назначение мелаксена сопровождалось возрастанием каталазной активности, выраженной в виде Е на мл, на 19,0% (U,  $p < 0,05$ ). Удельная ферментативная активность увеличивалась при этом на 17,3% (U,  $p < 0,05$ ). Можно предполагать, что при приеме эпифамина и мелаксена, сопровождающимся возрастанием уровня мелатонина в организме, могла происходить индукция фермента под действием данного гормона [278]. Кроме того, в литературе имеются сведения о том, что мелатонин при окислительном стрессе защищает молекулу каталазы от свободнорадикального повреждения [288].

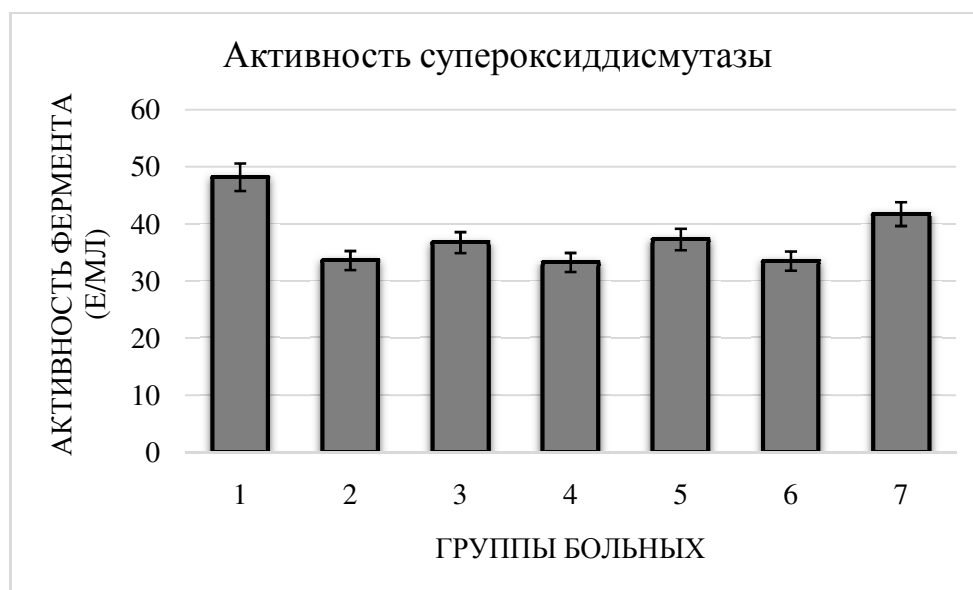


Рисунок 29. Активность СОД (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

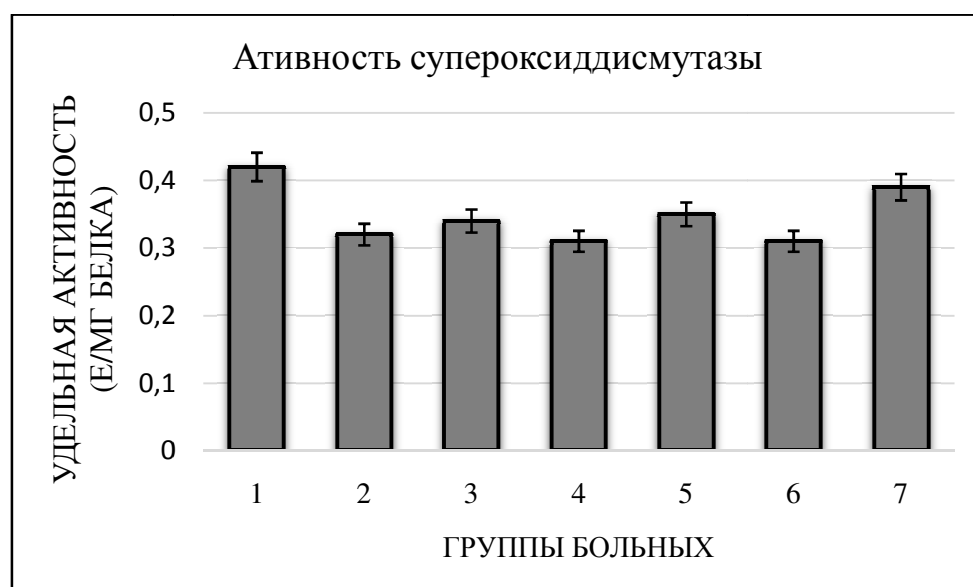


Рисунок 30. Удельная активность СОД (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

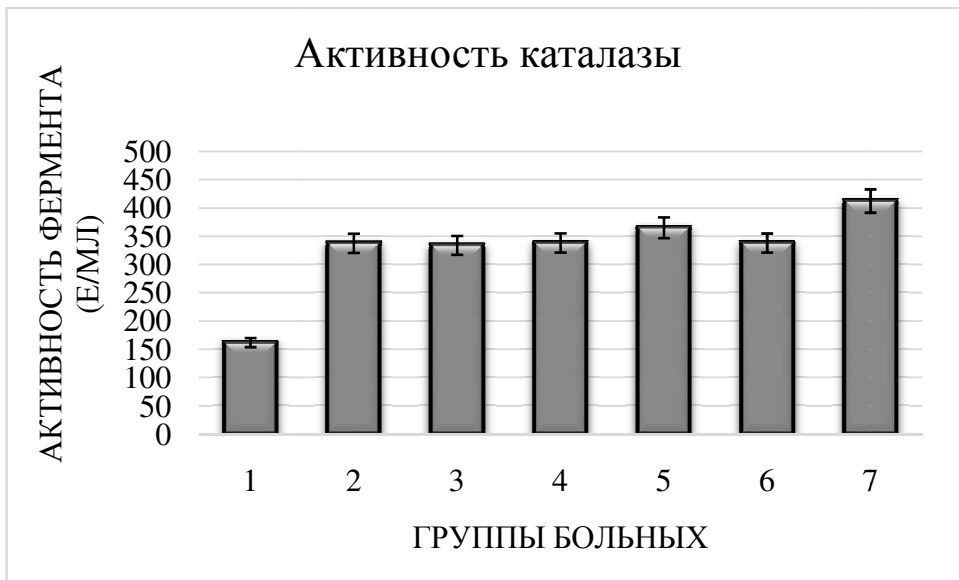


Рисунок 31. Активность каталазы (E/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

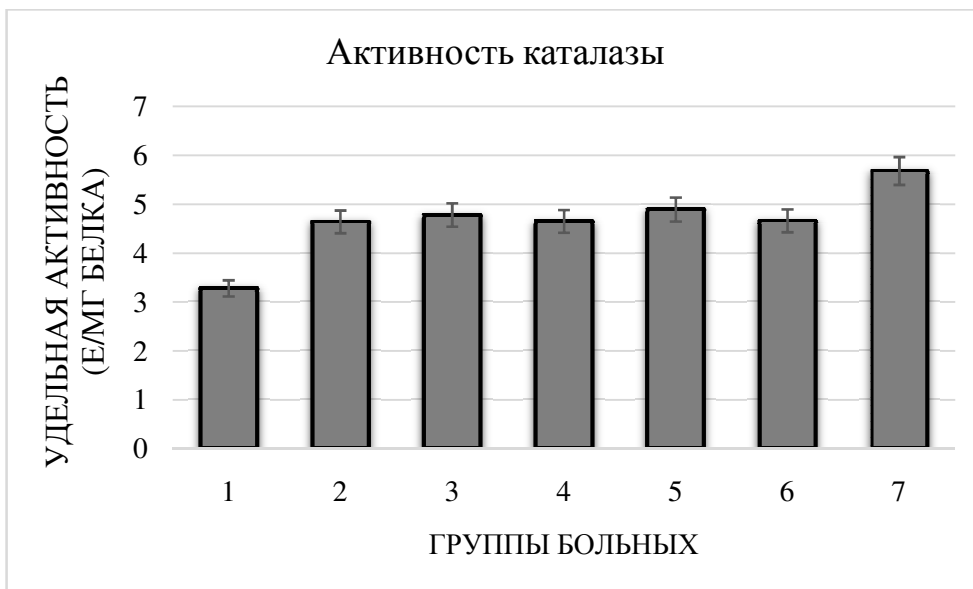


Рисунок 32. Удельная активность каталазы (E/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Вместе с тем, незначительные изменения активности каталазы могли определяться влиянием вышеотмеченных факторов, с одной стороны, и снижением степени мобилизации активности данного антиоксидантного фермента в условиях торможения свободнорадикальных процессов под действием мелатонина, – с другой. Таким образом, при включении эпифамина и мелаксена в лечение наблюдалась тенденция дальнейшего возрастания каталазной активности, что могло иметь значение с точки зрения коррекции свободнорадикального гомеостаза при патологии.

Исходя из полученных данных, можно сделать заключение, что изменения активностей СОД и каталазы имели разнонаправленный характер в условиях окислительного стресса при НАСГ, развивающимся при СД2. Однако при действии эпифамина и мелаксена происходила коррекция уровня эндогенного мелатонина в организме, что способствовало устранению дисбаланса в работе данных ферментов. С другой стороны, не исключено, что определенные эффекты на СОД и каталазу могут оказывать продукты псевдопероксидазного окисления мелатонина цитохромом с: АФМК, 2-гидроксимелатонин и 2,3-дигидроксимелатонин [277].

**Содержание цитрата и альфа-токоферола в сыворотке крови больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся на фоне сахарного диабета типа, при проведении комбинированной терапии, включающей эпифамин или мелаксен**

Следует отметить, что ранее в эксперименте на животных нами было показано, что при патологических состояниях, сопряженных с оксидативным стрессом, торможение активности АкГ сопряжено с возрастанием уровня цитрата [189]. Однако в результате проведенных нами исследований такой взаимосвязи между содержанием цитрата и активностью АкГ в сыворотке крови пациентов с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, в большинстве случаев выявлено не было, что, возможно, связано с метаболическими превращениями цитрата в других

процессах, протекающих с участием других ферментов, как например, цитратсинтазы или цитратлиазы, активности которых могут изменяться при СД. У больных с СД2 с ожирением происходит активация липогенеза, в регуляции которого непосредственную роль играет цитратлиаза. Цитрат является участником синтеза жирных кислот, поставляя в данный метаболический путь ацетильные фрагменты, которые расходуются на образование малонил- CoA [29].

В результате проведенных нами исследований выявлено, что при НАСГ, протекающем на фоне СД2, содержание цитрата в сыворотке крови у большинства пациентов (81,3 %) уменьшалось в среднем в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем. Возможно, это сопряжено с метаболическими нарушениями, сопровождающими течение СД2. Так, при данной патологии происходит подавление интенсивности протекания цикла Кребса из-за низкого уровня оксалоацетата и ингибирования цитратсинтазы, катализирующей начальную стадию цикла трикарбоновых кислот, а именно, образование цитрата [74].

Вместе с тем, было выявлено, что у небольшой части больных (18,7%) НАСГ имело место увеличение содержания цитрата в сыворотке крови в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. Изменение уровня цитрата, по всей видимости, было сопряжено с уменьшением активности АсГ. Известно, что накопление цитрата может расцениваться, как адаптивный процесс при развитии оксидативного стресса, так как благодаря хелаторным свойствам аниона лимонной кислоты по отношению к ионам  $Fe^{2+}$  - катализаторам цепных свободнорадикальных процессов, уменьшается вероятность образования гидроксильного радикала [619]. После проведения базисного лечения в группе больных с пониженным уровнем цитрата наблюдалось увеличение его содержания у 42% пациентов в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза. Однако у остальных пациентов содержание цитрата оставалось примерно на том же уровне. В группе больных с повышенными показателями содержания цитрата базисное лечение приводило к снижению его концентрации в среднем на 27,1% ( $p < 0,05$ ).

При комбинированной терапии с эпифамином происходило увеличение низких значений цитрата у 51% больных в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения; у остальных пациентов (49%) показатели уровня цитрата существенно не изменялись. В группе больных, с повышением значения цитрата, при приеме эпифамина происходило их снижение в среднем на 35,9% ( $p < 0,05$ ). Комбинированная терапия с мелаксеном приводила к возрастанию низких показателей содержания цитрата у 63% пациентов в среднем в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза; у остальных больных эти значения оставались на том же уровне. После лечения с мелаксеном, высокие значения цитрата снижались на 39,2% ( $p < 0,05$ ), приближаясь к уровню нормы.

Таким образом, при включении эпифамина и мелаксена в терапию имели место более значительные изменения содержания цитрата в сторону контроля по сравнению с базисным лечением, что могло быть связано с адаптагенными свойствами мелатонина при окислительном стрессе.

Витамин Е защищает внутренние митохондриальные мембраны, а также лизомы от повреждающего действия перекисей, поддерживает функциональную целостность внешней цитоплазматической мембраны клеток [439, 637].  $\alpha$  – Токоферол эффективно прерывает цепные свободнорадикальные реакции в процессе перекисления ненасыщенных жирных кислот в мембранах, предупреждает атерогенные изменения ЛПНП. Предотвращая аутоокисление липидов мембран,  $\alpha$  –токоферол снижает потребность в глутатионпероксидазе. Существует прямая связь между витамином Е и тканевым дыханием и обратная связь со степенью окисления липидов [43, 82].

В ходе нашей работы было выявлено, что в сыворотке крови больных первой группы до проведения лечения содержание  $\alpha$  -токоферола было в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза меньше по сравнению с контролем (Рисунок 33). Очевидно, это было связано с расходом данного метаболита в ответ на чрезмерное образование АФК. Вероятно, что при окислительном стрессе в условиях недостаточности жирорастворимых восстановителей наступала инактивация  $\alpha$  -токоферола

[165]и антиоксидантных ферментов, в первую очередь, за счет модификации аминокислотных остатков активного центра ферментов под влиянием АФК [217]. После проведения базисной терапии концентрация  $\alpha$ -токоферола увеличивалась в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза. Таким образом, базисное лечение благоприятно влияло на АОС и как следствие, способствовало восстановлению уровня  $\alpha$ -токоферола, изменяя его содержание в крови в сторону нормы. Возможно, это было связано с активизацией процессов восстановления окисленной формы  $\alpha$ -токоферола.

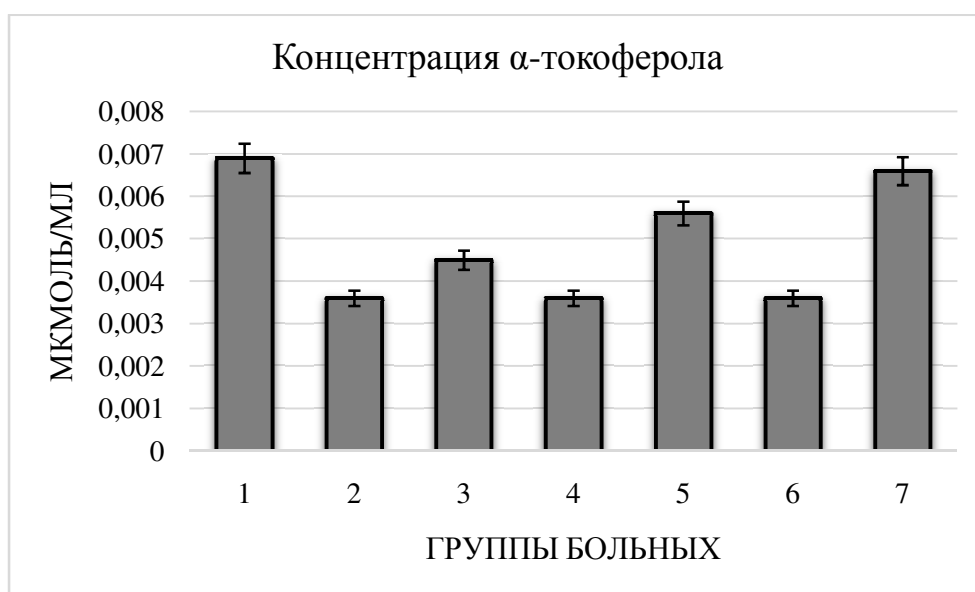


Рисунок 33. Концентрация альфа-токоферола в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

В сыворотке крови пациентов 2-ой и 3-ей групп перед проведением лечения наблюдалось аналогичное снижение концентрации  $\alpha$ -токоферола. После комбинированной терапии с эпифамином содержание  $\alpha$ -токоферола увеличивалось в 1,6 ( $U, p < 0,05$ ) раза, что выше, чем в первой группе. Включение мелаксена в лечение сопровождалось еще более значительным возрастанием уровня  $\alpha$ -токоферола – в 1,8 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Поскольку  $\alpha$ -токоферол является основным антиоксидантом, находящимся в липидной фазе мембран и

защищающим клетку от АФК, то, очевидно, возрастание его концентрации свидетельствует о позитивном действии мелатонина, уровень которого корректируется под действием эпифамина и мелаксена, на свободнорадикальный гомеостаз организма.

### **Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на апоптотические процессы у больных с алкогольным гепатитом**

#### **Воздействие эпифамина и мелаксена на активность каспаз в сыворотке крови больных с неалкогольным сеатогепатитом, развивающемся при сахарном диабете 2 типа**

Результаты определения параметров биохемилюминесценции и уровня ДК в сыворотке крови пациентов с НАСГ, возникающим при СД2, свидетельствуют об активации свободнорадикальных процессов, истощении АОС организма, что приводит к окислительному стрессу и может индуцировать апоптоз. Развитие апоптоза сопряжено с активацией каспаз, которые могут приводить к реорганизации цитоскелета, нарушению структуры, репликации и репарации ДНК, прерыванию сплайсинга, разрыву ядерных структур и дезинтеграции клеток на апоптотические тела [241].

Определение активности каспаз в сыворотке крови пациентов с НАСГ, развивающимся при СД2, выявило ее значительное возрастание при патологии. Так, активность каспазы-1 увеличивалась в 1,7 ( $p<0,05$ ) раза, каспазы-3 – в 1,8 ( $p<0,05$ ) раза по сравнению с нормой (Рисунки 34, 35). Это свидетельствует об усилении интенсивности апоптотических процессов в организме больных. Следует отметить, что повышение активности каспазы-3 было также обнаружено в печени экспериментальных животных при моделировании токсического гепатита с помощью четыреххлористого углерода [250].



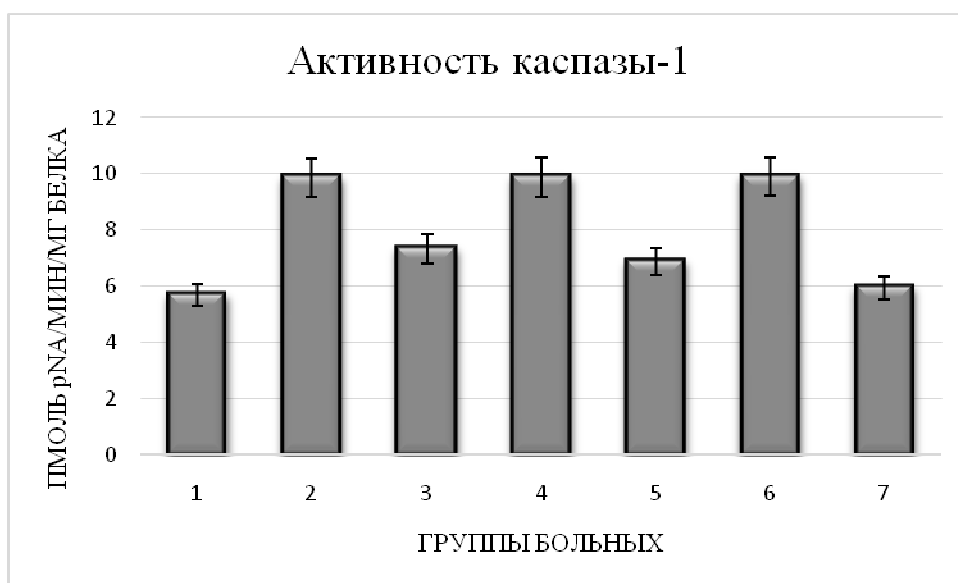


Рисунок 34. Активность каспазы-1 в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

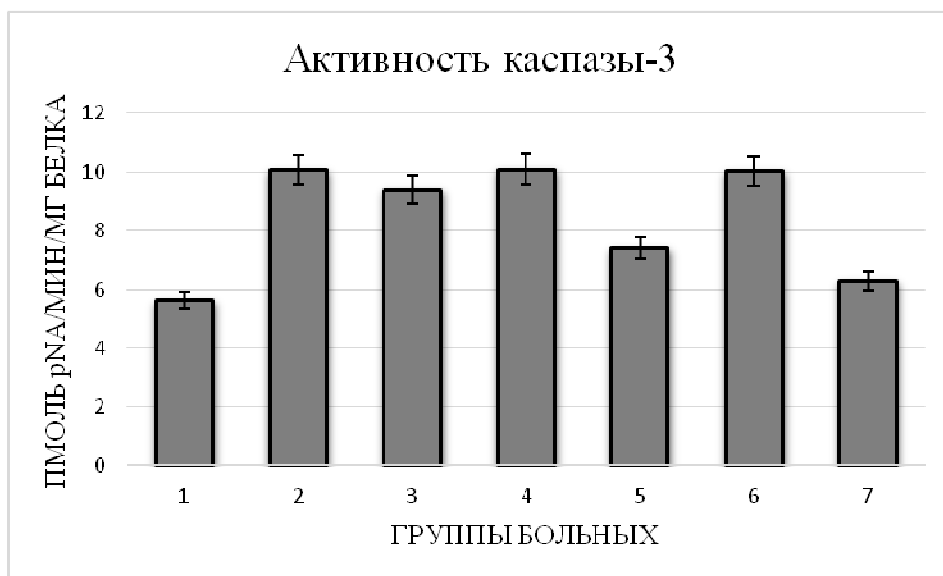


Рисунок 35. Активность каспазы-3 в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

После проведения базисного лечения активность каспазы-1 снижалась в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза, однако достоверных изменений активности каспазы-3 в большинстве случаев выявлено не было. При включении эпифамина в терапию наблюдалось уменьшение активности каспазы-1 ( $p < 0,05$ ) и каспазы-3 ( $U, p < 0,05$ ) в 1,4 раза по сравнению с соответствующими значениями у пациентов до лечения. Комбинированное лечение с мелаксеном приводило к снижению активности каспазы-1 в 1,7 ( $U, p < 0,05$ ) раза, каспазы-3 – в 1,6 ( $U, p < 0,05$ ) раза. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о снижении уровня апоптотических процессов в организме пациентов с СД2, осложненном стеатогепатитом, при действии мелатонин-корректирующих препаратов, что, по-видимому, связано с возрастанием уровня мелатонина. Очевидно, при терапии с эпифамином и мелаксеном имело место торможение свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствуют параметры БХЛ и уровень ДК, что и приводило к меньшей степени активации процессов апоптоза.

#### **Оценка степени фрагментации ДНК в лимфоцитах крови больных неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа**

Согласно данным электрофоретического анализа ДНК, выделенная из лейкоцитов больных НАСГ была фрагментирована по сравнению с ДНК контрольных проб (Рисунок 36). Была также выявлена полоса в области низких молекулярных масс, соответствующая деградированной ДНК, характерной для процесса некроза [273]. После проведения базисной терапии наблюдалось снижение степени фрагментации ДНК, свидетельствующее о положительном эффекте лечения. Включение эпифамина или мелаксена в базисную терапию приводило к значительному уменьшению степени фрагментации ДНК, что может быть свидетельством антиапоптотического действия данных препаратов.

Таким образом, результаты определения фрагментации ДНК лейкоцитов крови пациентов с НАСГ соответствуют данным по изменению активности каспаз

при данной патологии, проведении базисного лечения и приеме мелатонин-корректирующих на фоне базисной терапии. Считают, что фрагменты ДНК возникают под действием апоптоз-специфичных нуклеаз в терминальной фазе апоптоза [538]. В ходе деградации ДНК сначала образуются крупные фрагменты, длиной примерно 300 т.п.н., несколько позже – 30–50 т.п.н. На следующем этапе в ходе межнуклеосомной деградации ДНК под действием кальций-чувствительной эндонуклеазы CAD (caspase-activated DNase) формируются фрагменты длиной 180 п.н. или кратные им. Именно эти фрагменты электрофоретически выявляются в виде «апоптозной лестницы». Как известно, подобная фрагментация ДНК может быть связана с протеолитическим расщеплением под действием каспаз и ДНК-топоизомеразы II, участвующей в формировании супервитков ДНК. Кроме того, субстратом каспаз при апоптозе является гистон H1, защищающий ДНК от действия эндонуклеаз на межнуклеосомном уровне [402].

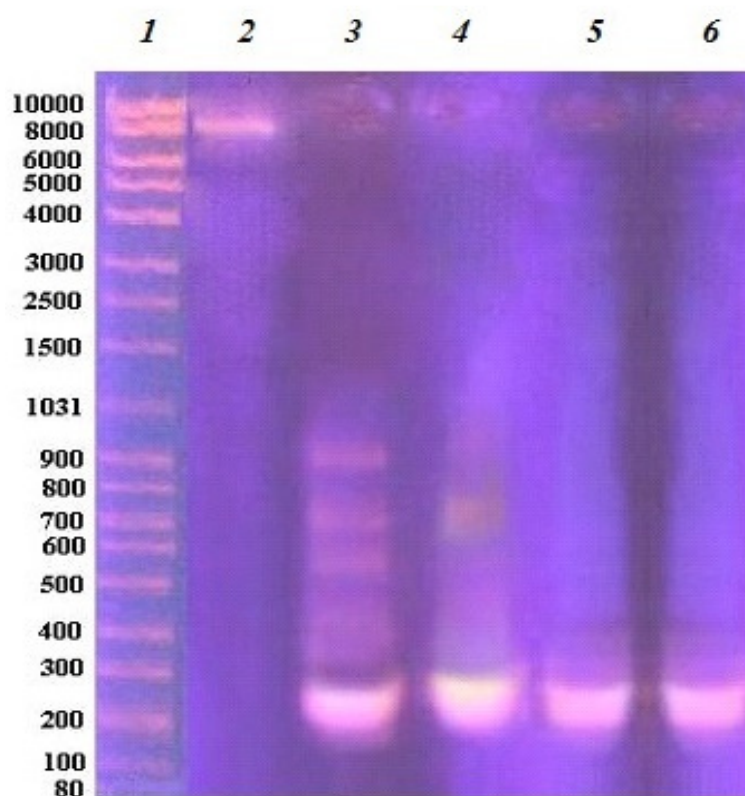


Рисунок 36. Степень фрагментации ДНК в лимфоцитах крови больных в норме (2), с НАСГ перед лечением (3), при проведении базисного лечения (3) и комбинированной терапии с эпифамином (4) или мелаксеном (5)

С участием каспазы-3 подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК. Каспазы вызывают также гидролиз белков ламинов, армирующих ядерную мембрану, что ведет к конденсации хроматина. Они участвуют в разрушении белков, поддерживающих структурно-функциональное состояние цитоскелета, а также в инактивации и нарушении регуляции белков, участвующих в репарации ДНК, сплайсинге мРНК и репликации ДНК. По-видимому, коррекция уровня мелатонина под действием применяемых препаратов приводила к защите молекулы ДНК от действия АФК, содержание которых повышается при патологии.

**Сравнительный анализ клинической эффективности базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном у больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа**

Клиническую эффективность базисной терапии, комбинированного лечения с эпифамином или мелаксеном при неалкогольном стеатогепатите, развивающимся при сахарном диабете 2 типа (%), оценивали по динамике изменений лабораторных показателей в направлении нормальных значений, рассчитывая среднее значение (М) для каждого блока биохимических параметров.

Таблица 27. Эффективность базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном у больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при сахарном диабете 2 типа, на основе оценки лабораторных показателей.

Показатели	Эффективность базисного лечения	Эффективность комбинированной терапии с эпифамином	Эффективность комбинированной терапии с мелаксеном
<b>6-СМ</b>	<b>0,9%</b>	<b>12,2%</b>	<b>14,1%</b>
<i>Показатели углеводного обмена</i>			
Глюкоза (натощак)	26,5%	38,9%	44,7%

Глюкоза (постпрандиальная)	28,4%	33,6%	40,3%
HbA1c	19,1%	26,5%	31,5%
НОМА-IR	7,3%	17,3%	24,6%
<b>М</b>	<b>20,3%</b>	<b>29,1%</b>	<b>35,3%</b>
<i>Показатели липидного обмена</i>			
ЛПНП	18,9%	33,6%	43,8%
ЛПВП	5,6%	19,4%	21,1%
Холестерин	22,1%	26,1%	31,4%
Коэффициент атерогенности	30,0%	42,2%	53,2%
<b>М</b>	<b>19,2%</b>	<b>30,4%</b>	<b>37,4%</b>
<i>Показатели функции печени</i>			
АлАт	43,0%	47,1%	49,3%
АсАт	26,5%	34,4%	37,2%
ГГТП	51,1%	60,9%	63,5%
ХЭ	24,1%	38,1%	40,6%
Тимоловая проба	5,3%	10,3%	15,4%
<b>М</b>	<b>30,0%</b>	<b>38,2%</b>	<b>41,2%</b>
<i>Показатели иммунного статуса</i>			
Ig A	9,7%	15,6%	19,2%
Ig M	9,5%	14,6%	18,4%
Ig G	5,3%	9,0%	10,1%
ЦИК	28,1%	35,8%	40,1%
<b>М</b>	<b>13,2%</b>	<b>18,7%</b>	<b>22,2%</b>
<i>Показатели интенсивности свободнорадикального окисления</i>			
S	23,2%	40,8%	45,2%
Imax	31,6%	39,7%	46,8%
ДК	20,0%	34,4%	38,2%
АГ	19,0%	31,6%	32,9%
<b>М</b>	<b>23,5%</b>	<b>36,7%</b>	<b>40,8%</b>
<i>Показатели антиоксидантной системы</i>			
tgα <sub>2</sub>	16,2%	24,4%	25,6%
GSH	1,4%	18,6%	20,4%
ГП	14,9%	62,0%	65,7%
ГР	41,2%	53,2%	59,6%
Г-S-T	7,4%	23,3%	37,2%
СОД	8,6%	10,9%	24,4%
Каталаза	0%	8,0%	18,0%
α-токоферол	20,0%	35,8%	45,5%

<b>М</b>	<b>13,7%</b>	<b>29,5%</b>	<b>37,0%</b>
<i>Показатели интенсивности апоптотических процессов</i>			
Каспаза-1	25,7%	30,4%	40,0%
Каспаза-3	6,6%	26,9%	37,5%
<b>М</b>	<b>16,2%</b>	<b>28,7%</b>	<b>38,8%</b>

Уровень 6-СМ, отражающий эндогенную концентрацию мелатонина, после базисной терапии практически не изменялся (выявлено увеличение на 0,9%), при комбинированной терапии с эпифамином данный показатель повышался на 12,2%, при комбинированной терапии с мелаксеном – на 14,1%.

После проведения базисного лечения у больных с неалкогольным стеатогепатитом, развивающимся при СД2, происходило изменение показателей углеводного и липидного обмена в направлении контроля. Выявлено изменение данных параметров в среднем на 20,3% и 19,2% соответственно, по сравнению с данными, полученными до лечения. При комбинированной терапии с эпифамином показатели углеводного и липидного обмена изменялись в сторону нормы в среднем на 29,1% и 30,4%, при включении мелаксена в базисное лечение – на 35,3% и 37,4% соответственно, по сравнению с результатами до лечения. Данные изменения были в первую очередь обусловлены значительным снижением в крови уровня глюкозы и ЛПНП, и повышением содержания ЛПВП.

При оценке показателей функции печени эффективность базисной терапии составила 30,0%, при комбинированной терапии с эпифамином – 38,2%, при комбинированной терапии с мелаксеном – 41,2%. Как и у больных с АГ, наибольшее изменение среди параметров, отражающих функцию печени, было характерно для ГГТП и ХЭ.

При НАСГ параметры иммунного статуса изменялись в сторону нормы после базисной терапии в среднем на 13,2%, при комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном – на 18,7% и 22,2%, соответственно. При этом уровень содержания в крови больных с НАСГ Ig A, Ig M и ЦИК снижался в большей степени, чем Ig G.

Активность антиоксидантной системы повышалась в первой группе больных, после базисного лечения в среднем на 13,7%, во второй группе пациентов, после комбинированной терапии с эпифамином – на 29,5%, в третьей группе, после комбинированной терапии с мелаксеном – на 37,0%. Интенсивность свободнорадикального окисления и апоптотических процессов у пациентов с НАСГ, развивающимся при СД2, после базисной терапии уменьшалась на 23,5% и 16,2%, при комбинированном лечении с эпифамином – на 36,7% и 28,7%, после комбинированной терапии с мелаксеном – на 40,8% и 38,8% соответственно, по сравнению с результатами, полученными до лечения. При этом для всех показателей интенсивности СО биомолекул, апоптоза и активности АОС при назначении комбинированной терапии с включением мелатонин-корректирующих препаратов были характерны наибольшие изменения в направлении нормы по сравнению с базисным лечением.

Таким образом, эффективность базисного лечения при оценке данных лабораторных показателей составила 17,1%, комбинированного лечения с эпифамином – 27,9%, комбинированного лечения с мелаксеном – 33,4%. Полученные результаты исследования являются обоснованием антиоксидантного и гепатопротекторного действия мелатонин-корректирующих препаратов и свидетельствуют о более высокой клинической эффективности лечения данного патологического состояния при включении их в терапию.

### **Корреляционные связи биохимических показателей у больных с неалкогольным стеатогепатитом при комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном**

С помощью комплекса статистических программ у обследованных лиц были определены умеренные и сильные связи между изученными лабораторными показателями с коэффициентом ранговой корреляции Пирсона более 0,3 при уровне значимости ( $p$ ) < 0,05. Было осуществлено изучение ассоциаций биохимических параметров (АлАт, АсАт, ГГТП, ХЭ, ОХ, ЛПНП, ЛПВП, 6-СМ,

инсулин, с-пептид, HbA1c), иммунологических показателей (IgA, IgM, IgG, ЦИК), показателей свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>, ДК, АкГ), антиоксидантной системы (GSH, ГП, ГР, Г-S-T, каталаза, СОД, α-токоферол) и апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3).

Анализ ассоциативных связей различных параметров, определяемых в ходе исследования у больных с НАСГ 1-й группы, до лечения показал, что для биохимических показателей были характерны прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и процессов апоптоза, что отражено в таблице 28. Так, для АлАт было выявлено 8 связей, АсАт - 5, ГГТП - 9, ХЭ - 4, ОХ - 6, ЛПНП - 6, ЛПВП - 6, 6-СМ - 4, инсулина - 2, HbA1c - 7, что подтверждает значительную роль свободнорадикальных и апоптотических процессов в патогенезе НАСГ, развивающимся при СД2. Так, корреляционные связи были найдены между параметрами, отражающими степень цитолитического синдрома (активности АлАт, АсАт, ГГТП), сдвиги липидного обмена (ОХ, β-ЛП, ЛПВП) и HbA1c, что отражает важное значение гипергликемии, развивающейся при периферической инсулинорезистентности, и нарушений липидного обмена в патогенезе СД2 и ассоциированных с данным заболеванием осложнений, включая НАСГ. Необходимо отметить, что параметры интенсивности СО биомолекул (ДК, I<sub>max</sub>) и активности АОС организма (GSH, ГП, Г-S-T, каталаза, СОД, альфа-токоферол) имели связи с рядом биохимических показателей. Это подтверждает, что интенсификация свободнорадикальных процессов может выступать одним из ключевых механизмов развития данного заболевания, а также позволяет предполагать роль окислительного стресса как фактора патогенеза, лежащего в основе нарушений липидного и углеводного обмена. Необходимо отметить, что активация процессов ПОЛ в печени сопровождается подавлением катаболизма холестерина в гепатоцитах, что, в свою очередь, способствует поддержанию повышенного уровня ОХ в крови [606].



Таблица 28. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных 1-ой группы с неалкогольным стеатогепатитом.

Показатель	1-я группа (базисное лечение; n=33)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	ГГТП (r=+0,34; p=0,048) ЛПНП (r=+0,59; p=0,007) Каспаза-3 (r=+0,44; p=0,010) IgG (r=+0,49; p=0,003) ХЭ (r=+0,54; p=0,008) ДК (r=+0,58; p=0,003) ГП (r=+0,41; p=0,019)	GSH (r=-0,44; p=0,018)	ОХ (r=+0,35; p=0,049) ДК (r=+0,36; p=0,038) S (r=+0,45; p=0,019)	Инсулин (r=-0,34; p=0,043) СОД (r=-0,35; p=0,041)
АсАт	ГГТП (r=+0,36; p=0,038) ЦИК (r=+0,48; p=0,018) I <sub>max</sub> (r=+0,44; p=0,023)	6-СМ (r=-0,41; p=0,017) Каталаза (r=-0,46; p=0,006)	HbA1c (r=+0,37; p=0,043) I <sub>max</sub> (r=+0,48; p=0,011) ГР (r=+0,41; p=0,022)	ЛПВП (r=-0,51; p=0,009)
ГГТП	АлАт (r=+0,34; p=0,048) АсАт (r=+0,36; p=0,038) ОХ (r=+0,55; p=0,008) IgA (r=+0,52; p=0,009) IgM (r=+0,50; p=0,011)	ЛПВП (r=-0,48; p=0,011) GSH (r=-0,49; p=0,013) Г-S-T (r=-0,41; p=0,011) α-токоферол (r=-0,53; p=0,006)	ХЭ (r=+0,34; p=0,042) I <sub>max</sub> (r=+0,56; p=0,008) IgG (r=+0,38; p=0,041)	GSH (r=-0,51; p=0,010) α-токоферол (r=-0,55; p=0,002)

	ХЭ (r=+0,39; p=0,028)			
ХЭ	АлАт (r=+0,54; p=0,008) ГГТП (r=+0,39; p=0,028) Каталаза (r=+0,44; p=0,018)	Г-S-T (r=-0,35; p=0,036)	ДК (r=+0,34; p=0,049) α-токоферол (r=+0,38; p=0,03) IgA (r=+0,34; p=0,047) ГГТП (r=+0,34; p=0,042)	Инсулин (r=-0,37; p=0,042)
ОХ	ЛПНП (r=+0,58; p=0,002) ГГТП (r=+0,55; p=0,008) HbA1c (r=+0,39; p=0,029) IgA(r=+0,39; p=0,024)	ЛПВП (r=-0,65; p=0,000) 6-СМ (r=-0,43; p=0,01)	АлАт (r=+0,35; p=0,049) β-ЛП (r=+0,58; p=0,001) Iмаx (r=+0,36; p=0,048)	СОД (r=-0,46; p=0,011) ЛПВП (r=-0,49; p=0,005)
ЛПНП	ОХ (r=+0,58; p=0,002) ДК (r=+0,41; p=0,016) Каспаза-1 (r=+0,57; p=0,001) HbA1c (r=+0,49; p=0,019) АлАт (r=+0,59; p=0,007)	ЛПВП (r=-0,61; p=0,000)	ОХ (r=+0,58; p=0,001) HbA1c (r=+0,42; p=0,013) IgA(r=+0,35; p=0,045)	
ЛПВП	СОД (r=+0,52; p=0,007) α-токоферол (r=+0,56; p=0,003)	ОХ (r=-0,65; p=0,000) ЛПНП (r=-0,61; p=0,000) ГГТП (r=-0,48; p=0,011) HbA1c (r=-0,52; p=0,004)	GSH (r=+0,54; p=0,005)	АсАт (r=-0,51; p=0,009) ОХ (r=-0,49; p=0,005) HbA1c (r=-0,50; p=0,008)
6-СМ	СОД (r=+0,51; p=0,002)	АсАт (r=-0,41; p=0,017) ОХ (r=-0,43; p=0,01)	ГП (r=+0,48; p=0,011) ГР (r=+0,42; p=0,019)	

		Imax (r=-0,49; p=0,006)		
Инсулин	GSH (r=+0,36; p=0,038)	HbA1c(r=-0,45; p=0,008)	Г-S-Г (r=+0,45; p=0,011)	АлАт (r=-0,34; p=0,043) ХЭ (r=-0,37; p=0,042) HbA1c (r=-0,39; p=0,032) Каспаза-1 (r=-0,50; p=0,01)
HbA1c	ОХ (r=+0,39; p=0,029) ЛПНП (r=+0,49; p=0,019) Imax (r=+0,44; p=0,024) Каталаза (r=+0,38; p=0,034) Каспаза-1 (r=+0,39; p=0,037)	Инсулин(r=-0,45; p=0,008) ЛПВП (r=-0,52; p=0,004)	ЛПНП (r=+0,42; p=0,013) АсАт (r=+0,37; p=0,043) S (r=+0,39; p=0,04) Каспаза-3 (r=+0,47; p=0,018)	GSH (r=-0,44; p=0,0015) Инсулин (r=-0,39; p=0,032) ЛПВП (r=-0,50; p=0,008)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	ОХ (r=+0,39; p=0,024) ГГТП (r=+0,52; p=0,009) ГП (r=+0,36; p=0,035) Каспаза-3 (r=+0,41; p=0,034)	СОД (r=-0,39; p=0,042)	ХЭ (r=+0,34; p=0,047) ЛПНП (r=+0,35; p=0,045) ЦИК (r=+0,45; p=0,015) Каспаза-1 (r=+0,47; p=0,012)	
IgM	ГГТП (r=+0,50; p=0,011) ЦИК (r=+0,60; p=0,001)		Каталаза(r=+0,32; p=0,048)	ГР (r=-0,40; p=0,029)
IgG	АлАт (r=+0,49; p=0,003) ДК (r=+0,39; p=0,043)		ГГТП (r=+0,38; p=0,041) Каспаза-3 (r=+0,39; p=0,038)	АкГ(r=-0,49; p=0,018)

			ЦИК (r=+0,48; p=0,011)	
ЦИК	АсАт(r=+0,48; p=0,018) IgM (r=+0,60; p=0,001) S (r=+0,38; p=0,022)	АГ (r=-0,34; p=0,039)	IgA (r=+0,45; p=0,015) IgG (r=+0,48; p=0,011) ГП (r=+0,37; p=0,046)	АкГ(r=-0,46; p=0,023)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	ЦИК (r=+0,38; p=0,022) ГР (r=+0,56; p=0,008) Каталаза (r=+0,59; p=0,002) Каспаза-3 (r=+0,51; p=0,004)	АкГ (r=-0,54; p=0,009) ГСТ (r=-0,45; p=0,026)	НбА1с (r=+0,39; p=0,04) АлАт (r=+0,45; p=0,019) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,016)	СОД (r=-0,44; p=0,013) GSH (r=-0,41; p=0,0022)
Imax	АсАт (r=+0,44; p=0,023) НбА1с (r=+0,44; p=0,024)	6-СМ (r=-0,49; p=0,006)	АсАт (r=+0,48; p=0,011) ГГТП (r=+0,56; p=0,008) ОХ (r=+0,36; p=0,048)	
ДК	АлАт (r=+0,58; p=0,003) ЛПНП (r=+0,41; p=0,016) IgG (r=+0,39; p=0,043) ГР (r=+0,39; p=0,021) Каталаза (r=+0,49; p=0,009)		ХЭ (r=+0,34; p=0,049) Каспаза-3 (r=+0,40; p=0,021) АлАт (r=+0,36; p=0,038)	АкГ (r=-0,56; p=0,013)
АкГ	СОД (r=+0,38; p=0,044) α-токоферол (r=+0,57; p=0,002)	ЦИК (r=-0,34; p=0,039) S (r=-0,54; p=0,009) Каспаза-3 (r=-0,39; p=0,033)	GSH (r=+0,55; p=0,003) СОД (r=+0,43; p=0,019)	ДК (r=-0,56; p=0,013) IgG (r=-0,49; p=0,018) ЦИК (r=-0,46; p=0,023)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				

GSH	Инсулин (r=+0,36; p=0,038) Г-S-T (r=+0,56; p=0,007) α-токоферол (r=+0,51; p=0,003)	АлАт (r=+0,44; p=0,018) ГГТП (r=-0,49; p=0,013) ГП (r=-0,76; p=0,000) ГР (r=-0,63; p=0,001)	ЛПВП (r=+0,54; p=0,005) АкГ (r=+0,55; p=0,003) Г-S-T (r=+0,75; p=0,000) ГР (r=+0,71; p=0,000)	ГГТП (r=-0,51; p=0,010) HbA1c (r=-0,44; p=0,0015) S (r=-0,41; p=0,0022) Каспаза-1(r=-0,53; p=0,003)
ГР	ДК (r=+0,39; p=0,021) ГП (r=+0,76; p=0,000) S (r=+0,56; p=0,008)	GSH (r=-0,63; p=0,001) α-токоферол (r=-0,40; p=0,020)	АсАт (r=+0,41; p=0,022) 6-СМ (r=+0,42; p=0,019) GSH (r=+0,71; p=0,000)	IgM (r=+0,40; p=0,029)
ГП	АлАт (r=+0,41; p=0,019) IgA (r=+0,36; p=0,035) ГР (r=+0,76; p=0,000)	GSH (r=-0,76; p=0,000)	6-СМ (r=+0,48; p=0,011) СОД(r=+0,35; p=0,043) Каспаза-1(r=+0,37; p=0,031) ЦИК (r=+0,37; p=0,046)	
Г-S-T	GSH (r=+0,56; p=0,007)	ГГТП (r=-0,41; p=0,011) ХЭ (r=-0,35; p=0,036) Каталаза(r=-0,36; p=0,033) S (r=-0,45; p=0,026)	Инсулин (r=+0,45; p=0,011) GSH (r=+0,75; p=0,000)	
Каталаза	ХЭ (r=+0,44; p=0,018) S (r=+0,59; p=0,002) ДК (r=+0,49; p=0,009) HbA1c (r=+0,38; p=0,034)	АсАт (r=-0,46; p=0,006) Г-S-T(r=-0,36; p=0,033) СОД (r=-0,57; p=0,002)	IgM (r=+0,32; p=0,048)	
СОД	6-СМ (r=+0,51; p=0,002) ЛПВП (r=+0,52; p=0,007)	Каталаза (r=-0,57; p=0,002) IgA (r=-0,39; p=0,042)	АкГ (r=+0,43; p=0,019) ГП (r=+0,35; p=0,043)	АлАт (r=-0,35; p=0,041) ОХ (r=-0,46; p=0,011)

	АкГ (r=+0,38; p=0,044)			S (r=-0,44; p=0,013) Каспаза-1 (r=+0,55; p=0,001)
$\alpha$ -токоферол	ЛПВП (r=+0,56; p=0,003) АкГ (r=+0,57; p=0,002) GSH (r=+0,51; p=0,003)	ГГТП (r=-0,53; p=0,006) ГР (r=-0,40; p=0,020) Каспаза-1 (r=-0,50; p=0,006)	ХЭ (r=+0,38; p=0,03) Каспаза-3 (r=+0,42; p=0,026)	ГГТП (r=-0,55; p=0,002)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптологических показателей</b>				
Каспаза-1	ЛПНП (r=+0,57; p=0,001) HbA1c (r=+0,39; p=0,037)	$\alpha$ -токоферол (r=-0,50; p=0,006)	S (r=+0,46; p=0,016) ГП (r=+0,37; p=0,031) IgA (r=+0,47; p=0,012)	GSH(r=-0,53; p=0,003) Инсулин (r=-0,50; p=0,01) СОД (r=-0,55; p=0,001)
Каспаза-3	АлАт (r=+0,44; p=0,010) S (r=+0,51; p=0,004) IgA (r=+0,41; p=0,034)	АкГ (r=-0,39; p=0,033)	HbA1c (r=+0,47; p=0,018) ДК (r=+0,40; p=0,021) IgG (r=+0,39; p=0,038) $\alpha$ -токоферол (r=+0,42; p=0,026)	

Низкая концентрация 6-СМ в моче имела отрицательную ассоциацию с АсАт, ОХ, Imax, возрастающих при данной патологии, и положительную – с СОД. Таким образом, можно сделать вывод, что уменьшение уровня эндогенного мелатонина в организме было взаимосвязано с нарушениями метаболизма и интенсификацией СО биомолекул при развитии данного патологического состояния.

При корреляционном анализе иммунологических показателей было показано, что они проявляли множественные внутри- и межсистемные ассоциации, прямо взаимодействовали между собой, отражая степень дисбаланса иммунной системы. При этом для IgA было выявлено 5, IgM - 2, IgG -2, ЦИК -4 связи. Прямая ассоциация иммуноглобулинов и ЦИК с концентрацией ДК, с показателем интенсивности свободнорадикальных процессов - S, а также АлАт, АсАт, ГГТП указывает на сопряженность процессов СО биомолекул и цитолитического синдрома с нарушением иммунного статуса организма при НАСГ, развивающимся на фоне СД2.

Для показателей интенсивности свободнорадикального окисления было выявлено следующее количество связей: S – 6, Imax – 3, ДК – 6, АкГ – 5. Данные параметры были ассоциированы с биохимическими, антиоксидантными и апоптотическими показателями, что подтверждает роль окислительного стресса в инициации механизмов апоптоза, нарушении функционирования АОС организма и, в частности, печени при развитии НАСГ на фоне СД2.

Показатели АОС проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. При этом для GSH было обнаружено 7, ГР – 5, ГП – 4, Г-S-T – 5, каталазы – 7, СОД – 5,  $\alpha$ -токоферола – 5 связей. Полученные данные корреляционного анализа указывают, что при окислительном стрессе, развивающемся при НАСГ, возникает дисбаланс в функционировании определенных компонентов ферментативного и неферментативного звеньев АОС организма.

Корреляционные связи апоптотических параметров: каспаза-1 (3 связи), каспаза-3 (4 связи) свидетельствовали об инициации механизмов запрограммированной клеточной гибели в результате чрезмерной выработки свободных радикалов. Следует отметить, что каспаза-1 была прямо ассоциирована с уровнем ЛПНП и HbA1c. Это согласуется с литературными данными о том, что апоптотические процессы могут быть связаны не только с гибелью  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, но и с гиперпродукцией свободных радикалов в митохондриях в условиях гипергликемии, приводящей к блокаде гликолиза. В результате происходит инициализация ядерного фактора транскрипции (NF $\kappa$ -B) и стресс-активированной протеинкиназы p38MAPK, что при длительной активизации данного процесса ведет к апоптозу клеток [341]. Также необходимо отметить существование литературных сведений, согласно которым развитие инсулиновой недостаточности при СД2 связано с эффектом глюкозо- и липотоксичности за счет индукции окислительного стресса [574]. После проведения базисного лечения в 1-ой группе пациентов с НАСГ взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись (Таблица 28). Так, биохимические показатели проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и процессов апоптоза, что подтверждается результатами корреляционного анализа, свидетельствующего о наличии определенных связей: для АлАт -5, АсАт - 4, ГГТП - 4, ХЭ - 5, ОХ - 5, ЛПНП - 3, ЛПВП - 4, 6-СМ - 2, инсулина - 5, HbA1c -7. Активности аминотрансфераз (АлАт, АсАт) и ГГТП были тесно ассоциированы с показателями интенсивности СО биомолекул (S, ДК, I $\max$ ), антиоксидантной активности (ГР, СОД, альфа-токоферол), что подтверждает предположение о том, что при снижении интенсивности свободнорадикальных процессов, нормализации функционирования АОС организма и улучшении метаболических процессов в организме под действием гепатопротекторов происходило уменьшение цитолиза



клеток печени. Показатели липидного обмена (ОХ, ЛПНП, ЛПВП) были ассоциированы между собой и с уменьшением СО биомолекул (Imax), активизацией АОС организма (GSH, СОД) и нормализацией уровня аминотрансфераз (АлАт, АсАт). Включение в терапию гепатопротекторов, статинов и витаминотерапии, по-видимому, могло способствовать увеличению резервов АОЗ организма и препятствовать развитию гиперлипидемии. При этом показатели углеводного обмена (инсулин, HbA1c) имели прямые и обратные связи с показателями состояния свободнорадикального гомеостаза (S, GSH, Г-S-T) и цитолитического синдрома (АлАт, АсАт), уровень которых имел тенденцию к нормализации после базисной терапии. Таким образом, при назначении гепатопротекторов, обладающих антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием, и сахароснижающей терапии (препараты метформина и сульфаниламочевины), приводящей к снижению инсулинорезистентности, интенсивности глюконеогенеза в печени и усилению синтеза инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, происходило снижение активности СО биомолекул и нормализация уровня HbA1c.

Анализ ассоциативных связей иммунологических показателей: IgA (5), IgM (2), IgG (4), ЦИК (4), показал, что они проявляли прямую положительную связь с параметрами апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3) ферментативного звена АОС (ГП, ГР, каталаза) и отрицательную с активностью АкГ, отражающей интенсивность СО биомолекул, что свидетельствует о взаимосвязи между процессами апоптоза и состояниями антиоксидантного потенциала организма и иммунитета. По-видимому, снижение степени развития апоптоза в результате уменьшения активности свободнорадикальных процессов на фоне базисной терапии способствовало появлению тенденции изменения показателей иммунного статуса в сторону нормальных значений.

Параметры СО биомолекул проявляли множественные корреляционные связи. Так, S имела 5, ДК - 3, Imax - 4, АГ - 5 связей. Параметры антиоксидантной системы: GSH (7 связей), ГР (4 связи), ГП (4 связи), Г-S-T (2 связи), каталаза (1

связь), СОД (6 связей),  $\alpha$ -токоферол (3 связи), проявляли прямые как положительные, так и отрицательные корреляционные связи с показателями интенсивности свободнорадикального окисления, что свидетельствует о нормализации функционирования АОС и, следовательно, снижении выработки АФК и их влияния на метаболические процессы в организме больных НАСГ после проведения базисной терапии. Так, следует отметить, что активности ГР и Г-S-T, увеличивающиеся после базисного лечения, имели сильную прямую корреляцию с уровнем GSH, чего не наблюдалось до лечения. В целом анализ связей параметров свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы показал, что нормализация функционирования АОЗ организма благоприятно влияет не только на свободнорадикальные процессы, но и на биохимические показатели, отражающие степень развития цитолиза гепатоцитов и нарушения липидного и углеводного спектра крови.

Изменения корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (6 связей), каспаза-3 (4 связи), отражали значимость факторов, способствующих торможению процессов апоптоза в организме больных НАСГ после базисной терапии. В первую очередь, об этом свидетельствовали ассоциации с компонентами АОЗ (GSH, ГП, СОД, альфа-токоферол) и СО (S, ДК). Очевидно, что при уменьшении уровня свободных радикалов при активизации АОС организма происходило увеличение резистентности к апоптотическим стимулам, уровень которых повышается при данном патологическом процессе.

Как и в предыдущей группе больных с НАСГ, анализ ассоциативных связей лабораторных параметров во 2-ой группе пациентов до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (7), АсАт (5), ГГТП (6), ХЭ (1), ОХ (3), ЛПНП (2), ЛПВП (6), 6-СМ (3), инсулин (1), HbA1c (2) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса (IgA (3), IgM (2), IgG (3), ЦИК (6)), свободнорадикального окисления (S (5), I<sub>max</sub> (4), ДК (5), АГ (4)), антиоксидантной системы (GSH (9), ГР (7), ГП (5), Г-S-T (4), каталаза (3), СОД (4),  $\alpha$ -токоферол (4)) и апоптотических процессов (каспаза-1 (5), каспаза-

3 (3)). Таким образом, это убедительно подтверждает роль процессов СО биомолекул в патогенезе НАСГ, а именно в развитии цитолитического синдрома, нарушении углеводного, липидного обменов и иммунного статуса. Важную роль нарушение свободнорадикального гомеостаза играет и в развитии апоптотических процессов, активация которых происходит при данном патологическом состоянии.

После проведения комбинированного лечения с эпифамином во 2-ой группе больных с НАСГ взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись. Полученные результаты представлены в таблице 29.

Так, биохимические показатели, проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и процессов апоптоза, что подтверждается результатами корреляционного анализа, свидетельствующего о наличии определенных связей: для АлАт -6, АсАт - 6, ГГТП - 7, ХЭ - 5, ОХ - 6, ЛПНП - 6, ЛПВП – 4, 6-СМ - 8, инсулин – 8, НbА1с -5. Показатели цитолитического синдрома (АлАт, АсАт, ГГТП) были тесно ассоциированы с показателями интенсивности СО биомолекул (S, I<sub>max</sub>) и апоптоза (каспаза-1, каспаза-3). Также была выявлена связь с параметрами АОС, причем в большей степени с показателями глутатионовой системы (GSH, ГР, ГП), что подтверждает предположение о том, что активизация данной системы приводит к обезвреживанию АФК и снижению выраженности окислительного стресса и, как следствие, уменьшению цитолиза гепатоцитов. Показатели липидного обмена (ОХ, ЛПНП, ЛПВП) были ассоциированы между собой, с активизацией АОЗ организма (GSH, ГР, Г-S-T, СОД, каталаза, альфа-токоферол), уменьшением выраженности свободнорадикальных процессов (S, ДК) и нормализацией уровня аминотрансфераз (АлАт, АсАт).

Таблица 29. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных 2-ой группы с неалкогольным стеатогепатитом.

Показатель	2-я группа (комбинированное лечение с эпифамином; n=28)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	АсАт (r=+0,55; p=0,007) Каспаза-1 (r=+0,41; p=0,019) IgA (r=+0,42; p=0,036) IgM (r=+0,40; p=0,04) S(r=+0,51; p=0,013)	ЛПВП (r=-0,36; p=0,045) Г-S-T (r=-0,41; p=0,033)	ОХ (r=+0,46; p=0,015) IgG (r=+0,47; p=0,011) Imax (r=+0,50; p=0,01) Каталаза (r=+0,39; p=0,039)	GSH (r=-0,55; p=0,008) ГР (r=-0,47; p=0,012)
АсАт	АлАт (r=+0,55; p=0,007) ОХ (r=+0,39; p=0,032) ЛПНП (r=+0,39; p=0,04) Imax (r=+0,39; p=0,046)	АГ (r=-0,33; p=0,046)	Imax(r=+0,41; p=0,023) ЛПНП (r=+0,40; p=0,025) ХЭ (r=+0,48; p=0,013)	Инсулин (r=-0,37; p=0,048) АкГ(r=-0,45; p=0,018)
ГГТП	ДК (r=+0,43; p=0,016) ГР (r=+0,39; p=0,03) Каспаза-3 (r=+0,41; p=0,027)	GSH (r=-0,52; p=0,008) СОД (r=-0,49; p=0,015) α-токоферол (r=-0,44; p=0,027)	ХЭ (r=+0,48; p=0,012) S (r=+0,49; p=0,016) Каспаза-1(r=+0,36; p=0,046)	GSH (r=-0,56; p=0,002) ГП (r=-0,49; p=0,0015) Инсулин (r=-0,44; p=0,013) СОД (r=-0,42; p=0,025)
ХЭ	IgG (r=+0,59; p=0,002)		ГГТП (r=+0,48; p=0,012) АсАт (r=+0,48; p=0,013) S(r=+0,40; p=0,036)	Г-S-T (r=-0,47; p=0,023) СОД (r=-0,41; p=0,033)

ОХ	АсАт(r=+0,39; p=0,032)	ЛПВП (r=-0,43; p=0,028) α-токоферол (r=-0,41; p=0,015)	АлАт (r=+0,46; p=0,015) ЦИК (r=+0,40; p=0,034)	ЛПВП (r=-0,52; p=0,001) АкГ (r=-0,39; p=0,04) GSH (r=-0,39; p=0,042) Каталаза (r=-0,42; p=0,026)
ЛПНП	АсАт (r=+0,39; p=0,04)	АкГ(r=-0,48; p=0,01)	АсАт (r=+0,40; p=0,025) ДК(r=+0,41; p=0,023)	СОД(r=-0,45; p=0,026) GSH (r=-0,51; p=0,006) Г-S-T (r=-0,40; p=0,033) ГР (r=-0,39; p=0,041)
ЛПВП	GSH (r=+0,38; p=0,039) АкГ (r=+0,41; p=0,032)	АлАт (r=-0,36; p=0,045) ОХ (r=-0,43; p=0,028) Імах (r=-0,41; p=0,035) каталаза (r=-0,44; p=0,026)	α-токоферол (r=+0,45; p=0,016)	ОХ (r=-0,52; p=0,001) HbA1c (r=-0,41; p=0,031) ДК (r=-0,39; p=0,034)
6-СМ		ГР (r=-0,48; p=0,01) S (r=-0,57; p=0,002) Каспаза-3 (r=-0,4; p=0,023)	Инсулин (r=+0,39; p=0,036) GSH (r=+0,42; p=0,026) ГР (r=+0,47; p=0,019) Г-S-T (r=+0,51; p=0,008) каталаза (r=+0,46; p=0,013)	Імах (r=-0,46; p=0,018) ДК (r=-0,41; p=0,024) Каспаза-3 (r=-0,52; p=0,011)
Инсулин		ДК (r=-0,51; p=0,009)	6-СМ (r=+0,39; p=0,036) СОД (r=+0,45; p=0,016) Каталаза (r=+0,42; p=0,019) α-токоферол (r=+0,37; p=0,041)	АсАт (r=-0,37; p=0,048) ГГТП (r=-0,44; p=0,013) HbA1c (r=-0,58; p=0,001) ЦИК(r=-0,37; p=0,041)

HbA1c	Imax (r=+0,36; p=0,046)	ГП (r=-0,33; p=0,048)	IgA (r=+0,40; p=0,021)	ЛПВП (r=-0,41; p=0,031) Инсулин (r=-0,58; p=0,001) ГП (r=-0,39; p=0,03) АкГ (r=-0,44; p=0,019)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	АлАт (r=+0,42; p=0,036) ДК (r=+0,41; p=0,032) IgG(r=+0,41; p=0,029)		HbA1c (r=+0,40; p=0,021) Каталаза (r=+0,38; p=0,045) IgM (r=+0,45; p=0,014)	
IgM	АлАт (r=+0,40; p=0,04)	GSH(r=-0,48; p=0,016)	S (r=+0,35; p=0,047) IgG (r=+0,49; p=0,012) ЦИК (r=+0,39; p=0,041) IgA(r=+0,45; p=0,014)	СОД(r=-0,38; p=0,044)
IgG	ХЭ (r=+0,59; p=0,002) IgA (r=+0,41; p=0,029)	Г-S-T (r=-0,43; p=0,022)	IgM (r=+0,49; p=0,012) АлАт (r=+0,47; p=0,011) Каспаза-1 (r=+0,38; p=0,049) S (r=+0,38; p=0,044)	GSH (r=-0,38; p=0,048)
ЦИК	S (r=+0,48; p=0,025) ДК (r=+0,52; p=0,012) ГП (r=+0,42; p=0,025) Каспаза-1 (r=+0,38; p=0,026)	GSH (r=-0,36; p=0,038) ГП (r=-0,41; p=0,024)	IgM (r=+0,39; p=0,041) S (r=+0,48; p=0,018) Imax(r=+0,5; p=0,011) ОХ (r=+0,40; p=0,034)	Инсулин (r=-0,37; p=0,041) $\alpha$ -токоферол (r=-0,41; p=0,029)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	АлАт (r=+0,51; p=0,013)	6-СМ (r=-0,57; p=0,002)	ГТП (r=+0,49; p=0,016)	Каталаза (r=-0,42;

	ЦИК (r=+0,48; p=0,025)	GSH (r=-0,57; p=0,004) СОД (r=-0,51; p=0,011)	IgM (r=+0,35; p=0,047) IgG (r=+0,38; p=0,044) ЦИК (r=+0,48; p=0,018) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,027) ХЭ (r=+0,40; p=0,036)	p=0,029)
Imax	АсАт (r=+0,39; p=0,046) ГП (r=+0,47; p=0,027) HbA1c (r=+0,36; p=0,046)	ЛПВП (r=-0,41; p=0,035)	АлАт (r=+0,50; p=0,01) АсАт (r=+0,41; p=0,023) ЦИК(r=+0,5; p=0,011) Каспаза-1 (r=+0,49; p=0,019)	СОД (r=-0,53; p=0,009) Г-S-T (r=-0,45; p=0,025) 6-СМ (r=-0,46; p=0,018)
ДК	ГГТП (r=+0,43; p=0,016) IgA (r=+0,41; p=0,032) ЦИК (r=+0,52; p=0,012)	Инсулин (r=-0,51; p=0,009) СОД (r=-0,46; p=0,02)	ЛПНП (r=+0,41; p=0,023) Каспаза-3 (r=+0,53; p=0,009)	ЛПВП (r=-0,39; p=0,034) 6-СМ (r=-0,41; p=0,024) GSH (r=-0,31; p=0,049) $\alpha$ -токоферол(r=-0,51; p=0,01)
АкГ	ЛПВП (r=+0,41; p=0,032)	АсАт (r=-0,33; p=0,046) ГП (r=-0,42; p=0,025) ЛПНП (r=-0,48; p=0,01)	Г-S-T (r=+0,33; p=0,049) СОД (r=+0,39; p=0,041)	АсАт (r=-0,45; p=0,018) ОХ (r=-0,39; p=0,04) HbA1c(r=-0,44; p=0,019)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	ЛПВП (r=+0,38; p=0,039) Г-S-T (r=+0,66; p=0,000) $\alpha$ -токоферол (r=+0,51; p=0,01)	ГГТП (r=-0,52; p=0,008) S (r=-0,57; p=0,004) ЦИК (r=-0,36; p=0,038) IgM (r=-0,48; p=0,016) ГР (r=-0,55; p=0,007)	6-СМ (r=+0,42; p=0,026) ГР (r=+0,39; p=0,041)	АлАт (r=-0,55; p=0,008) ГГТП (r=-0,56; p=0,002) ОХ (r=-0,39; p=0,042) ЛПНП (r=-0,51; p=0,006) ДК (r=-0,31; p=0,049)

		Каспаза-1 (r=-0,45; p=0,022)		Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,018) IgG (r=-0,38; p=0,048)
ГР	ГГТП (r=+0,39; p=0,03) ГП (r=-0,69; p=0,000) Каспаза-3 (r=+0,46; p=0,02)	6-СМ (r=-0,48; p=0,01) HbA1c (r=-0,33; p=0,048) GSH (r=-0,55; p=0,007) Г-S-T (r=-0,58; p=0,002)	6-СМ (r=+0,47; p=0,019) GSH (r=+0,39; p=0,041) α-токоферол (r=+0,35; p=0,049) ГП (r=+0,49; p=0,025)	ЛПНП (r=-0,39; p=0,041) АлАт (r=-0,47; p=0,012)
ГП	Imax (r=+0,47; p=0,027) ГР (r=-0,69; p=0,000) ЦИК (r=+0,42; p=0,025)	ЦИК (r=-0,41; p=0,024) АкГ (r=-0,42; p=0,025)	α-токоферол (r=+0,46; p=0,014) ГР (r=+0,49; p=0,025)	ГГТП (r=-0,49; p=0,0015) HbA1c (r=-0,39; p=0,03) Каспаза-3 (r=-0,40; p=0,035)
Г-S-T	GSH (r=+0,66; p=0,000)	АлАт (r=-0,41; p=0,033) ГР (r=-0,58; p=0,002) IgG (r=-0,43; p=0,022)	АкГ (r=+0,33; p=0,049) 6-СМ (r=+0,51; p=0,008)	ХЭ (r=-0,47; p=0,023) ЛПНП (r=-0,40; p=0,033) Imax (r=-0,45; p=0,025) Каспаза-1 (r=-0,46; p=0,021)
Каталаза	Каспаза-1 (r=+0,5; p=0,011)	ЛПВП (r=-0,44; p=0,026) СОД (r=-0,52; p=0,009)	Инсулин (r=+0,42; p=0,019) 6-СМ (r=+0,46; p=0,013) IgA (r=+0,38; p=0,045) АлАт (r=+0,39; p=0,039) СОД (r=+0,52; p=0,018)	ОХ (r=-0,42; p=0,026) S (r=-0,42; p=0,029) Каспаза-3 (r=-0,44; p=0,029)
СОД		ГГТП (r=-0,49; p=0,015) S (r=-0,51; p=0,011) ДК (r=-0,46; p=0,02)	Инсулин (r=+0,45; p=0,016) АкГ (r=+0,39; p=0,041) Каталаза (r=+0,52; p=0,018)	ЛПНП (r=-0,45; p=0,026) IgM (r=-0,38; p=0,044) ХЭ (r=-0,41; p=0,033)



		каталаза (r=-0,52; p=0,009)		ГГТП (r=-0,42; p=0,025) Каспаза-1 (r=-0,37; p=0,038) I <sub>max</sub> (r=-0,53; p=0,009)
α-токоферол	GSH (r=+0,51; p=0,01)	ГГТП (r=-0,44; p=0,027) ОХ (r=-0,41; p=0,015) Каспаза-1 (r=-0,45; p=0,018)	ЛПВП (r=+0,45; p=0,016) ГП (r=+0,46; p=0,014) Инсулин (r=+0,37; p=0,041)	ЦИК (r=-0,41; p=0,029) ДК (r=-0,51; p=0,01)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	АлАт (r=+0,41; p=0,019) ЦИК (r=+0,38; p=0,026) Каталаза (r=+0,5; p=0,011)	GSH (r=-0,45; p=0,022) α-токоферол (r=-0,45; p=0,018)	ГГТП (r=+0,36; p=0,046) IgG (r=+0,38; p=0,049) S (r=+0,46; p=0,027) I <sub>max</sub> (r=-0,49; p=0,019)	СОД (r=-0,37; p=0,038) Г-S-T (r=-0,46; p=0,021)
Каспаза-3	ГГТП (r=+0,41; p=0,027) ГР (r=+0,46; p=0,02)	6-СМ (r=-0,4; p=0,023)	ДК (r=+0,53; p=0,009)	6-СМ (r=-0,52; p=0,011) GSH (r=-0,46; p=0,018) ГП (r=-0,40; p=0,035) Каталаза (r=-0,44; p=0,029)

Таким образом, как и показатели цитолитического синдрома параметры липидного обмена имели связи с активацией параметров глутатионовой системы (GSH, ГР, Г-S-T) при комбинированной терапии с эпифамином, что могло благоприятно влиять на метаболические процессы в организме. Индикаторы углеводного обмена (инсулин, HbA1c) имели прямые и обратные связи с компонентами ферментативного звена АОС (ГП, каталаза, СОД) и цитолитического синдрома (АсАт, ГГТП), уровень которых изменялся в направлении нормы после лечения с эпифамином. Показатель эндогенной концентрации мелатонина в организме – 6-СМ, имел корреляционные связи с параметрами глутатионовой системы (GSH, ГР, Г-S-T) и каталазой. Это подтверждает предположение о том, что мелатонин, коррекция уровня которого имела место под действием эпифамина, может воздействовать на активность ферментов АОС организма, стимулируя их синтез [520]. Повышение концентрации 6-СМ после терапии с эпифамином имело прямую корреляционную связь с уровнем инсулина, что подтверждалось снижением HbA1c. Известно, что мелатонин обеспечивает синхронизацию секреции инсулина и гомеостаза глюкозы с чередованием светлого и темного времени суток[418]. При СД2 происходило снижение секреции мелатонина. Таким образом, мелатонин, коррекция уровня которого происходила в организме под действием эпифамина, во-первых, мог защищать  $\beta$ -клетки от действия на них АФК и уменьшать окислительный стресс, а во-вторых, увеличивать пролиферацию и неогенез  $\beta$ -клеток, этим самым увеличивая секрецию инсулина и чувствительность к данному гормону [423].

Анализ ассоциативных связей иммунологических показателей: IgA (3), IgM (5), IgG (5), ЦИК (6 связей), показал, что они проявляли прямую положительную ассоциацию с параметрами свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>) и отрицательную с определенными показателями АОЗ (GSH, СОД, каталаза, альфа-токоферол). Таким образом, очевидно, что при активации АОС организма и снижении степени выраженности окислительного стресса у больных после

проведения комбинированной терапии с эпифамином происходила нормализация иммунного статуса.

Параметры свободнорадикального окисления проявляли множественные корреляционные связи. Так, S имела 7 связей, ДК – 6, I<sub>max</sub> – 7, АкГ – 5 связей.

Прямые ассоциации с аминотрансферазами (АлАт, АсАт) и ГГТП, а также обратная корреляция с параметрами АОС (GSH, Г-S-T, СОД, каталаза) доказывают, что при комбинированном лечении с эпифамином происходило возрастание антиоксидантного статуса организма, что приводило к уменьшению активности процессов СО биомолекул и, в свою очередь, снижению выраженности цитолитического синдрома у больных с НАСГ.

Параметры антиоксидантной системы: GSH (9 связей), ГР (6 связей), ГП (5 связей), Г-S-T (6 связей), каталаза (8 связей), СОД (9 связей), α-токоферол (5 связей), проявляли прямые как положительные, так и отрицательные корреляционные связи. Так, GSH, ГР, Г-S-T, каталаза проявляли прямую корреляционную связь с повышением уровня 6-СМ. Это свидетельствует о том, что мелатонин, уровень которого повышался после комбинированной терапии с эпифамином, обладает антиоксидантными свойствами, а также стимулирует синтез компонентнов ферментативного звена АОС, что, в свою очередь, благоприятно сказывается на состоянии свободнорадикального гомеостаза организма. Следует отметить, что активности Г-S-T и СОД, увеличивающиеся после комбинированной терапии с эпифамином, имели обратную корреляцию с уровнем ХЭ. Очевидно, что улучшение белково-синтезирующей функции гепатоцитов при НАСГ, развивающимся при СД2, было связано с активацией АОЗ и нормализацией метаболизма в клетках печени. Анализ связей параметров АОС показал, что нормализация компонентов данной системы, благоприятно влияет на свободнорадикальные процессы и на углеводный и липидный обмен в организме.

Изменения корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (6 связей), каспаза-3 (5 связи) были ассоциированы с компонентами АОС (GSH, ГП, Г-S-T, СОД, каталаза) и СО (S, I<sub>max</sub>, ДК), а также с уровнем 6-СМ. Очевидно,

при терапии с эпифамином происходило возрастание уровня эндогенного мелатонина в организме, что приводило к усилению антиоксидантного потенциала и торможению свободнорадикальных процессов и, в конечном счете, к защите молекулы ДНК от действия АФК и снижению интенсивности апоптотических процессов.

Как и в двух предыдущих группах пациентов с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, анализ ассоциативных связей лабораторных параметров 3-ей группы пациентов до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (9), АсАт (6), ГГТП (8), ХЭ (2), ОХ (3), ЛПНП (3), ЛПВП (3), 6-МСФ (4), инсулин (3), HbA1c (8 связей) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса (IgA (5), IgM (6), IgG (4), ЦИК (6 связей)), свободнорадикального окисления (S (8), I<sub>max</sub> (7), ДК (6), АкГ (7 связей)), антиоксидантной системы (GSH (11), ГР (6), ГП (6), Г-S-T (5), каталаза (4), СОД (5), α-токоферол (6 связей)) и апоптотических процессов (каспаза-1 (6), каспаза-3 (6 связей)). В результате анализа корреляционных связей можно сделать заключение, что в патогенезе НАСГ важнейшую роль играет дисбаланс между интенсификацией свободнорадикальных процессов и активностью антиоксидантной защиты организма, что тесно связано с нарушениями углеводного, липидного и иммунного обменов крови. Полученные результаты также свидетельствуют, что активизация СО биомолекул приводит к интенсификации апоптоза. Следует отметить, что также как и в 1-ой и во 2-ой группах пациентов, до лечения, имели место ассоциативные связи показателей, отражающих активацию СО и апоптоза, нарушения антиоксидантного статуса с пониженным уровнем в организме мелатонина, концентрация которого оценивалась по содержанию в моче 6-СМ.

После проведения комбинированного лечения с мелаксеном во 2-ой группе пациентов с НАСГ взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись. Полученные результаты представлены в таблице 30.

Биохимические показатели, проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, что подтверждается результатами корреляционного анализа: АлАт (6), АсАт (5), ГГТП (8), ХЭ – (5), ОХ (6), ЛПНП (6), ЛПВП (3), 6-СМ (14), инсулин (5), HbA1c (5 связей). Так, после комбинированного лечения с мелаксеном АлАт, АсАт, ГГТП проявляли корреляционные связи с параметрами липидного обмена ( $\beta$ -ЛП, ОХ), углеводного обмена (HbA1c, инсулин), СО биомолекул (I<sub>max</sub>, ДК), антиоксидантной системы (GSH, ГР, каталаза, альфа-токоферол). Очевидно, что повышение антиоксидантного статуса организма приводило к уменьшению выраженности свободнорадикальных процессов и нормализации функционирования метаболических процессов, что, в свою очередь, способствовало снижению степени цитолиза клеток печени. Для такого показателя как 6-СМ, отражающего концентрацию эндогенного мелатонина в организме, было характерно большее количество корреляционных связей, чем в предыдущих двух группах больных. Так, были обнаружены связи с параметрами СО биомолекул (S, ДК, АкГ) и АОС (GSH, ГП, Г-S-T, СОД, альфа-токоферол). Очевидно, что после приема мелаксена происходило повышение антиоксидантного потенциала организма и снижение свободнорадикальных процессов. Вероятно, это было связано с антиоксидантным действием мелатонина и его способностью активизировать ферментативные звенья антиоксидантной защиты. Необходимо сказать, что уровень ХЭ, снижающийся после комбинированного лечения с мелаксеном, имел отрицательные связи с компонентами ферментативного звена АОС (ГП, ГР) и 6-СМ, что, по-видимому, связано с улучшением состояния свободнорадикального гомеостаза, а также липидного и углеводного обмена организма. Следует отметить, что концентрация мелатонина, повышающаяся после комбинированного лечения с мелаксеном, имела наиболее тесные связи с компонентами глутатионовой системы, что указывает на ведущую роль дисбаланса в функционировании данной системы в

патогенезе НАСГ. 6-СМ имел тесную прямую корреляционную связь с инсулином, что позволяет предположить, что мелатонин может увеличивать секрецию инсулина и уменьшать дисфункцию  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентность, способствуя нормализации углеводного обмена [125].

Анализ ассоциативных связей иммунологических показателей: IgA (4), IgM (3), IgG (3), ЦИК (5 связей), показал, что они проявляли ассоциации с параметрами свободнорадикального окисления (I<sub>max</sub>, ДК, АГ) и антиоксидантной защиты (GSH, Г-S-T, каталаза, альфа-токоферол). Это указывает на то, что интенсификация антиоксидантных процессов приводила к нормализации иммунного статуса организма. Следует отметить, что параметры иммунного статуса имели отрицательную связь с 6-СМ, отражающего уровень мелатонина в организме, повышающегося до нормы при приеме мелаксена, что доказывает роль данного гормона в поддержании баланса иммунного статуса организма. Присутствие рецепторов к мелатонину на мембранах человеческих лимфоцитов, нейтрофилов, лейкоцитов, нейтрофилов и иммунокомпетентных клеток тимуса и селезенки свидетельствует об универсальном адаптагенном действии мелатонина [483].

Параметры свободнорадикального окисления проявляли множественные корреляционные связи. Так, S имела 6 связей, I<sub>max</sub> – 5, ДК – 10, АкГ – 4 связи. Имела место обратная корреляция с параметрами АОС (GSH, ГР, СОД, каталаза, альфа-токоферол) и уровнем 6-СМ, что доказывает уменьшение степени выраженности окислительного стресса при активизации функции АОС и непосредственном антиоксидантном действии мелатонина.

Параметры антиоксидантной системы: GSH (11 связей), ГР (5 связей), ГП (4 связи), Г-S-T (6 связей), каталаза (7 связей), СОД (6 связей),  $\alpha$ -токоферол (8 связей), проявляли прямые как положительные, так и отрицательные корреляционные связи.

Таблица 30. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных 3-ей группы с неалкогольным стеатогепатитом.

Показатель	3-я группа (комбинированное лечение с мелаксеном; n=26)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	HbA1c (r=+0,38; p=0,045) ГГТП (r=+0,58; p=0,001) ОХ (r=+0,50; p=0,011) ЦИК (r=+0,37; p=0,043) S (r=+0,57; p=0,003) ГП (r=+0,39; p=0,041) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,028)	Г-S-T (r=-0,41 p=0,038) $\alpha$ -токоферол (r=-0,33; p=0,037)	ГГТП (r=+0,41; p=0,032) ЛПНП (r=+0,46; p=0,020) Imax (r=+0,47; p=0,019) Каспаза-1(r=+0,36; p=0,047) HbA1c (r=+0,41; p=0,034)	GSH (r=-0,47; p=0,021)
АсАт	ГП (r=+0,41 p=0,041) ЛПНП (r=+0,44 p=0,032) Imax (r=+0,48 p=0,016) каспаза-3 (r=+0,42; p=0,032)	6-СМ (r= -0,42; p=0,034) GSH (r= -0,47; p=0,021)	ЛПНП (r=+0,37; p=0,046) ДК(r=+0,48; p=0,013) Каспаза-3 (r=+0,43; p=0,034)	Каталаза (r=-0,58; p=0,003) Инсулин (r=-0,39; p=0,043)
ГГТП	АлАт (r=+0,58; p=0,001) АсАт (r=+0,38; p=0,045) ЛПНП (r=+0,48; p=0,020)	ЛПВП (r=-0,39; p=0,041) GSH (r=-0,50; p=0,011) ГР (r=-0,45 p=0,014)	АлАт (r=+0,41; p=0,032) ОХ (r=+0,40; p=0,038) Imax(r=+0,44; p=0,034)	6-СМ (r=-0,46; p=0,021) GSH (r=-0,62; p=0,001) ГР (r=-0,45; p=0,023)

	IgG (r=+0,34; p=0,045)	Г-S-T (r=-0,49; p=0,011)		Альфа-токоферол (r=-0,59; p=0,001) Каталаза (r=-0,38; p=0,046)
ХЭ	HbA1c (r=+0,42; p=0,033)	АкГ (r=-0,34; p=0,048)	ЛПНП (r=+0,38; p=0,045) ДК (r=+0,40; p=0,039)	6-СМ (r=-0,34; p=0,047) ГР (r=-0,38; p=0,049) ГП (r=-0,32; p=0,049)
ОХ	АлАт (r=+0,50; p=0,011) I <sub>max</sub> (r=+0,41; p=0,033)	АкГ (r=-0,48 p=0,013)	ГГТП (r=+0,40; p=0,038) ЛПНП (r=+0,55; p=0,005) Каспаза-1 (r=+0,39; p=0,044)	GSH (r=-0,44; p=0,025) ГП (r=-0,50; p=0,012) Г-S-T (r=-0,35; p=0,044)
ЛПНП	АсАт (r=+0,44 p=0,032) ГГТП (r=+0,48; p=0,020) ДК (r=-0,44; p=0,028)		ХЭ (r=+0,38; p=0,045) ОХ (r=+0,55; p=0,005) АсАт (r=+0,37; p=0,046) АлАт (r=+0,46; p=0,020) ДК (r=-0,47; p=0,022)	Альфа-токоферол (r=-0,40; p=0,041)
ЛПВП		ГГТП (r=-0,39; p=0,041) I <sub>max</sub> (r=-0,32; p=0,049) GSH(r=-0,39; p=0,038)	Каталаза (r=+0,45; p=0,022) Альфа-токоферол (r=+0,39; p=0,043)	I <sub>max</sub> (r=-0,51; p=0,008)
6-МС	GSH (r=+0,51; p=0,008) СОД (r=+0,37; p=0,047)	АсАт(r=-0,42; p=0,034) HbA1c (r=-0,44; p=0,04)	Инсулин (r=+0,51; p=0,009) GSH (r=+0,53; p=0,008) ГП (r=+0,37; p=0,048) СОД (r=+0,46; p=0,019)	ГГТП (r=+0,46; p=0,021) ЦИК (r=-0,47; p=0,022) S (r=-0,53; p=0,005) ДК (r=-0,32; p=0,048)



			Альфа-токоферол (r=+0,34; p=0,047) Г-S-T(r=+0,43; p=0,035) АГ (r=+0,35; p=0,046)	Каспаза-3 (r=-0,42; p=0,038) ХЭ (r=-0,34; p=0,047) Каспаза-1(r=-0,50; p=0,010)
Инсулин		IgA (r=-0,41; p=0,037) Каспаза-3 (r=-0,55; p=0,004) HbA1c (r=-0,48; p=0,013)	6-СМ (r=+0,51; p=0,009) GSH (r=+0,47; p=0,02) Каталаза (r=+0,53; p=0,004) СОД (r=+0,51; p=0,009)	АсАт (r=-0,39; p=0,043)
HbA1c	ГР(r=+0,32; p=0,048) АлАт(r=+0,38; p=0,045) ХЭ(r=+0,42; p=0,033) S (r=+0,46; p=0,025) Каспаза-3 (r=+0,52; p=0,008)	Инсулин(r=-0,48; p=0,013) 6-СМ (r=-0,44; p=0,04) GSH (r=-0,49; p=0,010)	АлАт(r=+0,41; p=0,034) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,023) Каспаза-3 (r=+0,51; p=0,010)	GSH (r=-0,32; p=0,042) Г-S-T (r=-0,44; p=0,028) СОД(r=-0,45; p=0,023)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	IgG (r=+0,41; p=0,037) IgM (r=+0,37; p=0,041) ЦИК (r=+0,45; p=0,021) I <sub>max</sub> (r=+0,42; p=0,029)	Инсулин (r=-0,41; p=0,037)	ЦИК (r=+0,47; p=0,023) Каспаза-3 (r=+0,41; p=0,041)	АкГ (r=-0,53; p=0,007) Каталаза (r=-0,42; p=0,031)
IgM	IgA (r=+0,37; p=0,041) ЦИК (r=+0,48; p=0,014)	GSH (r=-0,50 p=0,009) α-токоферол (r=-0,37;	ДК (r=+0,42; p=0,039) IgG (r=+0,40; p=0,043)	GSH (r=-0,41; p=0,032)

	S(r=+0,35; p=0,043)	p=0,044) Каталаза (r=-0,48; p=0,013)		
IgG	ГГТП (r=+0,34; p=0,045) IgA (r=+0,41; p=0,037) ДК (r=+0,49; p=0,009)	АкГ (r=-0,39; p=0,036)	IgM (r=+0,40; p=0,043)	Г-S-T (r=-0,44; p=0,028) Альфа-токоферол (r=-0,40; p=0,045)
ЦИК	АлАт (r=+0,37; p=0,043) IgA (r=+0,45; p=0,021) IgM (r=+0,48; p=0,014) S (r=+0,42; p=0,024)	GSH (r=-0,44 p=0,026) Каталаза (r=-0,34; p=0,043)	IgA (r=+0,47; p=0,023) Iмах (r=+0,51; p=0,006) Каспаза-3 (r=+0,42; p=0,039)	Г-S-T (r=-0,39; p=0,046) 6-СМ (r=-0,47; p=0,022)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	АлАт (r=+0,57; p=0,003) HbA1c (r=+0,46; p=0,025) IgM (r=+0,35; p=0,043) ЦИК (r=+0,42; p=0,024) ДК (r=+0,62; p=0,000) ГП (r=+0,45; p=0,018) Каспаза-1 (r=+0,48; p=0,011)	GSH (r= -0,57; p=0,004)	ДК(r=+0,49; p=0,009) Каспаза-1 (r=+0,49; p=0,009)	6-СМ (r=-0,53; p=0,005) АкГ(r=-0,37; p=0,044) GSH (r=-0,48; p=0,011) ГР (r=-0,46; p=0,022)
Iмах	АсАт (r=+0,48 p=0,016) ОХ (r=+0,41; p=0,033) IgA (r=+0,42; p=0,029)	АкГ (r=-0,52; p=0,006) ЛПВП (r=-0,32; p=0,049)	АлАт (r=+0,47; p=0,019) ГГТП (r=+0,44; p=0,034) ЦИК (r=-0,51; p=0,006)	ЛПВП (r=-0,51; p=0,008) GSH (r=-0,51; p=0,009)

	ГР (r=+0,50; p=0,009) Каспаза-3 (r=+0,39; p=0,041)			
ДК	ЛПНП (r=-0,44; p=0,028) S (r=+0,62; p=0,000) IgG (r=+0,49; p=0,009) Каспаза-3 (r=+0,49; p=0,010)	СОД (r=-0,38; p=0,047) Г-S-T (r=-0,36; p=0,048)	АсАт (r=+0,48; p=0,013) ЛПНП (r=+0,47; p=0,022) S (r=+0,49; p=0,009) ХЭ (r=+0,40; p=0,039) IgM (r=+0,42; p=0,039) Каспаза-3 (r=+0,41; p=0,039)	СОД (r=-0,32; p=0,048) Каталаза (r=-0,32; p=0,049) 6-СМ (r=-0,32; p=0,048) α-токоферол (r=-0,42; p=0,032)
АкГ	Каталаза(r=+0,37; p=0,048) α-токоферол (r=+0,39; p=0,045)	ХЭ (r=-0,34; p=0,048) ДК (r=-0,52; p=0,006) ОХ (r=-0,48 p=0,013) IgG (r=-0,39; p=0,036) ГР (r=-0,41; p=0,029)	6-СМ (r=+0,35; p=0,046) ГР (r=+0,49; p=0,014)	IgA (r=-0,53; p=0,007) S (r=-0,37; p=0,044)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	6-СМ (r=+0,51; p=0,008) ГП (r=+0,56; p=0,005) Г-S-T (r=+0,56; p=0,005) α-токоферол (r=+0,31; p=0,049)	АсАт (r= -0,47; p=0,021) ГГТП (r=-0,50; p=0,011) ЛПВП (r=-0,39; p=0,038) HbA1c (r=-0,49; p=0,010) S (r= -0,57; p=0,004)	6-СМ (r=+0,53; p=0,008) Инсулин (r=+0,47; p=0,02) ГР (r=+0,50; p=0,009)	АлАт (r=-0,47; p=0,021) ГГТП (r=-0,62; p=0,001) ОХ (r=-0,44; p=0,025) HbA1c (r=-0,32; p=0,042) IgM (r=-0,41; p=0,032)

		IgM (r=-0,50; p=0,009) ЦИК (r=-0,44 p=0,026)		S (r=-0,48; p=0,011) I <sub>max</sub> (r=-0,51; p=0,009) Каспаза-3 (r=-0,52; p=0,008)
ГР	HbA1c (r=+0,32; p=0,048) I <sub>max</sub> (r=+0,50; p=0,009) ГП (r=+0,68; p=0,000) Каспаза-1 (r=+0,40; p=0,039)	ГГТП (r=-0,45 p=0,014) АГ (r=-0,41; p=0,029)	АкГ (r=+0,49; p=0,014) GSH (r=+0,50; p=0,009)	ГГТП (r=-0,45; p=0,023) ХЭ (r=-0,38; p=0,049) S (r=-0,46; p=0,022)
ГП	АсАт (r=+0,41; p=0,041) АлАт (r=+0,39; p=0,041) S (r=+0,45; p=0,018) GSH (r=+0,56; p=0,005) ГР (r=+0,68; p=0,000)	α-токоферол (r=-0,39; p=0,042)	6-СМ (r=+0,37; p=0,048) СОД (r=+0,42; p=0,037)	ХЭ (r=-0,32; p=0,049) ОХ (r=-0,50; p=0,012)
Г-S-T	GSH (r=+0,51; p=0,011)	ДК (r=-0,36; p=0,048) ГГТП (r=-0,49; p=0,011) АлАт (r=-0,41; p=0,038) Каспаза-1 (r=-0,39; p=0,049)	6-СМ (r=+0,43; p=0,035) α-токоферол (r=+0,39; p=0,045)	ОХ(r=-0,35; p=0,044) IgG (r=-0,44; p=0,028) ЦИК (r=-0,39; p=0,046) HbA1c (r=-0,44; p=0,028)
Каталаза	АкГ (r=+0,37; p=0,048)	IgM (r=-0,48; p=0,013) ЦИК (r=-0,34; p=0,043) СОД (r=-0,58; p=0,001)	ЛПВП (r=+0,45; p=0,022) Инсулин (r=+0,53; p=0,004) СОД (r=+0,49; p=0,009)	АсАт (r=-0,58; p=0,0034) ГГТП (r=-0,38; p=0,046) ДК (r=-0,32; p=0,049) IgA (r=-0,42; p=0,031)
СОД	6-СМ (r=+0,37; p=0,047)	ДК (r=-0,38; p=0,047)	6-СМ (r=-0,46; p=0,019)	ДК (r=-0,32; p=0,048)

	$\alpha$ -токоферол (r=+0,40; p=0,043) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,028)	Каталаза (r=-0,58; p=0,001)	ГП (r=+0,42; p=0,037) Каталаза (r=+0,49; p=0,009) Инсулин (r=+0,51; p=0,009)	HbA1c (r=-0,45; p=0,023)
$\alpha$ -токоферол	GSH (r=+0,31; p=0,049) СОД (r=+0,40; p=0,043) АкГ (r=+0,39; p=0,045)	ГП (r=-0,39 p=0,042) IgM (r=-0,37; p=0,044) АлАт (r=-0,33; p=0,037)	ЛПВП (r=+0,39; p=0,043) 6-СМ (r=+0,34; p=0,047) Г-S-T (r=+0,39; p=0,045)	ГГТП (r=-0,59; p=0,001) ЛПНП (r=-0,40; p=0,041) IgG (r=-0,40; p=0,045) ДК (r=-0,42; p=0,032) Каспаза-1 (r=-0,44; p=0,028)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	АлАт (r=+0,46; p=0,028) Каспаза-3 (r=+0,43; p=0,03) S (r=+0,48; p=0,011) ГР (r=+0,40; p=0,039) СОД (r=+0,46; p=0,028)	Г-S-T (r=-0,39 p=0,049)	АлАт (r=+0,36; p=0,047) ОХ (r=+0,39; p=0,044) HbA1c (r=+0,46; p=0,023) S (r=+0,49; p=0,009)	6-СМ(r=-0,50; p=0,010) $\alpha$ -токоферол (r=-0,44; p=0,028)
Каспаза-3	АсАт (r=+0,42; p=0,032) HbA1c (r=+0,52; p=0,008) I $\mu$ x (r=+0,39; p=0,041) ДК (r=+0,49; p=0,010) Каспаза-1 (r=+0,43; p=0,03)	Инсулин (r=-0,55; p=0,004)	HbA1c (r=+0,51; p=0,010) АсАт (r=+0,43; p=0,034) IgA (r=+0,41; p=0,041) ЦИК (r=+0,42; p=0,039) ДК (r=+0,41; p=0,039)	6-СМ(r=-0,42; p=0,038) GSH (r=-0,52; p=0,008)

Так, GSH, ГП, Г-S-T проявляли отрицательную связь с ОХ. Очевидно, нормализация липидного обмена была связана с положительным воздействием на функционирование глутатионовой системы после проведения комбинированного лечения с мелаксеном. Каталаза и СОД имели множественные корреляционные связи с параметрами СО и компонентами неферментативного звена АОС организма, но, следует отметить, что наиболее тесные связи были обнаружены по отношению к концентрации инсулина. Вероятно, именно эти ферменты могут участвовать в снижении степени окислительного стресса в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы и этим самым улучшать секрецию инсулина. Необходимо сказать, что такой неферментативный антиоксидант как альфа-токоферол, уровень которого существенно повышался после комбинированной терапии с мелаксеном, имел множество корреляционных связей как с параметрами липидного обмена (ЛПНП, ЛПВП) и свободнорадикального гомеостаза (ДК, Г-S-T), так и показателем степени активности апоптоза – каспазой-1. Таким образом, проведенный анализ подтверждает роль данного метаболита в функционировании АОС за счет угнетения образования липоперекисей и путем нейтрализации АФК. На липидный обмен альфа-токоферол может воздействовать через функционирование фосфолипазы А<sub>2</sub> [95], а ингибирование апоптотических процессов можно связать как с антиоксидантными свойствами, так и со способностью снижать проницаемость мембран митохондрий. В этой связи следует подчеркнуть, что именно нарушение барьерных функций внутренней и наружной митохондриальных мембран является определяющим в запрограммированной гибели клеток [410].

Корреляционный анализ апоптотических параметров выявил ряд связей: каспаза-1 (5), каспаза-3 (6). Так, каспаза-1 и каспаза-3 были ассоциированы с показателями цитолитического синдрома (АлАт, АсАт), СО биомолекул (S, ДК) и HbA<sub>1c</sub>. Вероятно, уменьшение степени развития окислительного стресса благоприятно влияло как на выраженность апоптоза, так и на метаболизм в клетках печени. Оба показателя имели корреляционную связь с уровнем

мелатонина в организме, который отражает концентрация 6-СМ. Это может объясняться тем, что мелатонин, обладая антиоксидантным действием, а также выступая в качестве протектора ДНК от повреждения АФК, защищал клеточные органеллы от окислительного стресса. С другой стороны, известно, что у экспериментальных животных с удаленным эпифизом повышается инсулинорезистентность печени и активизируется глюконеогенез [548]. Таким образом, мелатонин входящий в состав мелаксена, не только защищал гепатоциты от губительного влияния свободных радикалов, но и уменьшал выраженность апоптотических процессов, что приводило к уменьшению уровня аминотрансфераз, нормализации протекания глюконеогенеза и липогенеза, являющихся основными звеньями в развитии НАСГ у больных с СД2.

Приведенные данные свидетельствует о том, что включение препаратов, корректирующих уровень мелатонина в организме, повышает антиоксидантный потенциал, снижая выраженность окислительного стресса и апоптотических процессов, что ведет к нормализации обмена веществ, как в клетках печени, так и в организме в целом у пациентов с НАСГ, развивающимся при СД2.

## **ГЛАВА 5. ВОЗДЕЙСТВИЕ МЕЛАТОНИН-КОРРИГИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛИНИЧЕСКУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ, АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС И АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БОЛЬНЫХ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ГЕПАТИТОМ**

### **5.1. Изменения клинической картины при лекарственном гепатите и применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

До проведения терапии у больных с лекарственным поражением печени выявлялись признаки, сопровождающие, как правило, данное патологическое состояние (Таблица 31). Проведение базисного лечения приводило в определенной степени к улучшению общего состояния больных. По всей видимости, это было сопряжено с положительным воздействием применяемых гепатопротекторов на метаболические процессы в гепатоцитах, их регенерацию, и как следствие, на детоксикационный потенциал печени. Это обеспечивало улучшение самочувствия больных. Полученные в ходе нашей работы результаты согласуются с данными исследований, в соответствии с которыми применение силимарина, входящего в состав карсила, при нарушениях функции печени позволяет достичь улучшения показателей печеночного комплекса [166]. После приема гепатопротекторов болезненность в правом подреберье снижалась у 40 %, гепатомегалия – у 42,9%, спленомегалия – у 40% пациентов. По-видимому, гепатопротекторы положительно влияли на микроциркуляцию, функциональную способность клеток печени, что сопровождалось снижением степени воспалительного процесса. Силимарин препятствует тканевому воспалению, в частности, путем ингибирования миграции нейтрофилов, купферовских клеток, синтеза лейкотриенов. Что касается эссенциальных фосфолипидов, то они способны, встраиваясь в фосфолипидную структуру клеток печени, обеспечивать замещение дефектов и восстановление функции клеточных мембран. Это лежит в основе их мембраностабилизирующего и гепатопротективного



воздействия. Ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов способствуют повышению активности и текучести мембран, в результате чего уменьшается плотность фосфолипидных структур, нормализуется их проницаемость [196]. Базисная терапия ЛГ приводила к улучшению сна и психо-эмоционального состояния у 62,9% пациентов. Анализ всей совокупности клинических симптомов у больных при проведении базисного лечения с использованием карсила и эссенциальных фосфолипидов свидетельствует, что улучшение общего состояния в данном случае наблюдалось у 66,7% пациентов.

Средние значения систолического АД при поступлении пациентов 1-группы в стационар составили 134,6 мм рт. ст., диастолического АД – 88,5 мм рт. ст. После проведения базисной терапии наблюдалась тенденция к снижению среднего систолического АД до 128,6 мм рт. ст. Изменение среднего значения диастолического АД не наблюдалось, его показатель составил в среднем 87,8 мм рт. ст. Число сердечных сокращений (ЧСС) до лечения составляло в среднем 89,3 удара в минуту, после базисного лечения 81,4 удара в минуту. Очевидно, что после применения антигипертензивной терапии, включенной в базисное лечение, происходили изменения данных показателей в сторону нормы.

Таблица 31. Изменение клинических симптомов, характеризующих общее состояние пациентов с лекарственным гепатитом, после проведения базисной терапии

Клинические симптомы	1-ая группа (базисная терапия)			
	Количество больных (n=35)			
	До лечения		После лечения	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	20	57,1	6	17,1

Пожелтение кожных покровов и слизистых оболочек	15	42,9	0	0
Кожный зуд	13	37,1	2	5,7
Гепатомегалия	21	60	6	17,1
Спленомегалия	18	51,4	4	11,4
Потеря массы тела	28	80	28	80
Снижение аппетита	28	80	9	25,7
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	35	100	12	48
Нарушение психо-эмоционального состояния	28	80	6	17,1
Нарушение сна	28	80	6	17,1

Для пациентов с лекарственным гепатитом, принимавших на фоне базисной терапии эпифамин, было характерно более существенное улучшение общего состояния (Таблица 32). После проведения терапии с применением гепатопротекторов и эпифамина происходила нормализация сна и психо-эмоционального состояния у 76,9 % больных. Очевидно, что эпифамин оказывал корригирующее действие на уровень мелатонина, обладающего антидепрессивным и снотворным эффектами. При лечении с эпифамином такие симптомы, как болезненность в правом подреберье и гепатомегалия становились менее выраженными у 46,1 % и 59 % пациентов, спленомегалия - у 40,7 %. Можно отметить, что в целом положительный клинический эффект при комбинированном лечении с эпифамином наблюдался у 78,3 % больных лекарственным гепатитом, что выше, чем у пациентов, принимавших только гепатопротекторы.

Во второй группе больных лекарственным гепатитом средние значения систолического АД составляли 134,2 мм рт. ст., диастолического АД – 83,3 мм рт. ст. При проведении комбинированной терапии с эпифамином значительных отличий в изменении АД между группами больных не отмечалось. Так, после лечения с эпифамином средние значения систолического АД были 131,4 мм рт. ст., диастолического АД – 79,9 мм рт. ст. Вероятно, что изменения ЧСС могли быть связаны с влиянием мелатонина на сосудистый тонус за счет воздействия на адренергические и пептидергические окончания периваскулярных нервов, на адренергические рецепторы или вторичные мессенджеры в цепи адренергической стимуляции мышечного сокращения и стимуляцией продукции NO-синтазы клетками эндотелия сосудов с последующим увеличением продукции оксида азота и вазодилатацией [164, 350, 667].

Таблица 32. Воздействие эпифамина на общее состояние пациентов с лекарственным поражением печени на фоне базисного лечения.

Клинические симптомы	2-я группа (комбинированная терапия с эпифамином)			
	Количество больных (n=39)			
	До лечения		После лечения %	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	23	58,9	5	12,8
Пожелтение кожных покровов и слизистых оболочек	15	38,5	0	0
Кожный зуд	15	38,5	2	5,1
Гепатомегалия	28	71,8	5	12,8

Спленомегалия	11	45,8	2	5,1
Потеря массы тела	28	71,8	28	71,8
Снижение аппетита	31	79,4	3	7,7
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	39	100	7	17,9
Нарушение психо-эмоционального состояния	33	84,6	3	7,7
Нарушение сна	33	84,6	3	7,7

У больных с лекарственным гепатитом, получающих дополнительно к базисной терапии мелаксен, после окончания курса лечения наблюдалось более значительное улучшение общего состояния по сравнению с результатами, полученными в предыдущих группах (Таблица 33). Так, общая утомляемость уменьшалась у 87,1 % пациентов, что выше, чем в 1-ой группе больных. Проведение комбинированного лечения с мелаксеном приводило к нормализации сна у 80,7% пациентов. Психо-эмоциональное состояние улучшалось у 77,5 % больных. По-видимому, мелатонин, содержащийся в используемом препарате, благоприятно влиял на эти расстройства за счет антидепрессивного и снотворного эффектов [14]. Такие клинические признаки, как гепатомегалия и болезненность в правом подреберье, снижались у 74,3 % и 51,7 % больных. Спленомегалия после лечения не встречалась. Резюмируя, можно отметить, что положительный клинический эффект при комбинированном лечении с мелаксеном, проводимом при ЛГ, проявлялся у 82,3% пациентов, что выше, чем как в первой группе больных, принимавших гепатопротекторы, так и во второй группе пациентов, получавших дополнительно эпифамин.

В третьей группе больных с лекарственным поражением печени средние значения систолического АД составляли 132,5 мм рт. ст., диастолического АД – 80,6 мм рт. ст. При проведении комбинированной терапии с мелаксеном

значительных отличий в изменении АД между группами больных не отмечалось (Таблица 34). Так, после лечения с мелаксеном средние значения систолического АД были 134,1 мм рт. ст., диастолического АД – 78,6 мм рт. ст. ЧСС до лечения составляло 89,1 удара в минуту, после комбинированного лечения с мелаксеном – 72,7 удара в минуту. ЧСС до лечения составляло 88,5 удара в минуту, после базисного лечения с эпифамином – 77,3 удара в минуту. Вероятно, что изменения ЧСС могли быть связаны не только с применением антигипертензивной терапии, являющейся составной частью лечения, но и с влиянием мелатонина, уровень которого корректировался под действием эпифамина. Положительное влияние мелатонина может быть связано с тем, что он обладает тормозным эффектом на ЦНС и, по мнению некоторых авторов, способен оказывать кардиопротекторное действие [349].

Таблица 33. Динамика клинических проявлений лекарственного гепатита на фоне базисной терапии и комбинированного лечения с мелаксеном

Клинические симптомы	3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном)			
	Количество больных (n=31)			
	До лечения		После лечения %	
	Абс.	%	Абс.	%
<b>Объективные признаки</b>				
Болезненность в правом подреберье	19	61,3	3	9,6
Пожелтение кожных покровов и слизистых оболочек	12	38,7	0	0
Кожный зуд	11	35,5	1	3,2
Гепатомегалия	26	83,9	3	9,6
Спленомегалия	16	51,6	1	3,2

Потеря массы тела	19	61,3	19	61,3
Снижение аппетита	23	74,2	3	9,6
<b>Субъективные признаки</b>				
Общая утомляемость	31	100	4	12,9
Нарушение психо-эмоционального состояния	26	83,9	2	6,4
Нарушение сна	26	83,9	1	3,2

Во всех группах больных с ЛГ, возникающем на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии, при ультразвуковом исследовании (УЗИ) до проведения лечения выявлялось диффузное изменение печени, которое регистрировалось и после проведения базисного и комбинированного лечения в стационаре.

По данным электрокардиографического исследования у больных первой, второй и третьей групп отмечались патологические изменения в миокарде: гипертрофия миокарда левых отделов сердца (36,8%), нарушение проводимости по ножкам пучка Гиса (15,8%). Существенных изменений показателей электрокардиографического исследования у пациентов всех групп после проведенного лечения не наблюдалось.

Показатели общего анализа крови свидетельствовали, что при лекарственном поражении печени происходило возрастание СОЭ, а показатель содержания лейкоцитов достигал уровня верхней границы нормы (Таблица 35). После курса базисной терапии СОЭ уменьшалась на 20,5%, при оценке содержания лейкоцитов выявлялась тенденция к росту. В группе больных лекарственным гепатитом, получавших на фоне базисного лечения эпифамин, также происходило уменьшение СОЭ, но более существенно – на 38,3 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Таблица 34. Воздействие эпифамина и мелаксена на показатели артериального давления и частоту сердечных сокращений у пациентов с лекарственным поражением печени на фоне проведения базисного лечения.

Показатели	Единицы измерения	1-ая группа (базисное лечение; n=35)		2-я группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=39)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=31)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
АД (систолическое)	мм рт. ст.	137,6±4,4	128,6±3,2	136,2±4,1	131,4±3,3	136,1±4,0	130,5±3,8
АД (диастолическое)	мм рт. ст.	88,5±2,1	87,8±1,4	83,3±1,8	79,9±1,1	80,6±1,2	78,6±0,8
ЧСС	ударов в минуту (норма: 60-80)	89,3±3,1*	81,4±2,5**	88,5±2,8*	77,3±2,0**	89,1±2,7*	72,7±2,1**,#

Примечание: достоверность значений ( $p < 0,05$  (\*)) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Средний уровень лейкоцитов у больных снижался на 20 % ( $p < 0,05$ ) в сравнении с результатами, полученными до проведения терапии. В третьей группе пациентов, находящихся на комбинированной терапии с мелаксеном, происходило снижение скорости оседания эритроцитов на 48,2 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения, уровень лейкоцитов уменьшался также на 20% ( $p < 0,05$ ). Анализ результатов лабораторных исследований позволяет сделать заключение о подавлении активности воспалительного процесса, причем преимущественно у тех больных, у которых перед назначением лечения выявлялась его наибольшая выраженность. Очевидно, эти изменения сопряжены с тем, что мелатонин-корректирующие препараты обладают способностью проявлять не только антиоксидантные свойства, но и положительно воздействовать на иммунную систему. В частности, имеются данные о воздействии мелатонина на продуцирование цитокинов и интерферона [Conti A., (1994)], что может влиять на воспалительные процессы при ЛГ.

При анализе содержания альбумина и мочевины во всех группах значительных различий выявлено не было (Таблица 36). В первой группе пациентов, находящихся на базисном лечении, включающем гепатопротекторы и витаминотерапию, происходило уменьшение уровня ЛПНП и общего холестерина на 17,1 % ( $p < 0,05$ ) и 9,3 % соответственно. Из литературных данных известно, что силимарин, являющийся основным компонентом карсила, обладает положительным действием при дислипидемии [216]. Во второй группе больных после комбинированной терапии с эпифамином происходило уменьшение содержания ЛПНП на 23,3% ( $p < 0,05$ ) и холестерина на 14,3% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения.

В третьей группе больных после комбинированного лечения с мелаксеном происходило уменьшение содержания ЛПНП на 31,4% (U,  $p < 0,05$ ) и холестерина на 18,0% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. По-видимому, комбинированная терапия с мелатонин-корректирующими препаратами положительно влияла на липидный обмен.



Таблица 35. Воздействие эпифамина и мелаксена на параметры общего анализа крови у пациентов с лекарственным поражением печени на фоне базисного лечения.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (n=35)		2-ая группа (n=39)		3-я группа (n=31)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Гемоглобин	г/л	134,0±7,4	130,9±6,9	128,5±7,6	133,5±6,3	133,3±5,7	131,3±6,7	132,5±5,9
Эритроциты	×10 <sup>12</sup>	4,2±0,2	3,9 ±0,2	3,9±0,3	4,0±0,3	3,9±0,3	4,1±0,4	4,0±0,3
Лейкоциты	×10 <sup>9</sup>	4,9±0,5	7,7 ±0,8*	8,2±0,7	8,0±0,9*	6,4±0,8	7,9±0,7*	6,3±0,8**
Эозинофилы	% в 1мкл	2,4±0,9	4,1± 1,2	3,2±1,1	3,1±0,9	3,3±1,1	3,5±1,1	3,3±0,9
Лимфоциты	% в 1мкл	31,7±2,2	34,7±4,4	32,8± 2,7	29,9± 3,1	31,7± 2,1	32,6±2,3	33,8±2,0
Моноциты	% в 1мкл	6,2±1,5	6,1± 1,3	5,3±0,9	5,5±2,4	5,8±1,7	5,7±1,5	5,6±1,1
Нейтрофилы:								
Сегментоядерные	% в 1мкл	57,8±4,2	51,1± 4,4	48,6± 2,7	52,9± 5,6	53,2± 5,2	55,8±4,3	53,2±5,1
Палочкоядерные	% в 1мкл	5,1±0,2	5,1 ±1,7	5,9±1,5	6,4±2,1	4,7±1,4	5,5±1,9	5,2±0,8
Скорость оседания эритроцитов	мм/ч	6,7±1,8	15,6± 4,9*	12,3± 4,4	15,9± 4,8*	9,2±3,2*	16,1±4,3*	8,3±2,8**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Таблица 36. Биохимические показатели крови пациентов контрольной группы, при лекарственном гепатите после базисного лечения и при комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа (n=65)	1-ая группа (базисное лечение; n=35)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=39)		2-ая группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=31)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Глюкоза	ммоль/л	4,8±0,8	4,8±0,3	4,7±0,2	4,8±0,5	4,5±0,8	4,6±0,6	4,4±0,4
Альбумин	г/л	35-50	41,7±2,1	42,7± 1,7	40,3±1,9	41,2±2,3	41,1±1,8	40,9±2,1
Мочевина	ммоль/л	2,5-8,3	5,2± 0,9	3,9± 0,3	5,4±0,4	4,0±0,2	5,0±0,3	3,9±0,2
ЛПНП	ммоль/л	1,7-4,5	4,1± 0,2	3,4± 0,2**	4,3±0,3	3,3±0,3**	4,4±0,4	3,0±0,1**,#
Холестерин	ммоль/л	4,1±0,2	4,4±0,4	3,9±0,1	4,9±0,2*	4,2±0,3**	4,8±0,4*	3,9±0,1**,#
АлАт	нмоль(с.л.)	189±9,3	334,7±17,6*	151,8±15,2**	437,7±18,7*	185,5±14,9**	321,2±18,2*	111,4±16,8**,#
АсАт	нмоль(с.л.)	125±8,6	185,6±9,6*	109,9±10,3**	207,6±8,1*	108,5±10,2**	209,5±15,4*	96,1±19,1**,#
ГГТП	мкат/л	0,88±0,1	2,52±0,3*	1,33±0,1**	2,58±0,4*	1,23±0,1**	2,54±0,3*	1,16±0,1**,#
Щелочная фосфатаза	ЕД/л	<270	113±9,7	111±7,7	119±10,2	111±7,4	117±9,5	108±7,0
ХЭ	мкат/л	77,6±6,8 (76-230)	58,0±2,2*	69,7±3,7**	58,6±2,0*	77,9±4,1**,#	58,3±2,4*	81,2±3,9**,#
Общий билирубин	мкмоль/л	9,6±2,7 (8,5-20,5)	13,1±3,2	8,4±2,8	17,3±2,9	9,4±3,2	13,9±3,1	8,3±2,9
Тимоловая проба	Ед.	0-4	4,3±0,5*	3,3±0,2**	4,6±0,3*	3,2±0,4**	4,2±0,4*	2,3±0,3**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Известно, что мелатонин уменьшает содержание липопротеидов низкой плотности и вызывает снижение индекса атерогенности, а также ингибирует действие оксида азота, занимающего ведущее место в патогенезе атеросклероза [451]. Функциональное состояние печени у пациентов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп до проведения терапии характеризовалось увеличением ферментативной активности АлАт в 1,8, 2,3 и 1,7 ( $p < 0,05$ ) раз соответственно по сравнению с верхней границей нормы (189 нмоль(с.л.)). Для уровня АсАт также было характерно увеличение: в первой группе – в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза, во второй – в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), в третьей – в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с верхней границей нормы (125 нмоль(с.л.)). Данные биохимические показатели подтверждают, что при противотуберкулезной полихимиотерапии у пациентов происходило повреждение гепатоцитов и нарушение метаболических процессов в печени, что сопровождалось выходом в кровь трансаминаз в результате цитолиза клеток. После базисного лечения происходило уменьшение активности АлАт и АсАт в 2,2 ( $p < 0,05$ ) и 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. Во 2-ой группе больных, находящихся на комбинированной терапии с эпифамином, происходило уменьшение активности АлАт и АсАт в 2,3 ( $p < 0,05$ ) и 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно. После комбинированной терапии с мелаксеном, происходило уменьшение уровня АлАт и АсАт в среднем в 2,9 и 2,1 ( $U, p < 0,05$ ) раз соответственно (Таблица 36). Тимоловая проба у больных обеих групп перед лечением была выше верхней границы нормы в среднем на 10% (норма 0-4 ед.). После проведения базисного лечения в 1-ой группе пациентов происходило уменьшение данного показателя на 23% ( $p < 0,05$ ), во 2-ой группе больных, находящихся на комбинированном лечении с эпифамином – на 31% ( $p < 0,05$ ), в 3-ей группе больных, получающих дополнительно к гепатопротекторам мелаксен – на 36% ( $U, p < 0,05$ ). Таким образом, включение в базисную терапию мелатонин-корректирующих препаратов усиливало гепатопротекторное действие, по-видимому, за счет антиоксидантного эффекта мелатонина.

О нарушении функционирования печени у больных лекарственным гепатитом свидетельствовало и возрастание в сыворотке крови активности ГГТП, мониторинг которой обычно используется для выявления гепатотоксического действия препаратов и своевременного изменения лечебного курса. Это определяется тем, что ряд наркотиков и лекарственных препаратов (нестероидные противовоспалительные препараты, диклофенак, парацетамол, барбитураты и др.) индуцирует активность ГГТП в печени. Согласно полученным нами результатам, активность ГГТП была повышена у больных с ЛГ, развивающимся при противотуберкулезной полихимиотерапии, в среднем в 2,9 раза ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем (значение активности в контрольной группе – 0,8817 мкат/л). После проведения базисного лечения активность фермента снижалась в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза. Комбинированная терапия с применением эпифамина и мелаксена приводила к снижению активности ГГТП в 2,1 и 2,2 ( $U, p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению со значениями, полученными до лечения. Таким образом, данные, отражающие изменения активности ГГТП согласуются с изменениями активностей трансаминаз в сыворотке крови и свидетельствуют о более значительной эффективности лечения при применении мелатонин-корректирующих препаратов.

У пациентов с лекарственным гепатитом также были выявлены изменения активности ХЭ после проведения, как базисного лечения, так и комбинированной терапии с мелаксеном или эпифамином. Как известно, сывороточная ХЭ выполняет в организме защитные функции, играя роль детоксиканта. Так, например, ХЭ способна осуществлять гидролиз многих отравляющих фосфорорганических веществ и карбаматов, поступивших в организм извне. Имеются сведения об изменениях активности ХЭ в крови при ряде заболеваний человека [111]. Активность ХЭ снижается, в частности, при воспалительных процессах в печени, отравлении некоторыми инсектицидами и пестицидами (фосфорорганическими соединениями и карбаматами), применяемыми в сельском хозяйстве; грибами, мышьяком, миорелаксантами. Во многих случаях низкая

активность ХЭ в сыворотке крови обусловлена снижением синтезирующей функции печени. Согласно полученным нами данным, активность ХЭ у пациентов с лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии, была снижена относительно нижнего предела нормы (референтные значения: 76-230 мкат/л) в среднем на 23,3% ( $p < 0,05$ ). После проведения базисного лечения ферментативная активность возрастала на 20,2% ( $p < 0,05$ ), практически достигая нижнего значения референтного интервала. После комбинированной терапии с эпифамином активность ХЭ увеличивалась в среднем на 32,9% (U,  $p < 0,05$ ), с мелаксеном – на 39,3% (U,  $p < 0,05$ ), т.е. становилась в пределах нормы. Восстановление активности фермента свидетельствует о нормализации функции печени, оцениваемой по активности ХЭ.

Таким образом, комбинированное лечение пациентов с ЛГ, включающее мелатонин-корректирующие препараты, оказывало положительное воздействие на общее состояние больных, показатели общего, биохимического анализов крови, печеночные пробы, характеризующие активность воспалительного процесса и синтезирующую функцию печени, степень выраженности цитолитического повреждения гепатоцитов. Вероятно, за счет своей антиоксидантной активности мелатонин, уровень которого корректируется под действием эпифамина и мелаксена, усиливал гепатопротекторное и антиокислительное действие базисной терапии. При применении мелатонин-корректирующих препаратов на фоне базисного лечения ЛГ побочных эффектов выявлено не было.

## **5.2. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на содержание на содержание 6-сульфатоксимелатонина в организме больных с лекарственным гепатитом**

Как известно, метаболизация мелатонина, циркулирующего в крови, осуществляется, главным образом, в печени в ходе двухэтапного процесса. Вначале, в первой реакции, мелатонин подвергается 6-гидроксилированию, затем протекает реакция конъюгации с участием сульфата или глюкуронида. 6-

сульфатоксимелатонин (6-гидроксимелатонинсульфат) и 6-гидроксимелатонинглиукуронид экскретируются с мочой. У человека основным метаболитом, образующимся при биотрансформации мелатонина, является 6-сульфатоксимелатонин. Считают, что профиль экскреции 6-сульфатоксимелатонина в плазме крови и моче отражает количественные и качественные аспекты секреции мелатонина. Это часто используют для анализа ритма эндогенного мелатонина и исследования его фармакокинетических свойств [305]. Было показано, что при инъекции или пероральном введении мелатонина его содержание в крови быстро возрастает, но затем почти сразу снижается в связи с поглощением его тканями [596].

С помощью иммуноферментного анализа нами было осуществлено определение содержания 6-сульфатоксимелатонина в моче больных лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии. Установлено, что при патологии уровень мелатонина был снижен в среднем в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунок 37).

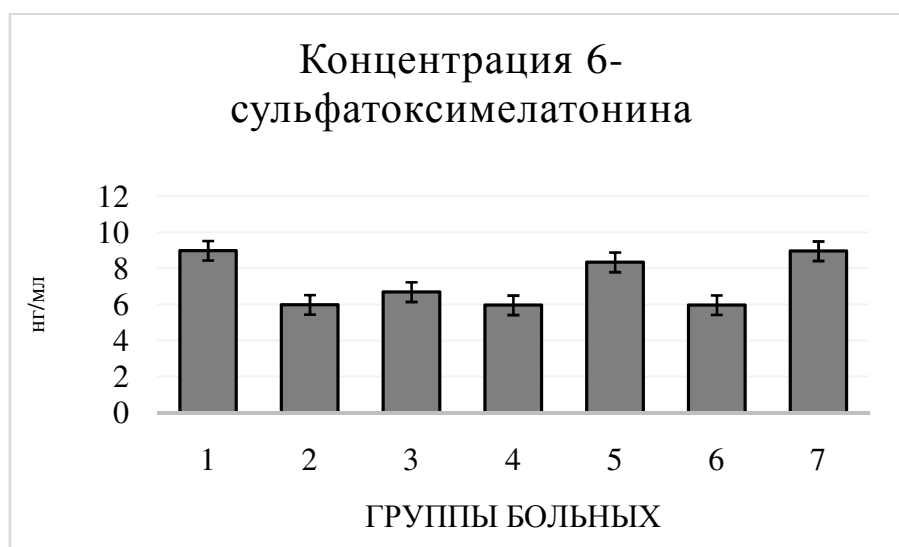


Рисунок 37. Содержание 6-сульфатоксимелатонина в моче пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Возможно, это могло быть сопряжено с интенсивным участием мелатонина в реакциях нейтрализации АФК, сопровождающихся образованием различных производных мелатонина. Убедительно доказана способность мелатонина выполнять роль скавенджера в отношении  $\text{OH}^\bullet$  [504, 528]. Молекула мелатонина способна поглощать два  $\text{OH}^\bullet$ -радикала с образованием в качестве продукта реакции циклического 3-гидроксимелатонина. Проведение базисного лечения сопровождалось лишь тенденцией к повышению содержания мелатонина – на 11,7%. По-видимому, это было взаимосвязано с положительным воздействием проводимой базисной терапии и некоторым снижением уровня свободных радикалов в организме больных вследствие реализации гепатопротекторных свойств применяемых препаратов.

Следует отметить, что имеется значительное число публикаций, свидетельствующих о наличии антиоксидантных свойств у мелатонина [475, 598]. Однако в последние годы появились работы, в которых отмечается, что в связи с низким уровнем гормона его вклад в антиоксидантную защиту может быть незначительным [180]. В этой связи использование мелатонин-корректирующих препаратов может способствовать повышению содержания мелатонина в организме и, как следствие, усилению антиоксидантной защиты организма. Включение эпифамина в лечение сопровождалось возрастанием уровня 6-сульфатоксимелатонина у пациентов с лекарственным гепатитом в среднем в 1,4 ( $U, p < 0,05$ ) раза по сравнению со значением, полученным до лечения. Следует отметить, что при этом содержание данного метаболита мелатонина приближалось к величине соответствующего показателя в контрольной группе. При приеме мелаксена происходило возрастание содержания 6-сульфатоксимелатонина в 1,5 ( $U, p < 0,05$ ) раза, что позволяло достичь уровня нормы.

Таким образом, применение комбинированной терапии с использованием мелатонин-корректирующих препаратов, по-видимому, обеспечивало

значительное возрастание антиоксидантного потенциала в организме в больных за счет повышения уровня эндогенного мелатонина.

### **5.3. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на иммунологические показатели у больных лекарственным гепатитом**

Имеются литературные данные о двойственном влиянии мелатонина на функцию иммунной системы [233, 331]. Мелатонин может и угнетать, и стимулировать иммунную систему. Так, при повторном введении низких доз гормона животным значительно уменьшается степень нарушения продукции антител, снижения массы тимуса и противовирусной резистентности, сопутствующих длительному истощающему стрессу. Эпифизэктомия, напротив, способствует усилению иммунологического дефицита при стрессорном воздействии. Вместе с тем, в условиях исходной гиперактивности иммунной системы мелатонин может тормозить образование ряда цитокинов в ответ на введение фитогемагглютина, снижать функцию активированных макрофагов и Т-хелперов. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о наличии у гормона иммуномодулирующей активности. Из этого следует, что мелатонин может использоваться как для комплексной терапии иммунодефицитных состояний, так и для коррекции повышенной иммунной реактивности [161].

В ходе наших исследований осуществлен анализ воздействия мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина и мелаксена, на некоторые показатели иммунного статуса в крови больных лекарственным гепатитом, развивающимся вследствие противотуберкулезной терапии. Выявленные изменения уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и иммуноглобулинов (Ig) – IgA, IgM, IgG, представлены в Таблице 37. Как известно, уровень ЦИК в крови может служить как показатель развития различных воспалительных процессов в организме, а также как параметр активности течения аутоиммунных заболеваний.



Таблица 37. Изменения содержания сывороточных иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов у пациентов с лекарственным гепатитом при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксенном.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	1-ая группа (базисное лечение; n=35)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=39)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксенном; n=31)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Ig A	г/л	2,88±0,12	4,84±0,19*	4,58±0,12 **	4,83±0,21*	3,94±0,11**,#	4,84±0,14*	3,79±0,13**,#
Ig M	г/л	1,81±0,05	2,26±0,09*	2,13±0,07 **	2,27±0,06*	2,09±0,05 **	2,26±0,10*	2,05±0,03 **
Ig G	г/л	14,08±0,52	20,92±0,54*	17,66±0,25 **	20,91±0,59*	17,11±0,23 **	20,93±0,50*	16,62±0,21**,#
ЦИК	усл. ед.	72,3±2,61	355,3±11,4*	202,4±9,1 **	359,5±13,3*	115,7±6,5 **,#	352,1±12,7*	94,0±3,1 **,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

ЦИК, образуемые в кровяном русле в ответ на введение чужеродного агента (антигена), представляют собой комплексы, состоящие из антител, антигена и компонентов комплемента. Образование ЦИК лежит в основе физиологического механизма защиты организма, приводящего к быстрому удалению эндогенных и экзогенных антигенов через ретикуло-эндотелиальную систему. Образующиеся иммунные комплексы в норме захватываются фагоцитами и разрушаются ими. Метаболизм ЦИК протекает также и в печени. Далее происходит их удаление из организма. Вследствие избыточного накопления ЦИК, последующей активации комплемента и лизосомальных ферментов в различных тканях происходят воспалительные процессы, сопровождающиеся поражением органов. Нами выявлено существенное возрастание содержания ЦИК в крови больных лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии (в среднем в 4,9 ( $p < 0,05$ ) раза). После проведения лечения происходило снижение данного показателя. Причем, комбинированная терапия, включающая мелатонин-корректирующие препараты, способствовала более существенному изменению содержания ЦИК в направлении нормы. Так, после базисного лечения уровень ЦИК снижался на 43% ( $p < 0,05$ ), после комбинированной терапии, включающей эпифамин – на 68% (U,  $p < 0,05$ ), после терапии с использованием мелаксена – на 73,4% (U,  $p < 0,05$ ). Однако, во всех случаях содержание ЦИК оставалось повышенным – в 2,8 ( $p < 0,05$ ), в 1,6 ( $p < 0,05$ ) и 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно, по сравнению с контрольным уровнем (0,56 мг/мл). Подобные тенденции были выявлены и для изменений уровня иммуноглобулинов при патологии и после применения различных способов лечения. Так, содержание IgA, возрастающее в патологическом состоянии в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой, снижалось после базисного лечения на 5,5%, после комбинированной терапии с эпифамином – на 18,5% (U,  $p < 0,05$ ), после приема мелаксена на фоне базисного лечения – на 21,7% (U,  $p < 0,05$ ). Содержание IgM, повышающееся в условиях патологии в среднем в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза, имело тенденцию к уменьшению после базисного лечения на 5,8%;

после терапии с эпифамином – на 8,0%; после терапии с мелаксеном – на 9,4%. Уровень IgG, возрастающий при патологии в среднем в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза, снижался после базисной терапии на 15,5% ( $p < 0,05$ ), после комбинированного лечения с эпифамином – на 18,2% ( $p < 0,05$ ); после приема мелаксена – на 20,6% ( $U, p < 0,05$ ).

Полученные данные соотносятся с представлениями о возможном участии мелатонина в регуляции функций иммунной системы организма человека [161, 331]. Результаты проведенных исследований и имеющиеся литературные данные позволяют считать мелатонин универсальным эндогенным адаптером, способным участвовать в поддержании баланса иммунного статуса организма на определенном уровне.

#### **5.4. Влияние мелатонин-корректирующих препаратов на интенсивность свободнорадикальных процессов у пациентов с лекарственным поражением печени**

##### **5.4.1. Воздействие мелаксена и эпифамина на параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови больных с лекарственным поражением печени при применении на фоне базисной терапии**

Химиопрепараты, применяющиеся при лечении туберкулеза, могут оказывать значительный гепатотоксический эффект. Образующиеся в результате их метаболизма гепатотоксины оказывают прямое повреждающее действие на клетки печени посредством чрезмерной генерации АФК, которые оказывают детергентный эффект на нуклеиновые кислоты, липиды и белки, включая ферменты. Гепатотоксины образуются за счет стимуляции микросомальной цитохром Р-450 – оксигеназной системы, обеспечивающей метаболизм лекарств. Ранее нами было показано, что повышение содержания АФК при экспериментальном токсическом гепатите влечет преобладание процессов СО над активностью АОС организма [201, 213].

Результаты, полученные в ходе настоящей работы, включающие оценку интенсивности свободнорадикальных процессов в значительно большей выборке больных и более длительном назначении терапии, убедительно свидетельствуют, что развивающееся при приеме противотуберкулезных препаратов лекарственное поражение печени сопровождается значительной интенсификацией СО биомолекул, ведущей к окислительному стрессу. Так, в сыворотке крови больных первой группы перед применением гепатопротекторов такие параметры БХЛ, как S и I<sub>max</sub>, характеризующие интенсивность СО, были повышены в 2,5 (p<0,05) и 1,9 (p<0,05) раза по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе. Такой показатель как tgα<sub>2</sub>, отражающий степень функционирования АОС организма, был понижен в 1,4 (p<0,05) раза по сравнению с контролем, что указывало на снижение антиоксидантного потенциала в организме пациентов (Таблица 38). После проведения базисного лечения наблюдалось уменьшение S в 1,5 раза и I<sub>max</sub> в 1,3 (p<0,05) раза. Параметр tgα<sub>2</sub> увеличивался в среднем на 13% (p<0,05) по сравнению с данными, полученными до лечения. Полученные результаты указывают на снижение степени оксидативного стресса, сопряженное с возрастанием активности АОС, при проведении базисного лечения. По-видимому, это связано с антиокислительным эффектом силимарина и эссенциальных фосфолипидов, входящих в состав используемых гепатопротекторов [307, 552, 612].

В сыворотке крови пациентов 2-ой группы перед лечением показатели БХЛ характеризовались подобными значениями, свидетельствующими о развитии оксидативного стресса. После комбинированной терапии с эпифамином наблюдалось снижение S и I<sub>max</sub> в среднем в 1,6 (U, p<0,05) раза. Параметр tgα<sub>2</sub> возрастал в среднем на 18% (p<0,05) по сравнению с данными, полученными до лечения. Приведенные результаты исследования свидетельствуют, что на фоне приема эпифамина имело место более значительное снижение интенсивности СО и возрастание активности АОС организма, чем у больных, получавших базисное лечение.

Таблица 38. Изменения показателей биохемилюминесценции у больных с ЛГ при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели БХЛ	Контрольная группа	Группы больных					
		1-ая группа (базисное лечение; n=35)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=39)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=31)	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
S	279,9±11,4	712,0±30,2*	488,5±19,3**	711,7±29,4*	441,2±10,1**,#	713,1±32,1*	442,1±18,6**,#
Imax	47,1±1,2	88,5±1,8*	70,6±1,4**	88,3±1,5*	58,1±1,2**,#	88,6±1,7*	55,4±1,5**,#
tga2	32,9±1,5	23,6±1,1*	27,1±1,0**	23,4±0,9*	28,5±1,1**	23,4±1,1*	34,6±0,8**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

По-видимому, под действием эпифамина происходила коррекция содержания мелатонина, сопровождающаяся улучшением антиоксидантного статуса. Известно, что возрастание уровня мелатонина способствует эффективному торможению действия АФК. Он беспрепятственно проникает в клетки и защищает нуклеиновые кислоты, липиды и белки от повреждения свободными радикалами [4, 600]. В третьей группе больных перед проведением лечения параметры БХЛ также имели подобные значения в сравнении с первой и второй группами больных. Как показали наши исследования, после комбинированной терапии с мелаксеном параметры S и I<sub>max</sub> уменьшались в 1,6 и 1,7 (U, p<0,05) раза соответственно, по сравнению с результатами, полученными до лечения. Величина tgα<sub>2</sub> увеличивалась на 33% (U, p<0,05), что выше показателей в первой и второй группах. По-видимому, мелатонин, входящий в состав данного препарата, оказывал положительное действие на свободнорадикальный гомеостаз, что и приводило к более выраженному повышению активности АОС. Таким образом, из результатов проведенного исследования следует, что включение в базисное лечение мелатонин-корректирующих препаратов благоприятно влияло на параметры биохемилюминесценции, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов и антиоксидантный потенциал организма больных лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной терапии. Таким образом, из результатов проведенного исследования следует, что включение в традиционное лечение мелатонин-корректирующих препаратов благоприятно влияло на параметры БХЛ, отражающие интенсивность свободнорадикальных процессов и антиоксидантный потенциал организма больных лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной терапии. Таким образом, из результатов проведенного исследования следует, что включение в традиционное лечение мелатонин-корректирующих препаратов благоприятно влияло на параметры биохемилюминесценции, отражающие интенсивность свободнорадикальных

процессов и антиоксидантный потенциал организма больных лекарственным гепатитом, развивающимся на фоне противотуберкулезной терапии.

Более выраженный антирадикальный эффект мелаксена по сравнению с эпифамином может быть связан с тем, что экзогенный мелатонин, входящий в состав данного препарата, быстрее включался в метаболизм, усиливал антиоксидантный потенциал организма и нейтрализовал АФК. Что касается коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина, то, очевидно, этот процесс требует определенного времени для воздействия на эпителио-эпифизарную область.

#### **5.4.2. Влияние эпифамина и мелаксена на содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови больных лекарственным гепатитом**

В сыворотке крови больных ЛГ всех групп до лечения наблюдалось повышение содержания ДК, являющихся первичными продуктами пероксидного окисления липидов, в среднем в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению со значением в норме (Рисунок 38). Это свидетельствовало об интенсификации свободнорадикального окисления биосубстратов. После проведения базисного лечения в первой группе пациентов наблюдалось снижение содержания ДК в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с показателем до лечения. Очевидно, назначение гепатопротекторов положительно влияло на свободнорадикальный гомеостаз за счет антиокислительного действия применяемых препаратов. Известно, что силимарин обладает антиоксидантным эффектом, который обусловлен наличием фенольной структуры в молекуле, благодаря чему он способен взаимодействовать с активными формами кислорода в печени, превращая их в менее агрессивные соединения. Кроме того, данный препарат активизирует собственные системы защиты тканей от продуктов пероксидного окисления липидов, что способствует предотвращению разрушения клеточных структур [557]. Экзогенные эссенциальные фосфолипиды активизируют расположенные в мембране фосфолипидзависимые ферменты. Это, в свою очередь, оказывает

поддерживающее воздействие на обменные процессы в клетках печени, повышая ее детоксикационный и экскреторный потенциал [107].

Во второй группе пациентов после проведения комбинированной терапии с эпифамином содержание ДК уменьшалось в 1,5 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до лечения. Это подтверждает, что корректирующее действие эпифамина на секрецию мелатонина, благоприятно влияло на активность АОС организма.

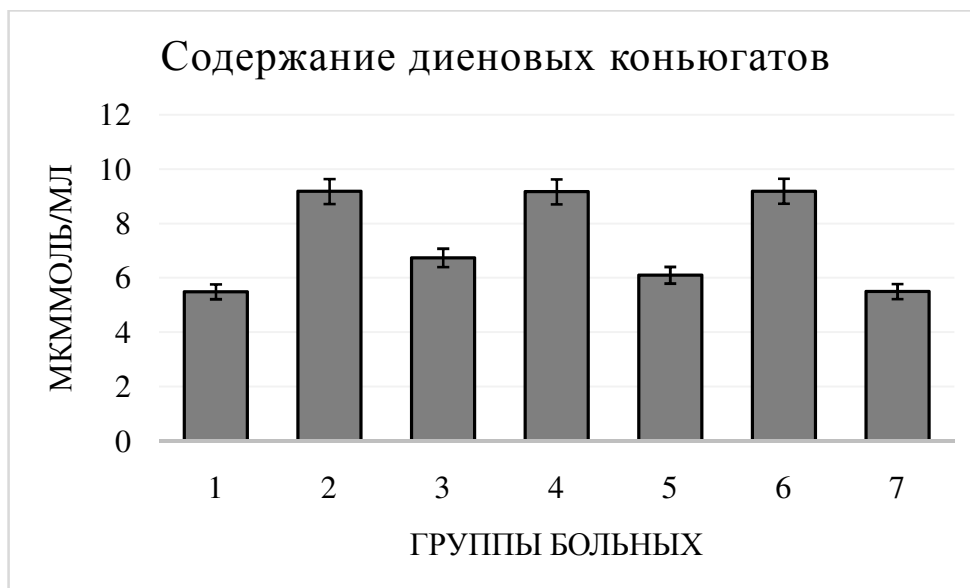


Рисунок 38. Концентрация диеновых конъюгатов в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

В третьей группе пациентов, находящихся на комбинированной терапии с мелаксеном, содержание ДК уменьшалось в еще большей степени, чем в предыдущих группах – в 1,7 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза, что свидетельствовало о значительном антиоксидантном эффекте мелатонина, входящего в состав данного препарата. Антирадикальная активность мелатонина, очевидно, сопряжена с его способностью растворяться в воде и липидах, проникать через мембраны и сосудисто-тканевые барьеры, накапливаясь в ядрах клеток, что обеспечивает его участие в защите мембранных структур и ДНК от свободнорадикального



повреждения. Данный метаболит также обладает способностью нейтрализовывать АФК: гидроксильный радикал, радикал оксида азота. Сочетание этих механизмов, по-видимому, обеспечивает выраженный антиоксидантный эффект мелатонина [511, 598].

Таким образом, комбинированная терапия с мелатонин-корректирующими препаратами положительно влияла на оксидативный статус организма, что проявлялось в снижении интенсивности пероксидного окисления липидов, оцениваемой по содержанию диеновых конъюгатов.

#### **5.4.3. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность аконитатгидратазы в сыворотке крови больных с лекарственным поражением печени**

В ходе исследования выявлено, что у пациентов с ЛГ первой группы активность АкГ, выраженная в Е на мл сыворотки крови, была ниже в среднем в 1,8 ( $p < 0,01$ ) раза по сравнению со значением в контрольной группе. Удельная ферментативная активность снижалась в 2,6 ( $p < 0,01$ ) раза (Рисунки 39, 40). Торможение активности АкГ было, по всей видимости, сопряжено с биотрансформацией лекарственных препаратов, используемых в ходе противотуберкулезной терапии, и индуцированием цитохром-Р-450 содержащих систем в микросомах печени, что сопровождалось усилением генерации АФК [381]. Оксидативный стресс приводит к разрушению железо-серных кластеров АкГ, вследствие чего происходит инактивация фермента. Полученные результаты соответствуют предположениям, что АкГ является чувствительной мишенью действия свободных радикалов [619]. Следует отметить, что падение активности АкГ было обнаружено нами также в тканях животных при экспериментальном токсическом гепатите [189].

После лечения путем проведения базисной терапии, включающей прием гепатопротекторов, активность АкГ, выраженная в Е на мл сыворотки крови, повышалась на 10%, удельная активность фермента увеличивалась на 7%.

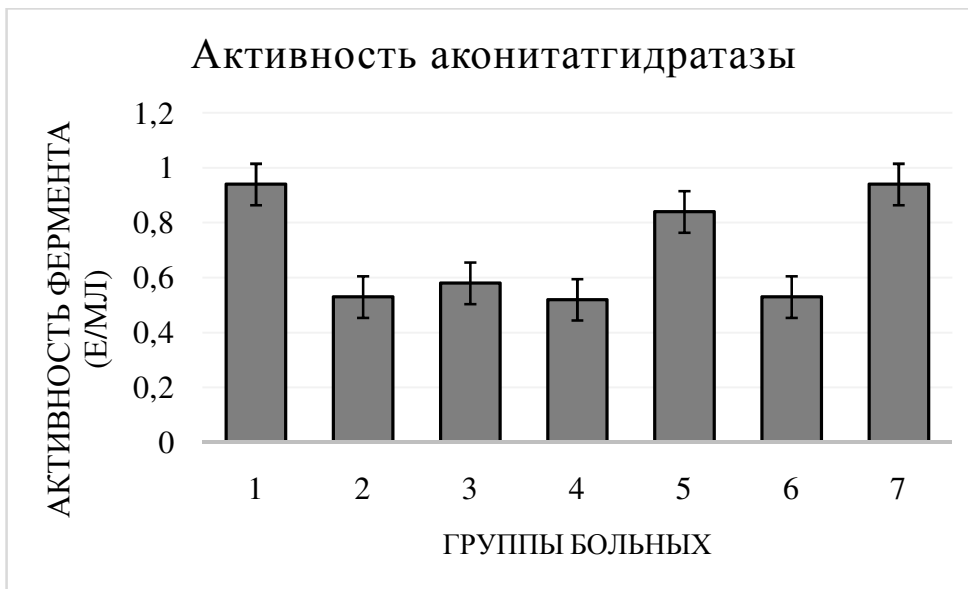


Рисунок 39. Активность аспартатгидратазы (E/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

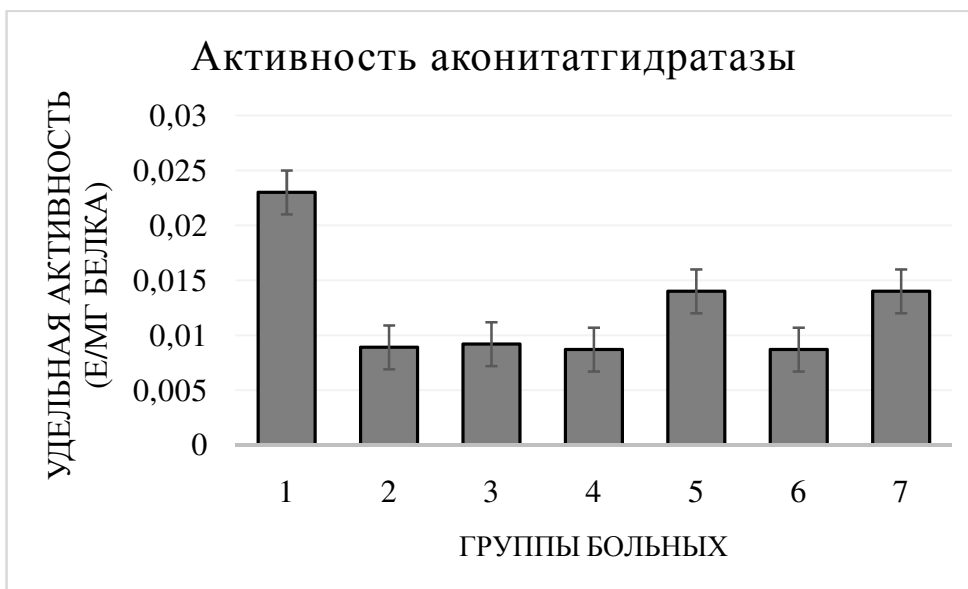


Рисунок 40. Удельная активность аспартатгидратазы (E/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Возрастание ферментативной активности могло быть связано с положительным воздействием проводимой терапии на метаболизм гепатоцитов.

Активность АкГ, выраженная в Е на мл сыворотки, во 2-ой группе пациентов с ЛГ до проведения терапии была снижена в среднем в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза. Удельная ферментативная активность падала в 2,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению со значением в норме. После комбинированной терапии с эпифамином активность АкГ, выраженная как в Е на мл сыворотки крови, так и в виде удельной активности, у пациентов с ЛГ возрастала в среднем в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с соответствующими значениями, полученными до проведения лечения. Очевидно, прием эпифамина, способствуя коррекции содержания мелатонина, обеспечивал повышение антиоксидантного потенциала организма, что приводило к защите молекулы фермента от губительного действия АФК.

В 3-ей группе пациентов до проведения лечения наблюдалась такая же тенденция к снижению активности АкГ. После проведения комбинированной терапии, включающей мелаксен, активность фермента, выраженная в Е на мл сыворотки, повышалась в 1,8 (U,  $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность – в 1,6 (U,  $p < 0,05$ ) раза. По-видимому, это взаимосвязано с положительным эффектом мелатонина, входящего в состав данного препарата и обеспечивающего снижение активности свободнорадикальных процессов и, как следствие, защиту молекулы АкГ от действия АФК. Следует отметить, что при экспериментальном токсическом поражении под действием экзогенного мелатонина также наблюдалось стабилизация активности АкГ [189].

Таким образом, под действием комбинированного лечения с мелатонинкорректирующими препаратами при лекарственном поражении печени происходит изменение активности аконитатгидратазы в сторону нормы, что, очевидно, связано с антиоксидантным эффектом мелатонина, уровень которого нормализуется под действие эпифамина и мелаксена.

## **5.5. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на антиоксидантный статус у пациентов с лекарственным гепатитом**

### **5.5.1. Действие мелатонин-корректирующих препаратов на активность глутатионовой антиоксидантной системы при лекарственном гепатите**

В нейтрализации процессов свободнорадикального окисления одно из важнейших мест в АОС принадлежит глутатионовой системе. Восстановленный глутатион и связанные с его превращениями ферменты – ГР и ГП выполняют важную роль в защите организма от активных кислородных метаболитов. Данная ферментативная система обеспечивает детоксикацию  $H_2O_2$  и гидроперекисей с помощью GSH за счет реакции, катализируемой ГП. Действие ГП сопряжено с функционированием ГР, катализирующей реакцию восстановления окисленной формы глутатиона за счет NADPH, что приводит к регенерации уровня GSH. Глутатионовая система включает также Г-S-T, предохраняющие ДНК, митохондрии и другие жизненно важные компоненты клетки от токсикантов и таким образом значительно повышающие резистентность организма в целом [633].

Представленные в Таблице 39 результаты свидетельствуют о дефиците GSH у пациентов с лекарственным гепатитом, индуцированным приемом противотуберкулезных препаратов. Уровень GSH снижался в 2,0 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольной группой. Низкий уровень GSH, очевидно, был взаимосвязан с его усиленным расходом при интенсификации свободнорадикального окисления в патологическом состоянии. Повышенная активность ферментов системы цитохрома P450 в печени при лекарственном гепатите сопровождается резким увеличением выработки токсичных соединений, в том числе АФК. Убедительно доказано, что GSH, проявляя антиоксидантную активность, способен эффективно связывать АФК [184]. Восстановленный глутатион играет ключевую роль в системе тиоловых антиоксидантов. Он способен обеспечивать антиоксидантную защиту, как непосредственно

инактивируя свободные радикалы, так и опосредованно, участвуя в качестве необходимого компонента в реакциях, катализируемых рядом антиоксидантных ферментов [192].

После базисной терапии происходило возрастание уровня GSH у пациентов с ЛГ в среднем в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению со значением до назначения лечения, т.е. под влиянием применяемых гепатопротекторов содержание GSH изменялось в направлении нормы. По-видимому, это было сопряжено с снижением активности СО биомолекул под действием данных препаратов и, как следствие, уменьшением расходования GSH в результате положительного эффекта проводимой терапии.

Во второй группе пациентов до проведения лечения уровень GSH в сыворотке крови был в среднем в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с показателем в контрольной группе. Комбинированная терапия с эпифамином приводила к возрастанию содержания данного тиола в среднем в 1,8 раза (U,  $p < 0,05$ ).

В третьей группе пациентов уровень GSH в сыворотке крови был также в среднем в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) ниже по сравнению с нормой. После приема мелаксена на фоне базисной терапии содержание данного метаболита возрастало в 2,0 раза, (U,  $p < 0,05$ ), практически достигая уровня контроля.

Более существенное возрастание уровня GSH при включении в лечение мелатонин-корректирующих препаратов, по всей видимости, связано с синергичным влиянием мелатонина, уровень которого повышается под действием данных препаратов, по отношению к GSH. Следует отметить, что возрастание концентрации данного тиола коррелировало с изменениями содержания 6-сульфатоксимелатонина, являющегося основным продуктом превращения мелатонина в организме человека и выступающего в качестве объективного критерия уровня данного гормона [305]. Имеются сведения, указывающие на то, что мелатонин способствует восстановлению окисленной формы глутатиона [587].

Таблица 39. Изменения показателей глутатионовой системы у больных с лекарственным гепатитом при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа	Группы больных					
			1-ая группа (базисное лечение; n=35)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=39)		3-я группа (комбинированная терапия с мелаксеном; n=31)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
GSH	мМоль/л	0,873±0,036	0,447±0,012*	0,690±0,016**	0,438±0,010*	0,811±0,015**,#	0,440±0,014*	0,858±0,021**,#
ГП	Е/мл	0,123±0,008	0,157±0,009*	0,195±0,007**	0,164±0,008*	0,285±0,008**,#	0,168±0,011*	0,354±0,009**,#
ГП	Е/мг белка	0,002±0,0001	0,0022±0,0001*	0,0026±0,0001**	0,0021±0,0001*	0,0028±0,0001**,#	0,0022±0,0001*	0,0031±0,0002**,#
ГР	Е/мл	0,067±0,003	0,150±0,005*	0,166±0,004**	0,146±0,007*	0,191±0,005**,#	0,142±0,004*	0,263±0,003**,#
ГР	Е/мг белка	0,0015±0,0001	0,0021±0,0001*	0,0022±0,0001**	0,0020±0,0001*	0,0027±0,0001**,#	0,0021±0,0001*	0,0030±0,0002**,#
GST	Е/мл	0,174±0,006	0,108±0,004*	0,160±0,002**	0,106±0,003*	0,180±0,004**,#	0,109±0,005*	0,193±0,006**,#
GST	Е/мг белка	0,00099±0,00001	0,00079±0,0001*	0,0011±0,0002**	0,00082±0,0001*	0,0013±0,0001**	0,00080±0,0001*	0,0014±0,0001**,#

Примечание: достоверность значений (p) < 0,05 (\*) - по сравнению с нормой, (\*\*) – достоверность внутригрупповых различий, # - достоверность по сравнению с базисным лечением.

Согласно литературным данным, скорость редокс-циклирования глутатиона, то есть NADPH-специфичного восстановления GSSG в реакции, катализируемой ГР, намного превосходит возможности синтеза GSH в тканях [138]. Это находится в соответствии с результатами проведенных нами исследований, свидетельствующих о более существенном увеличении активности ГР при приеме мелатонин-корректирующих препаратов по сравнению с базисной терапией.

Ферментативные активности ГР и ГП, представленные в виде Е на мл сыворотки, в 1-ой группе пациентов с ЛГ до назначения лечения были выше в среднем в 2,2 ( $p < 0,05$ ) и 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению со значениями в норме. Удельные ферментативные активности возрастали в 1,3 ( $p < 0,05$ ) и 1,1 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с контрольным уровнем. По-видимому, активация ГП-ГР системы происходила в ответ на чрезмерную генерацию активных форм кислорода и развивающийся при лекарственном гепатите оксидативный стресс. После проведения базисной терапии у больных с ЛГ активности ГР и ГП, выраженные в Е на мл, возрастали в среднем в 1,1 и 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до назначения гепатопротекторов. Удельные активности данных ферментов увеличивались на 5,3 % и 18,5 % соответственно. Результаты, полученные в настоящей работе при анализе показателей, убедительно свидетельствуют о существенных модификациях активности ГП и ГР при лекарственном гепатите. По-видимому, увеличение активности ГП-ГР системы было сопряжено с положительным действием гепатопротекторов на антиоксидантный статус больных.

Во второй и в третьей группах пациентов с ЛГ до лечения для активностей ГП и ГР, выраженных в Е на мл сыворотки, были характерны те же изменения, что и в первой группе больных. После комбинированного лечения с эпифамином активности ГП и ГР, представленные в виде Е на мл сыворотки крови, возрастали в 1,7 и 1,3 ( $U, p < 0,05$ ) раза, при этом удельные ферментативные активности увеличивались в среднем в 1,3 ( $U, p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующими

данными, полученными до лечения. Терапия с мелаксеном приводила к усилению активации данных ферментов, происходило возрастание активности ГП и ГР, рассчитанной в Е на мл сыворотки, в 2,1 и 1,8 ( $U, p < 0,05$ ) раза, и удельной активности – в 1,4 и 1,5 ( $U, p < 0,05$ ) раз, соответственно. Таким образом, в третьей группе больных наблюдалось наибольшее повышение активности ГП-ГР системы.

Полученные результаты указывают, что лечение с применением мелатонин-корректирующих препаратов приводило к возрастанию активности ГП -ГР системы в более значительной степени, чем базисное лечение. Полученные результаты находятся в соответствии с предположениями о том, что антиоксидантная активность мелатонина, уровень которого корректируется под влиянием эпифамина и мелаксена, может проявляться путем активации и индуцирования синтеза антиоксидантных ферментов [335]. Следует отметить, что возрастание показателей активности ГП-ГР системы, очевидно, могло отражаться на величине такого параметра БХЛ, как  $\text{tg}\alpha_2$ , характеризующего общий антиоксидантный потенциал организма, увеличение которого при действии мелатонин-корректирующих препаратов было нами отмечено выше.

Активность Г-S-T, выраженная в Е на мл сыворотки, в 1-ой группе пациентов с ЛГ до назначения лечения гепатопротекторами уменьшалась в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольным уровнем. Удельная активность фермента уменьшалась в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с нормой. Очевидно, снижение активности Г-S-T происходило в результате больших затрат восстановленного глутатиона в ответ на избыточное образование АФК при развитии лекарственного гепатита. В частности, по-видимому, существенно возрастало потребление GSH ГП-ГР системой, активность которой увеличивалась в связи с необходимостью антиоксидантной защиты клеточных и тканевых структур от оксидативного повреждения под действием АФК. После проведения базисной терапии, включающей прием гепатопротекторов, активность фермента, выраженная в Е на мл сыворотки, возрастала в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с показателями до лечения. При этом удельная активность повышалась в 1,4



( $p < 0,05$ ) раза. Вероятно, возрастание активности Г-S-T было сопряжено с положительным действием гепатопротекторов на антиоксидантный статус больных, что могло сопровождаться возрастанием клеточного фонда GSH, позволяющим Г-S-T участвовать в защитных механизмах, непосредственно нейтрализующих возникающие при метаболизме лекарств токсины.

Во второй и третьей группах пациентов с ЛГ до проведения лечения активность Г-S-T, рассчитанная в виде Е на мл сыворотки, а также удельная ферментативная активность изменялись в тех же пределах, что и в 1-ой группе больных. После комбинированной терапии с эпифамином активность Г-S-T, представленная в виде Е на мл сыворотки, возрастала в 1,7 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза; удельная ферментативная активность – в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза, по сравнению с соответствующими значениями, полученными до лечения. Комбинированная терапия, включающая прием мелаксена, приводила к возрастанию активности Г-S-T, представленной в виде Е на мл, в 1,8 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза, а удельной ферментативной активности – в 1,7 ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) раза, по сравнению с показателями до лечения. Таким образом, комбинированное лечение с мелатонин-корректирующими препаратами обеспечивало возрастание активности Г-S-T в большей степени, чем в 1-ой группе пациентов. Эти данные согласуются с результатами, отражающими увеличение содержания GSH, обеспечиваемое, в частности, благодаря возрастающей активности ГР, при приеме мелатонин-корректирующих препаратов. В этом случае GSH – необходимый субстрат Г-S-T, мог действовать как акцептор токсинов в ходе реакций, катализируемых ферментом. По-видимому, определенный уровень GSH необходим для роста Г-S-T активности, что, в свою очередь, может быть следствием индукции фермента при оксидативном стрессе.

#### **5.5.2. Активность NADPH-генерирующих ферментов в сыворотке крови пациентов с лекарственным поражением печени при проведении базисной терапии и комбинированном лечении с эпифамином и мелаксеном**

Активность глутатионовой АОС и регенерация GSH при оксидативном стрессе требуют постоянного притока восстановительных эквивалентов в форме NADPH, образование которого может происходить в реакциях, катализируемых Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. Однако при лекарственном поражении печени в крови больных во всех группах активность Г6ФДГ, представленная в виде Е на мл сыворотки крови, была понижена в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) раза, а удельная активность – в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза, по сравнению с результатами до лечения. Г6ФДГ выступает в качестве основного поставщика NADPH для регенерации восстановленного глутатиона с помощью ГР, и, в этой связи, следует подчеркнуть, что наблюдается соответствие между уменьшением активности данного фермента, низким уровнем GSH и падением Г-S-T активности в патологическом состоянии. Согласно имеющимся данным, при гепатите может происходить торможение глюконеогенеза и усиление гликолиза в печени, чем и объясняется накопление лактата и пирувата в крови [247]. По-видимому, в этих условиях снижение активности ключевого фермента пентозофосфатного пути (ПФП) – Г6ФДГ, может быть сопряжено с торможением интенсивности данного метаболического процесса. Очевидно, это связано с перераспределением глюкозо-6-фосфата между гликолизом и ПФП. Вместе с тем, в сыворотке крови пациентов с лекарственным поражением печени активность НАДФ-ИДГ, выраженная в Е на мл, снижалась в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза, удельная активность фермента – в 1,1 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контрольной группой. В этой связи следует отметить, что имеются сведения о подавлении активности ферментов окислительного метаболизма, происходящем при интоксикациях, гипо- и авитаминозах, гипоксических состояниях, обусловленных различными нарушениями кровообращения и тканевого дыхания [247]. Снижение скорости реакции, катализируемой НАДФ-ИДГ, являющейся альтернативным источником NADPH для регенерации GSH, также согласуется со снижением уровня данного тиола в патологическом состоянии. Снижение активности NADPH-генерирующих ферментов, по-видимому, могло негативно сказываться на функционировании глутатионовой

антиоксидантной системы, нуждающейся в поставке NADPH. В условиях развития оксидативного стресса в организме больных и связанной с этим необходимостью мобилизации ГР-ГП- системы недостаток генерирования NADPH вследствие торможения активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ мог являться фактором, лимитирующим стимуляцию ГР-активности. Это могло служить одной из основных причин снижения уровня GSH при лекарственном гепатите. Уменьшение содержания данного тиола, очевидно, было связано с его значительным расходом в процессах детоксикации АФК, с одной стороны, и недостаточным образованием в ходе ГР-реакции из-за недостатка NADPH, - с другой.

После базисного лечения активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, возрастала на 25,3% ( $p < 0,05$ ), а НАДФ-ИДГ – на 10,6% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями, полученными до лечения. Наблюдался также подъем удельной активности Г6ФДГ – в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза. Удельная активность НАДФ-ИДГ увеличивалась менее существенно – в 1,1 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунки 41, 42, 43, 44). Возрастание активности ферментов, очевидно, было сопряжено с положительным воздействием проводимой терапии на метаболизм гепатоцитов. Это, по-видимому, могло способствовать, в определенной степени, и повышению активности ферментов глутатионовой АОС, наблюдающегося после приема гепатопротекторов. При проведении комбинированной терапии с эпифамином активность Г6ФДГ, выраженная в Е на мл сыворотки, повышалась в среднем в 1,5 ( $U, p < 0,05$ ) раза, при этом активность НАДФ-ИДГ возрастала в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с соответствующими значениями до проведения лечения. Удельная ферментативная активность также увеличивалась: Г6ФДГ – на 36,1% ( $p < 0,05$ ), НАДФ-ИДГ – на 16,4% ( $p < 0,05$ ).

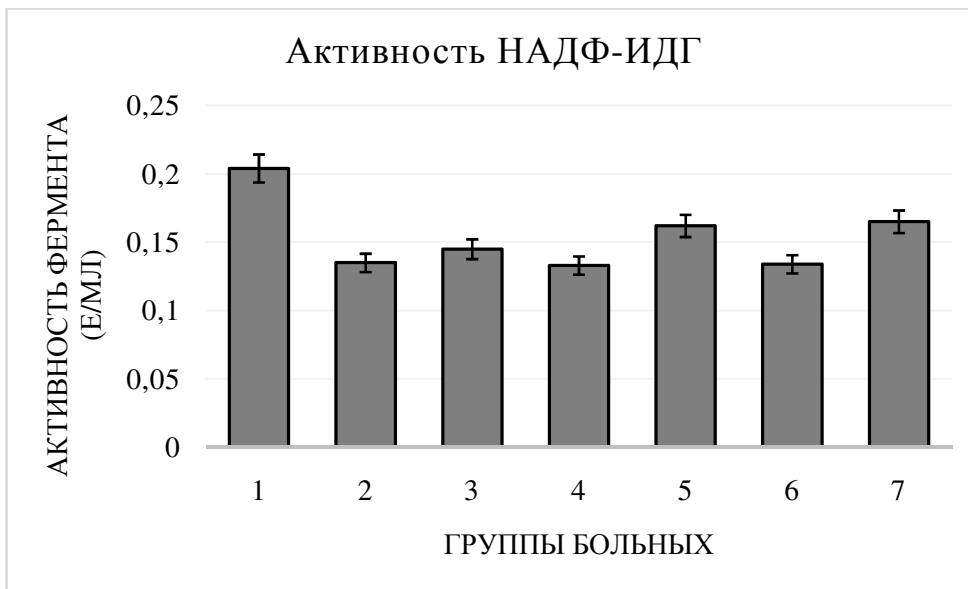


Рисунок 41. Активность НАДФ-ИДГ (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

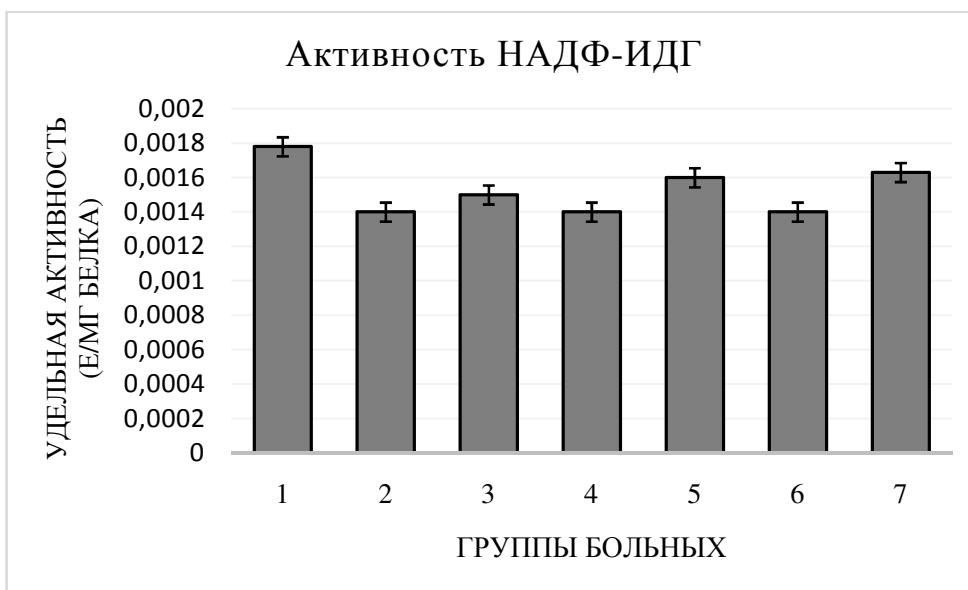


Рисунок 42. Удельная активность НАДФ-ИДГ (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

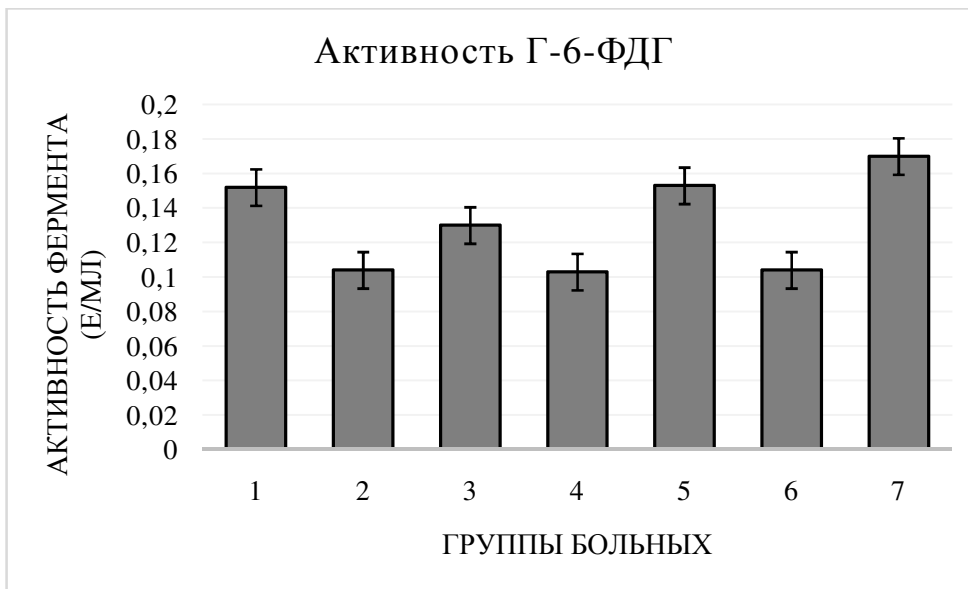


Рисунок 43. Активность ГбФДГ (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

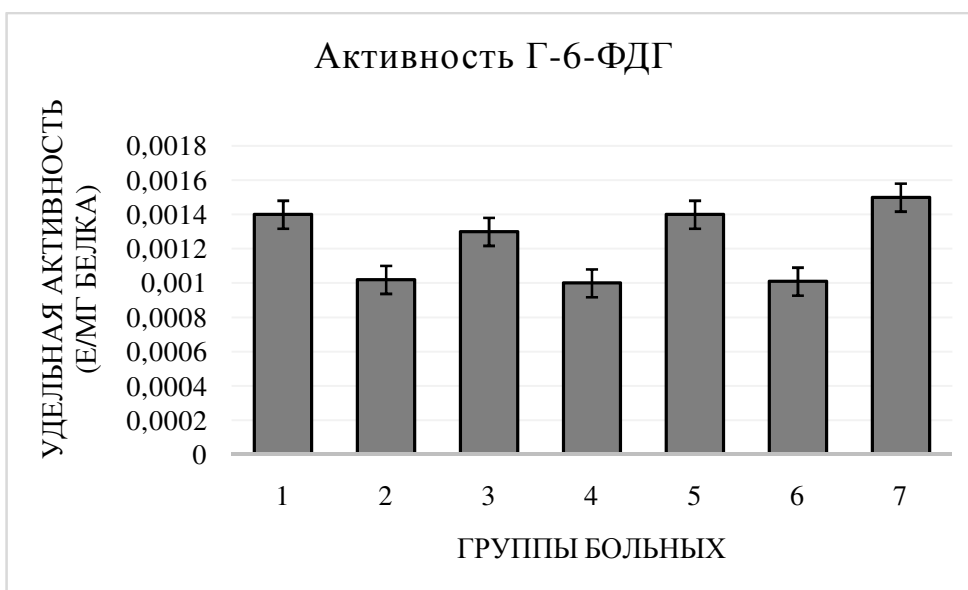


Рисунок 44. Удельная активность ГбФДГ (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Таким образом, корригирующее действие эпифамина на секрецию и содержание мелатонина в организме больных лекарственным гепатитом, по-видимому, способствовало снижению степени развития оксидативного стресса в организме и, как следствие, улучшению состояния окислительного метаболизма.

Терапия с применением мелаксена обеспечивала еще более существенное повышение активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. Так, активность Г6ФДГ, выраженная в виде Е на мл сыворотки, повышалась в 1,7 (U,  $p < 0,05$ ) раза, удельная активность возрастала в 1,5 (U,  $p < 0,05$ ) раза по сравнению с данными, полученными до назначения лечения. Активность НАДФ-ИДГ, представленная как Е на мл сыворотки, увеличивалась на 19,6% ( $p < 0,05$ ), удельная ферментативная активность – на 17% (U,  $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. Вероятно, мелатонин, входящий в состав данного препарата, выступает в роли эффективного адаптогена, способного оказывать регуляторное воздействие на свободнорадикальный гомеостаз и нормализующее влияние на окислительный метаболизм, что сопровождается возрастанием активностей NADPH-продуцирующих ферментов.

По всей видимости, более существенное возрастание активностей NADPH-генерирующих ферментов при проведении комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном по сравнению со стандартным лечением могло способствовать более значительному повышению активностей ГР, ГП, Г-S-T, а также содержания восстановленного глутатиона, происходящему в этом случае, и как следствие улучшению эффективности функционирования глутатионовой АОС. Таким образом, как следует из результатов проведенного исследования, включение в базисную терапию эпифамина и мелаксена благоприятно влияло на антиоксидантную систему организма больных. Более выраженный антиокислительный эффект мелаксена по сравнению с эпифамином, может быть связан с тем, что экзогенный мелатонин, входящий в состав данного препарата, быстрее включается в метаболизм, усиливая антиоксидантный потенциал

организма. Что касается коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина, очевидно, этот процесс требует определенного времени.

### **5.5.3. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в сыворотке крови больных с лекарственным гепатитом, при применении препаратов, корригирующих уровень мелатонина**

При лекарственном гепатите активность СОД, выраженная в Е/мл сыворотки крови, во всех группах больных увеличивалась в среднем в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению со значением в контрольной группе. Удельная ферментативная активность возрастала в среднем в 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунки 45, 46). Повышение активности СОД при окислительном стрессе может происходить за счет отщепления ингибиторных фрагментов от молекулы и ее конформационных изменений. По всей видимости, увеличение активности СОД может играть адаптивную роль при усиленной генерации АФК, так как реакция, катализируемая данным ферментом, обеспечивает превращение  $O_2^{\cdot -}$  в менее реакционноспособный  $H_2O_2$ . После проведения курса базисного лечения достоверных изменений активности СОД, представленной как в Е/мл сыворотки, так и в виде удельной ферментативной активности, не было выявлено.

При комбинированной терапии с эпифамином у больных 2-ой группы происходило возрастание активности СОД, выраженной в Е/мл сыворотки крови, на 20,0% (U,  $p < 0,05$ ), удельной активности – на 16,5 % (U,  $p < 0,05$ ). По-видимому, мелатонин, уровень которого корригируется под влиянием эпифамина, способен оказывать действие на функционирование ферментов антиоксидантной защиты путем активации и/или стимуляции их синтеза [596].

Применение комбинированной терапии с мелаксеном сопровождалось также возрастанием активности СОД, рассчитанной в Е на мл, и удельной активностей в сыворотке крови пациентов с ЛГ на 22,0% (U,  $p < 0,05$ ) и 18,0% (U,  $p < 0,05$ ) по сравнению с соответствующими значениями до проведения лечения, что, очевидно, было сопряжено с воздействием на ферментативную

активность мелатонина, содержащегося в исследуемом препарате. Вместе с тем, следует отметить, что данный гормон способен эффективно связывать свободные радикалы, включая  $O_2^{\cdot-}$ , который является для СОД индуцирующим фактором. Это, по-видимому, могло отражаться на активности фермента, приводя к ее торможению. Таким образом, можно предполагать, что полученные данные являются суммарным результатом воздействия на активность СОД нескольких факторов, которые могли, с одной стороны способствовать повышению активности фермента, с другой, напротив, ее снижению за счет уменьшения концентрации субстрата, выступающего в роли индуктора ферментативной активности.

У пациентов 1-ой, 2-ой и 3-ей групп до назначения лечения активность каталазы, представленная в виде в Е на мл сыворотки крови, была в среднем выше в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нормой. При определении удельной активности фермента наблюдалось ее повышение на 11,3% (Рисунки 47, 48). По-видимому, возрастание активности каталазы было сопряжено с необходимостью нейтрализации  $H_2O_2$ , чрезмерно генерируемого при оксидативном стрессе, развивающимся при патологии. После курса базисной терапии было выявлено уменьшение активности каталазы, представленной в Е на мл сыворотки и в виде удельной ферментативной активности, в среднем на 10,0% по сравнению с показателями, полученными до проведения лечения. Возможно, это было связано с чрезмерным образованием АФК на фоне исследуемой патологии и истощением АОС организма.

После комбинированного лечения с эпифамином наблюдалось увеличение каталазной активности, рассчитанной в Е на мл сыворотки, в среднем в 1,2 раза ( $U$ ,  $p < 0,05$ ), и удельной ферментативной активности – на 15,9% ( $U$ ,  $p < 0,05$ ), по сравнению с результатами до лечения. Очевидно, это было сопряжено с коррекцией уровня мелатонина под действием эпифамина.



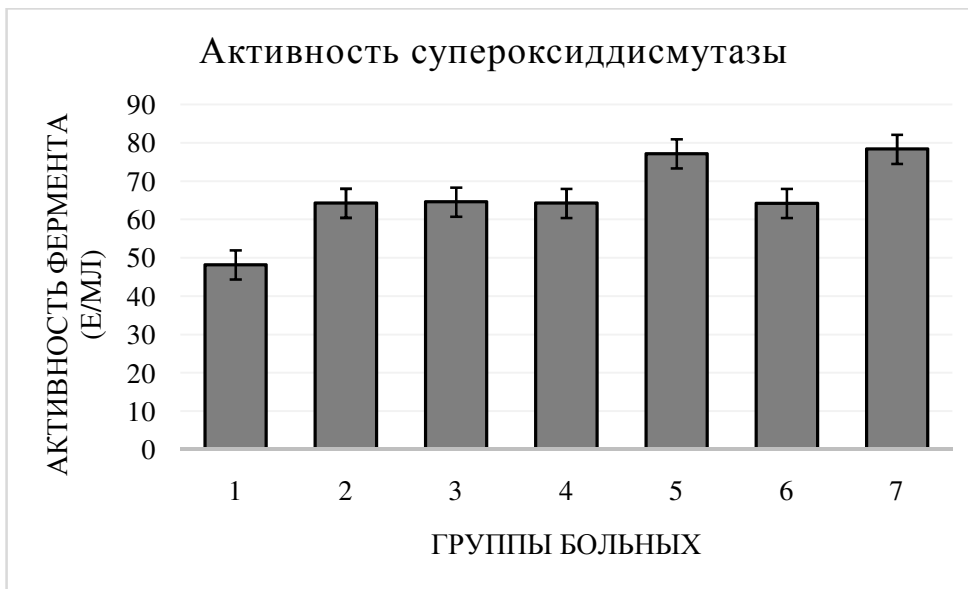


Рисунок 45. Активность СОД (Е/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

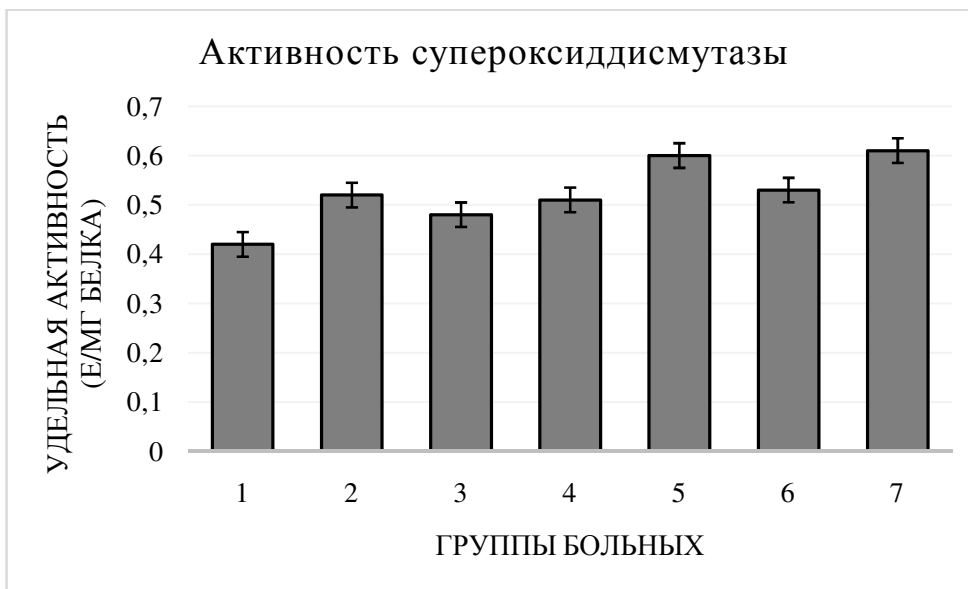


Рисунок 46. Удельная активность СОД (Е/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

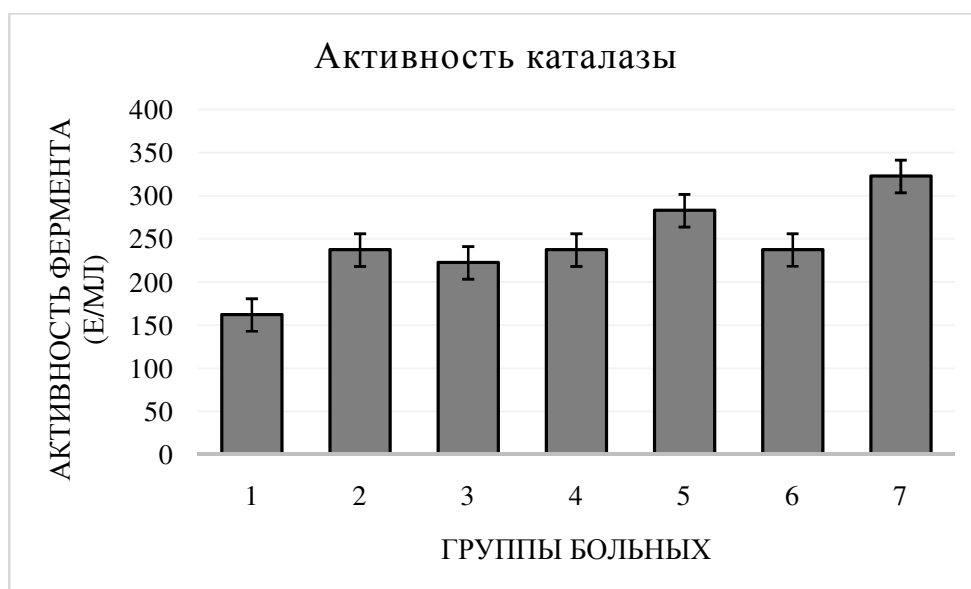


Рисунок 47. Активность каталазы (E/мл) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

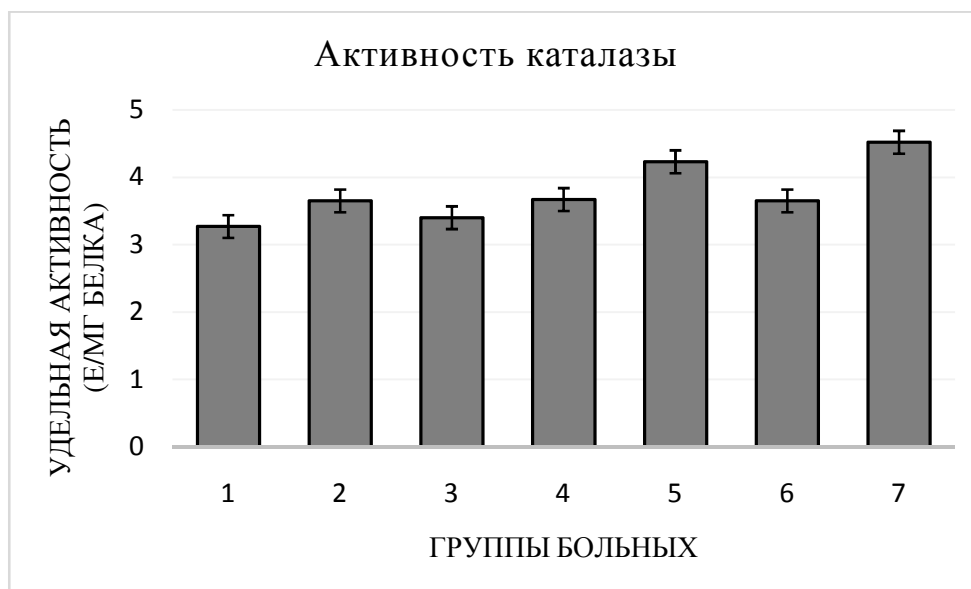


Рисунок 48. Удельная активность каталазы (E/мг белка) в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

Согласно имеющимся литературным данным, мелатонин способен обеспечивать защиту молекулы каталазы при оксидативном стрессе, в частности, индуцированном пероксильным радикалом [613]. Вероятно, эпифамин, защищая каталазу от модификации под действием активных кислородных метаболитов, способствовал повышению активности фермента, что положительно влияло на антиоксидантный потенциал и интенсивность СО биомолекул при лекарственном поражении печени.

В третьей группе пациентов после комбинированного лечения с мелаксеном каталазная активность, рассчитанная в виде Е на мл сыворотки, возрастала в 1,4 раза (U,  $p < 0,05$ ) по сравнению с результатами до лечения. Удельная ферментативная активность увеличивалась на 23,9% (U,  $p < 0,05$ ). Вероятно, мелатонин, содержащийся в препарате мелаксена, активно вступал в метаболические процессы, эффективно защищал молекулу каталазы и способствовал нормализации свободнорадикального гомеостаза при лекарственном поражении печени.

Как следует из результатов проведенного исследования, включение в базисную терапию эпифамина и мелаксена благоприятно влияло на активность каталазы и СОД, являющихся одними из основных компонентов ферментативного звена АОС организма. Более выраженный эффект мелаксена по сравнению с эпифамином, может быть связан с тем, что экзогенный мелатонин, входящий в состав данного препарата, быстрее включался в метаболизм и усиливал антиоксидантный потенциал организма, нейтрализуя АФК. Что касается коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина, очевидно, этот процесс требует определенного времени для воздействия через эпителиально-эпифизарную область.

#### **5.5.4. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на содержание цитрата и $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови больных с лекарственным гепатитом**

При ЛГ, развивающимся при противотуберкулезной полихимиотерапии, содержание цитрата в сыворотке крови пациентов первой группы было повышено в среднем в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольным уровнем (Рисунок 49). Это в целом согласуется с данными, полученными нами при экспериментальном гепатите. Очевидно, повышение уровня цитрата было в значительной степени взаимосвязано с нарушением структуры молекулы АсГ под действием АФК. Вместе с тем, известно, что увеличение уровня цитрата, способствует повышению антиоксидантного потенциала организма [201]. Проведение базисного лечения приводило к снижению содержания цитрата в среднем в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению со значением, полученным до лечения. Очевидно, гепатопротекторы способствовали уменьшению степени развития окислительного стресса, что оказывало благоприятное воздействие на метаболические превращения цитрата.

У пациентов с ЛГ во второй группе наблюдалось также повышенное содержание цитрата, в среднем в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), по сравнению с нормой. Комбинированное лечение с эпифамином приводило к более существенному уменьшению уровня цитрата, чем при базисной терапии. Концентрация цитрата в этом случае снижалась в 1,7 раза ( $U, p < 0,05$ ) по сравнению с показателем до лечения. Включение эпифамина в базисную терапию, по-видимому, способствовало уменьшению степени свободнорадикального окисления и как следствие, повышению активности АсГ и изменению содержания цитрата в направлении контроля. В третьей группе пациентов перед лечением концентрация цитрата была также повышена, как и в предыдущих группах. После проведения комбинированной терапии с мелаксеном содержание цитрата уменьшалось в среднем в 1,8 раза ( $U, p < 0,05$ ). Вероятно, более выраженное снижение концентрации цитрата было связано с достаточно быстро реализуемым антиоксидантным эффектом мелатонина, входящего в состав данного препарата. Мелатонин связывал свободные радикалы, этим самым защищая молекулу АсГ от их губительного действия, в результате этого происходило повышение активности данного фермента, сопровождающееся снижением уровня цитрата.

По-видимому, благодаря протекторному действию мелаксена происходило значительное снижение степени разрушающего влияния АФК на активный центр АкГ, содержащий железо-серный кластер – чувствительную мишень действия свободных радикалов [426, 539]. Таким образом, применение комбинированного лечения с применением мелатонин-корректирующих препаратов приводило к нормализации содержания цитрата в организме больных. Поскольку данный метаболит является интермедиатом ряда центральных метаболических путей, то приближение его концентрации к норме, может служить показателем коррекции нарушений ряда обменных процессов, что, очевидно, благоприятно влияет на состояние пациентов в целом.

$\alpha$ -Токоферол является одним из важнейших неферментативных антиоксидантов. Он локализован преимущественно в гидрофобном слое биологических мембран, инактивирует главным образом радикалы жирных кислот. Недостаток витамина Е способствует деструкции мембран. Кроме того, витамин Е – мощный антимуtagen. В физиологических концентрациях он является регулятором тканевого дыхания [6].

Содержание  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови больных лекарственным гепатитом первой, второй и третьей групп снижалось в среднем в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) в сравнении с показателем в норме, что, очевидно, было сопряжено с уменьшением антиоксидантного потенциала организма из-за чрезмерного образования АФК (Рисунок 50). По всей видимости, снижение уровня  $\alpha$ -токоферола было сопряжено с повышенным расходом его восстановленной формы в процессах детоксикации активных кислородных метаболитов. После курса базисной терапии уровень  $\alpha$ -токоферола возрастал в среднем в 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению со значением до лечения, что, очевидно, было взаимосвязано с положительным действием проводимого лечения на метаболические процессы в организме.

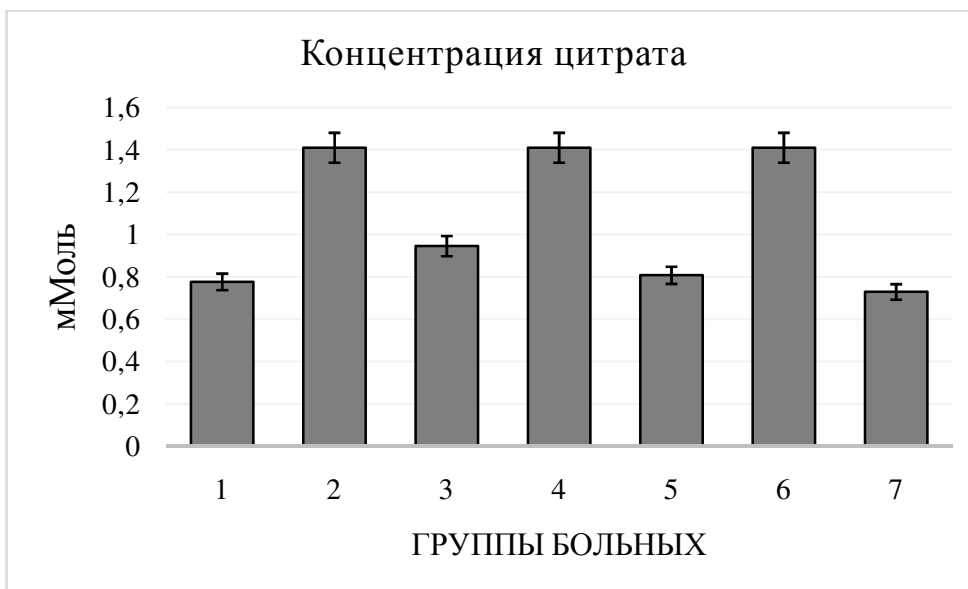


Рисунок 49. Концентрация цитрата в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

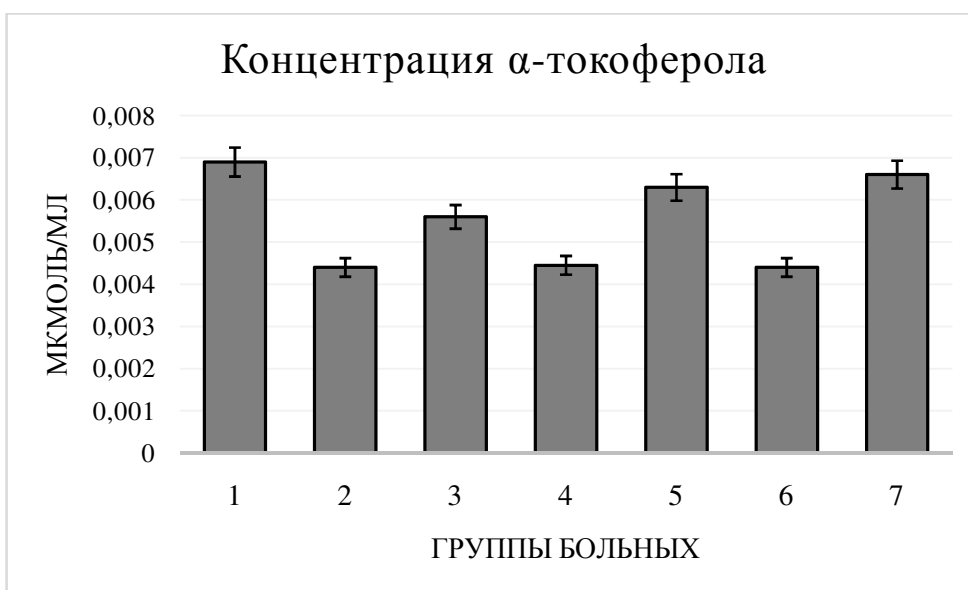


Рисунок 50. Концентрация альфа-токоферола в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с НАСГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

По-видимому, гепатопротекторы снижали степень выраженности оксидативного стресса благодаря своему антирадикальному действию. Известно, что силимарин, входящий в состав карсила, обладает антиоксидантным эффектом, который обусловлен наличием фенольной структуры в молекуле, благодаря чему он способен взаимодействовать с АФК в печени, превращая их в менее агрессивные соединения [375]. Экзогенные эссенциальные фосфолипиды активируют, расположенные в мембране фосфолипидзависимые ферменты, что оказывает благоприятное воздействие на обменные процессы в клетках печени, повышая ее детоксикационный и экскреторный потенциал. Это приводит к снижению интенсивности процессов пероксидного окисления липидов и образования АФК.

Во второй группе пациентов, находящихся на комбинированном лечении с эпифамином, концентрация  $\alpha$ -токоферола увеличивалась в 1,4 раза ( $U$ ,  $p < 0,05$ ). Увеличение уровня данного метаболита может быть связано с тем, что мелатонин является эффективным ингибитором АФК. Он беспрепятственно проникает в клетки и защищает нуклеиновые кислоты, липиды и белки от повреждения свободными радикалами [597].

В третьей группе больных после комбинированной терапии с мелаксеном содержание  $\alpha$ -токоферола повышалось в среднем в 1,5 раза ( $U$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению с данными, полученными до лечения. Повышение уровня  $\alpha$ -токоферола, выступающего в качестве важнейшего антиоксиданта в липидной фазе клеточных мембран, свидетельствует о позитивном влиянии мелатонина на неферментативное звено антиоксидантной защиты.

Таким образом, включение в базисную терапию эпифамина и мелаксена приводило к изменению концентрации  $\alpha$ -токоферола в сторону нормы. Вероятно, это является следствием проявления антиоксидантных свойств мелатонина, содержание которого может корректироваться под действием комбинированной терапии с данными препаратами, что, очевидно, может иметь положительное

значение для защиты клеточных мембран от негативного действия свободнорадикальных соединений.

## **5.6. Изменение апоптотических процессов у больных с лекарственным гепатитом при комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном**

### **5.6.1. Воздействие мелатонин-корректирующих препаратов на активность каспаз в сыворотке крови больных с лекарственным гепатитом**

Интенсификация СО биомолекул при лекарственном гепатите, взаимосвязанная с чрезмерной генерацией АФК, по-видимому, может быть сопряжена с возрастанием активности апоптотических процессов. Усиление процессов программируемой клеточной смерти характерно для многих заболеваний, включая алкогольный гепатит и цирроз печени [207]. Ключевые механизмы апоптоза связаны, как известно, с функционированием каспаз – группой эволюционно консервативных цистеиновых протеиназ. У млекопитающих идентифицировано 14 каспаз, распознающих определенные тетрапептидные блоки (мотивы) в полипептидных цепях белков и расщепляющих пептидную связь, в образовании которой участвует карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты. Каспазы осуществляют протеолиз белков, играющих важнейшую роль в инициации апоптоза. Активация каспаз является ключевым этапом в промежуточных и терминальных стадиях программируемой клеточной смерти. Принято выделять две группы каспаз – инициаторы и эффекторы, что связано со способностью одних каспаз активировать другие [241]. Различающиеся по субстратной специфичности иницирующие и эффекторные каспазы часто относят соответственно к каспазам первого и второго эшелона. На этапе активации иницирующих каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. В соответствии с основной биологической функцией, каспазы распределены на две группы: ICE- семейство и Ced-3-семейство.

В ходе наших исследований было осуществлено определение активностей каспазы-1 и каспазы-3 в крови пациентов с лекарственным гепатитом,



развивающимся на фоне противотуберкулезной терапии. Каспаза – 1, относящаяся к членам семейства ICE, способствует активации ряда эффекторных каспаз, и в частности, каспазы-3. Каспаза-3, являющаяся членом Ced-3 семейства, способна в дальнейшем к самостоятельной активации (автокатализу или автопроцессингу), она активирует ряд других протеаз семейства каспаз. После этого процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым [241].

Установлено, что активность каспазы-1 в сыворотке крови возрастала в патологическом состоянии в среднем в 2,5 ( $p < 0,05$ ) раза, активность каспазы-3 – в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза (Рисунки 51, 52). После проведения базисного лечения происходило снижение активности каспазы-1 в сыворотке крови пациентов в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза. При применении эпифамина на фоне базисного лечения активность каспазы-1 уменьшалась в 1,9 ( $p < 0,05$ ) раза; при использовании мелаксена – в 2,2 (U,  $p < 0,05$ ) раза. Изменения активности каспазы-3 после лечения были менее значительными. Так, после проведения базисного лечения активность каспазы-3 в крови пациентов снижалась в среднем на 8,1%. Однако, применение комбинированной терапии, включающей мелатонин-корректирующие препараты, приводило и в данном случае к более выраженному снижению активности. При приеме эпифамина активность каспазы-3 уменьшалась на 12,6% (U,  $p < 0,05$ ), при использовании мелаксена в ходе лечения – на 37,3% (U,  $p < 0,05$ ).

Полученные данные соотносятся с результатами определения параметров биохемилюминесценции и уровня ДК в сыворотке крови больных лекарственным гепатитом, возникающим на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии, а также с этими показателями после проведения базисной терапии и лечения, включающего эпифамин и мелаксен. Совокупность полученных данных указывает на положительный эффект мелатонин-корректирующих препаратов на свободнорадикальный гомеостаз организма.



Рисунок 51. Активность каспазы-1 в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

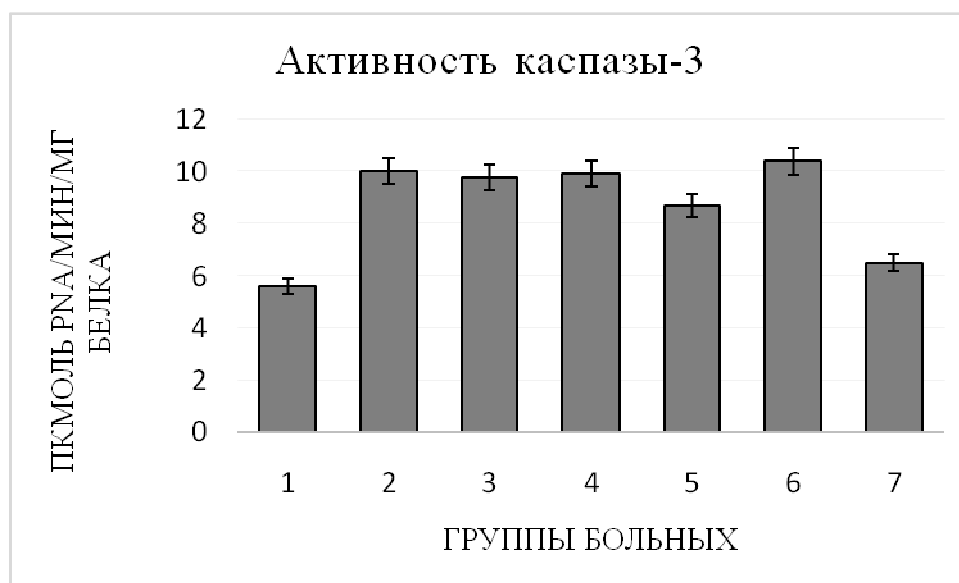


Рисунок 52. Активность каспазы-3 в сыворотке крови пациентов контрольной группы (1); у больных с ЛГ перед лечением (2, 4, 6); после базисного лечения (3); при комбинированной терапии с эпифамином (5); при комбинированной терапии с мелаксеном (7).

По-видимому, изменение параметров, отражающих интенсивность СО и апоптотических процессов, в направлении контрольных значений, свидетельствует о реализации мелатонином антиоксидантных свойств, благодаря которым он эффективно взаимодействует со свободными радикалами с образованием малотоксичных или нетоксичных, метаболизируемых в организме соединений [441]. Кроме того, известно, что мелатонин помимо прямого удаления свободных радикалов, может оказывать воздействие на функционирование дыхательной цепи митохондрий [513]. Данный гормон способен уменьшать утечку электронов во время их прохождения через электрон-транспортную цепь, что приводит к торможению генерации АФК. Помимо этого, мелатонин увеличивает активность комплексов I и IV электрон-транспортной цепи митохондрий и синтез АТФ [526].

#### **5.6.2. Оценка степени фрагментации ДНК в лейкоцитах крови больных лекарственным гепатитом при комбинированной терапии с эпифамином или мелахсеном**

ДНК из контрольных образцов (дорожка 2) была представлена одним фрагментом в начале трека, что характерно для высокомолекулярной ДНК нативных клеток (Рисунок 53). При исследовании образцов крови пациентов с лекарственным гепатитом было выявлено, что происходит фрагментация ДНК, подтверждающаяся совокупностью полос («апоптозная лестница») на электрофореграмме (дорожка 3). Согласно современным воззрениям, это свидетельствует о развитии апоптотических процессов, которые приводят к конденсации ядерного хроматина и сморщиванию клетки при сохранности цитоплазматической мембраны [241, 246]. Таким образом, противотуберкулезные препараты и образующиеся в результате их метаболизма АФК индуцируют процессы апоптоза лимфоцитарных клеток больных лекарственным гепатитом.

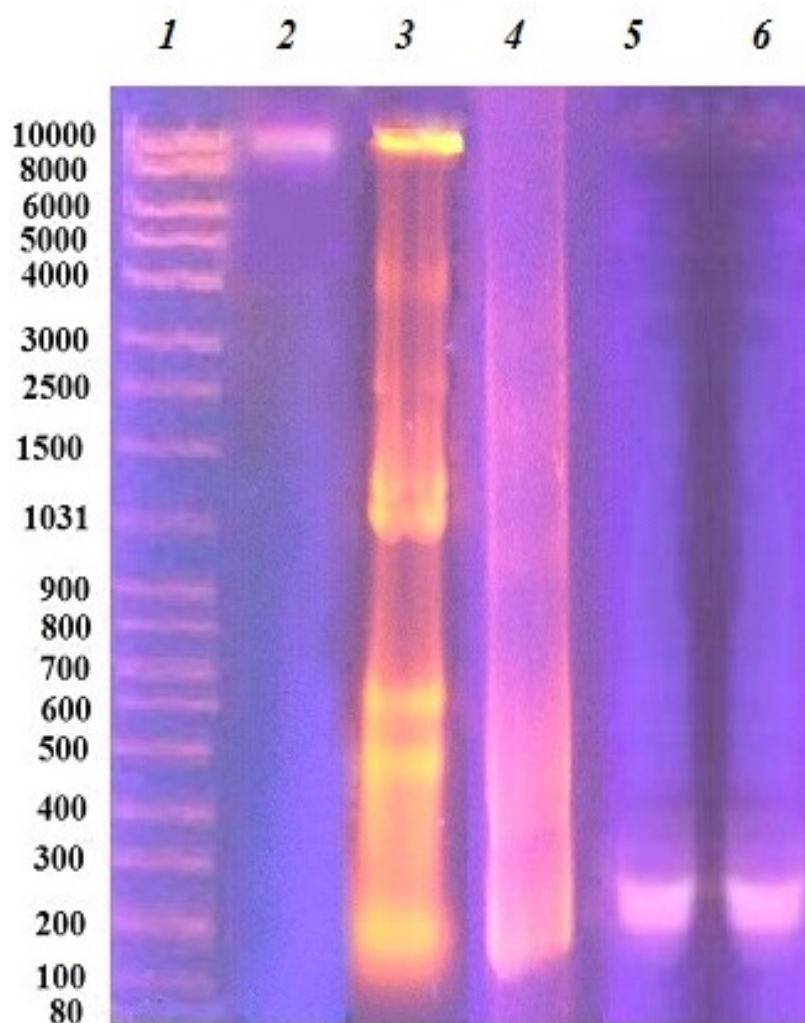


Рисунок 53. Степень фрагментации ДНК в лейкоцитах крови в норме (2), у пациентов ЛГ перед лечением (3), при проведении базисного лечения (3) и комбинированной терапии с эпифамином (4) или мелаксеном (5).

После проведения базисного лечения наблюдалось уменьшение степени фрагментации ДНК, что свидетельствует о снижении скорости апоптотических процессов (дорожка 4). Очевидно, назначение карсила и/или эссенциале положительно влияло на метаболические процессы в печени. Известно, что данные препараты обладают гепатопротекторным и мембраностабилизирующим действием [196, 272], за счет чего защищают гепатоциты от действия токсинов. При исследовании образцов крови больных, принимавших эпифамин или мелаксен на фоне базисной терапии, апоптозная лестница в большинстве проб

была мало выражена, а в ряде случаев практически не визуализировалась (дорожки 5 и 6). Вероятно, коррекция уровня мелатонина под действием данных препаратов приводила к защите молекулы ДНК от действия свободных радикалов, содержание которых повышается при данной патологии [624].

### 5.7. Сравнительный анализ клинической эффективности базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном у больных с лекарственным гепатитом

Клиническую эффективность базисной терапии, комбинированного лечения с эпифамином или мелаксеном оценивали по динамике изменений биохимических показателей в сторону нормальных значений при ЛГ (%), рассчитывая среднее значение (М) для каждого блока биохимических параметров.

Таблица 40. Эффективность базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном у больных с лекарственным гепатитом на основе оценки биохимических показателей.

Показатели	Эффективность базисного лечения	Эффективность комбинированной терапии с эпифамином	Эффективность комбинированной терапии с мелаксеном
<b>6-СМ</b>	<b>11,7%</b>	<b>28,6%</b>	<b>33,4%</b>
<i>Показатели липидного обмена</i>			
ЛПНП	17,1%	23,3%	31,9%
Холестерин	11,4%	14,3%	18,8%
<b>М</b>	<b>14,3%</b>	<b>18,9%</b>	<b>25,4%</b>
<i>Показатели функции печени</i>			
АлАт	54,4%	59,7%	67,4%
АсАт	40,8%	49,7%	56,2%
ГГТП	47,2%	54,4%	57,4%
ХЭ	16,8%	25,8%	29,3%
Тимоловая проба	23,3%	31,5%	45,3%
<b>Итого</b>	<b>36,5%</b>	<b>44,2%</b>	<b>51,1%</b>
<i>Показатели иммунного статуса</i>			
Ig A	5,4%	18,5%	21,7%

Ig M	5,8%	8,0%	9,4%
Ig G	15,5%	18,2%	20,6%
ЦИК	43,0%	68,0%	73,4%
<b>М</b>	<b>17,4%</b>	<b>28,2%</b>	<b>31,3%</b>
<i>Показатели интенсивности свободнорадикального окисления</i>			
S	31,4%	38,1%	38,1%
Imax	20,2%	34,3%	37,5%
ДК	26,6%	33,5%	40,2%
АкГ	8,6%	38,1%	43,7%
<b>М</b>	<b>21,7%</b>	<b>36,0%</b>	<b>39,9%</b>
<i>Показатели антиоксидантной системы</i>			
tga2	12,9%	18,9%	33,0%
GSH	35,2%	46,0%	48,7%
ГП	19,5%	42,5%	52,6%
ГР	9,7%	23,6%	46,0%
Г-S-T	32,5%	42,2%	45,6%
СОД	0,5%	20,0%	22,0%
Каталаза	-8,2%	16,1%	26,5%
Цитрат	32,9%	43,7%	49,3%
α-токоферол	21,4%	31,2%	34,4%
<b>М</b>	<b>17,4%</b>	<b>31,6%</b>	<b>39,8%</b>
<i>Показатели интенсивности апоптотических процессов</i>			
Каспаза-1	37,6%	47,4%	54,7%
Каспаза-3	8,0%	12,6%	37,3%
<b>М</b>	<b>22,8%</b>	<b>30,0%</b>	<b>46,0%</b>

Концентрация 6-СМ в моче, служащая объективным критерием уровня мелатонина в организме, после базисной терапии повышалась на 11,7%, после комбинированного лечения с применением эпифамина и мелаксена увеличение содержания данного метаболита происходило в большей степени – на 28,6% и 33,4% соответственно по сравнению с результатами до лечения.

У больных с лекарственным гепатитом показатели липидного обмена после базисного лечения изменялись в направлении контрольного уровня в среднем на 14,3%, при комбинированном лечении с эпифамином – на 18,9%, после комбинированной терапии с мелаксеном – на 25,4%. При этом наибольшее изменение при применении мелатонин-корректирующих препаратов было

характерно для содержания ЛПНП. Показатели функции печени изменялись в направлении нормальных значений после базисной терапии на 36,5% по сравнению данными, полученными до лечения. После комбинированного лечения с эпифамином и мелаксеном происходило наибольшее изменение всех параметров, характеризующих функцию печени, – на 44,2% и 51,1% соответственно. После базисной терапии происходило снижение показателей иммунного статуса, имеющих повышенные значения перед лечением, в среднем на 17,4%, при комбинированной терапии с эпифамином – на 28,2%, при комбинированном лечении с мелаксеном – на 31,3%. После комбинированной терапии с мелатонин-корректирующими препаратами наибольшее снижение содержания было характерно для IgA и ЦИК.

Интенсивность свободнорадикального окисления и апоптотических процессов у пациентов с ЛГ после базисной терапии уменьшалась на 21,7% и 22,8% соответственно, после комбинированного лечения с эпифамином – на 36% и 30% соответственно, после комбинированной терапии с мелаксеном – на 39,9% и 46,0% соответственно. Следует отметить, что более значимо в сторону нормы изменялась активность АкГ, как по сравнению с базисным лечением, так и в сравнении с данными, полученными при АГ и НАСГ.

Показатели апоптоза (каспаза-1 и каспаза-3) после комбинированной терапии с эпифамином и мелаксеном изменялись сходным образом, однако более существенно, чем при базисном лечении. Активность АОС организма после базисной терапии повышалась на 17,4%, при комбинированном лечении с эпифамином и мелаксеном – на 31,6% и 39,8% соответственно, по сравнению с данными, полученными до лечения. При этом наибольшее изменение при ЛГ после приема мелатонин-корректирующих препаратов было характерно для показателей ферментативного звена АОС (ГП, ГР, СОД, каталаза).

Таким образом, клиническая эффективность, основанная при учете показателей биохимических исследований, при базисном лечении больных ЛГ составила 20,3%, при комбинированном лечении с эпифамином – 27,1%, при

комбинированной терапии с мелаксенон – 38,1%. Более выраженная эффективность лечения с мелаксенон по сравнению с эпифамином, могла быть связана с тем, что, что экзогенный мелатонин, входящий в состав данного препарата, быстрее включается в метаболизм, усиливая антиоксидантный потенциал организма. Что касается коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина, очевидно, этот процесс требует определенного времени для воздействия через эпифизарную область.

### **5.8. Корреляционные связи лабораторных параметров у пациентов с лекарственным поражением печени при комбинированной терапии с эпифамином или мелаксенон**

С помощью комплекса статистических программ у обследованных лиц с лекарственным гепатитом были определены умеренные и сильные связи между изученными лабораторными показателями с коэффициентом ранговой корреляции Пирсона более 0,3 при уровне значимости ( $p$ ) < 0,05. Были изучены ассоциации биохимических параметров (АлАт, АсАт, ГГТП, ХЭ, ОХ, ЛПНП, 6-СМ), иммунологических показателей (IgA, IgM, IgG, ЦИК), показателей свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>, ДК, АкГ), антиоксидантной системы (GSH, ГП, ГР, Г-S-T, каталаза, СОД, цитрат, α-токоферол) и апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3).

Анализ ассоциативных связей лабораторных параметров 1-й группы больных с ЛГ до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (3), ГГТП (4), ХЭ (3), ОХ (4), ЛПНП (3), 6-СМ (4 связи) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, подтверждая роль последних в патогенезе ЛГ в стадии обострения, что отражено в таблице 41. Так, тесные прямые связи были найдены между показателями, отражающими степень повреждения гепатоцитов (АлАт, АсАт, ГГТП), показателями свободнорадикального окисления (S, I<sub>max</sub>, ДК) и



компонентами глутатионовой системы (GSH, ГР), что свидетельствует о том, что при поражении печени происходит активизация СО биомолекул и снижение активности антиоксидантной защиты организма. Показатели липидного обмена ОХ, ЛПНП были сопряжены также с показателями СО биомолекул (S, ДК) и ферментативного звена АОС организма (СОД, ГП, ГР), что доказывает роль нарушения свободнорадикального гомеостаза в дисбалансе липидного спектра крови. Концентрация 6-СМ имела отрицательные корреляционные связи с АлАт, Ітах, каспазой-1. Таким образом, можно сделать вывод, что интенсификация свободнорадикальных и апоптотических процессов при ЛГ приводила к уменьшению содержания в организме эндогенного мелатонина.

Корреляционный анализ иммунологических показателей показал, что у ІgА и ІgМ было по 2 связи, у ІgG и ЦИК по 3 связи. Полученные данные демонстрируют, что при поражении печени и интенсификации СО биомолекул происходил дисбаланс в иммунном статусе организма у больных с ЛГ. Параметры свободнорадикального окисления: S (7), Ітах (6), ДК (6), АГ (4 связи) были тесно ассоциированы с показателями антиоксидантного статуса (GSH, ГР, ГП, Г-S-T, каталаза, цитрат, альфа-токоферол) и апоптотических процессов (каспаза-1 и каспаза-3), что подтверждает роль окислительного стресса в возникновении дисбаланса в системе антиоксидантной защиты организма и активизации механизмов запрограммированной клеточной гибели – апоптозе.

Показатели антиоксидантной системы: GSH (4), ГР (4), ГП (4), Г-S-T (3) каталаза (3), СОД (3), цитрат (5), α-токоферол (4) проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Параметры антиоксидантной защиты организма при ЛГ были связаны со степенью поражения клеток печени, нарушением липидного обмена, иммунологического спектра крови, интенсивностью СО биомолекул и апоптотических процессов.

Таблица 41. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных 1-ой группы с лекарственным гепатитом

Показатель	1-я группа (базисное лечение; n=35)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	ГГТП (r=+0,51; p=0,008) ЦИК (r=+0,45; p=0,023) S (r=+0,53; p=0,006)	6-СМ (r=-0,52; p=0,008) GSH (r=-0,41; p=0,041)	S (r=+0,50; p=0,013)	ГП (r=-0,55; p=0,003) α-токоферол (r=-0,47; p=0,023)
АсАт	IgG (r=+0,41; p=0,042) ДК (r=+0,51; p=0,009) Каспаза-3 (r=+0,43; p=0,038)		IgM (r=+0,41; p=0,043) ДК (r=+0,40; p=0,046)	Каталаза (r=-0,46; p=0,023)
ГГТП	АлАт (r=+0,51; p=0,008) Iмаx (r=+0,47; p=0,028) ГР (r=+0,46; p=0,033) Каспаза-1 (r=+0,42; p=0,038)		Iмаx (r=+0,40; p=0,047)	GSH (r=-0,45; p=0,025) ГП (r=-0,39; p=0,046)
ХЭ	АГ (r=+0,39; p=0,047)	СОД (r=-0,41; p=0,039) Каспаза-1 (r=-0,36; p=0,048)	GSH (r=+0,43; p=0,031)	ОХ (r=-0,45; p=0,024)
ОХ	ГР (r=+0,57; p=0,003) ДК (r=+0,45; p=0,036) СОД (r=+0,38; p=0,047)	6-СМ (r=-0,41; p=0,042)	Iмаx (r=+0,46; p=0,029) Цитрат (r=+0,39; p=0,046)	GSH (r=-0,47; p=0,019) ХЭ (r=-0,45; p=0,024) 6-СМ (r=-0,42; p=0,039)

ЛПНП	S (r=+0,42; p=0,039) ГП (r=+0,47; p=0,027) Каспаза-3 (r=+0,37; p=0,048)		IgG (r=+0,57; p=0,003)	$\alpha$ -токоферол (r=-0,48; p=0,017)
6-СМ		АлАт (r=-0,52; p=0,008) ОХ (r=-0,41; p=0,042) Имах (r=-0,48; p=0,014) Каспаза-1 (r=-0,55; p=0,003)	ГР (r=+0,50; p=0,010) Каталаза (r=+0,44; p=0,034)	ОХ (r=-0,42; p=0,039) IgG (r=-0,51; p=0,009) ДК (r=-0,48; p=0,015)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	IgG (r=+0,42; p=0,045) Каспаза-3 (r=+0,36; p=0,049)		Имах (r=+0,40; p=0,041) Каспаза-1 (r=+0,42; p=0,040)	GSH (r=-0,47; p=0,029)
IgM	Имах (r=+0,46; p=0,025) ЦИК (r=+0,42; p=0,043)		АсАт (r=+0,41; p=0,043)	Каталаза (r=-0,38; p=0,048)
IgG	АсАт (r=+0,41; p=0,042) IgA (r=+0,42; p=0,045)	Г-S-T (r=-0,52; p=0,008)	ЛПНП (r=+0,57; p=0,003) Цитрат (r=+0,46; p=0,027)	6-СМ (r=-0,51; p=0,009)
ЦИК	АлАт (r=+0,45; p=0,023) IgM (r=+0,42; p=0,043) Цитрат (r=+0,42; p=0,044)		S (r=+0,39; p=0,045)	ГП (r=-0,56; p=0,004) Г-S-T (r=-0,46; p=0,020)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	АлАт (r=+0,53; p=0,006) ЛПНП (r=+0,42; p=0,039)	GSH (r=-0,48; p=0,018) $\alpha$ -токоферол (r=-0,44;	АлАт (r=+0,50; p=0,013) ЦИК (r=+0,39; p=0,045)	GSH (r=-0,47; p=0,028)

	ДК (r=+0,47; p=0,038) ГР (r=+0,42; p=0,042) Каспаза-3 (r=+0,38; p=0,047)	p=0,042)	ДК (r=+0,50; p=0,011) Цитрат (r=+0,45; p=0,032) Каспаза-1 (r=+0,39; p=0,045)	
I <sub>max</sub>	ГГТП (r=+0,47; p=0,028) IgM (r=+0,46; p=0,025) ГП (r=+0,42; p=0,041) Каспаза-1 (r=+0,45; p=0,040)	6-СМ (r=+0,48; p=0,014) АкГ (r=-0,44; p=0,028)	ГГТП (r=+0,40; p=0,047) ОХ (r=+0,46; p=0,029) IgA (r=+0,40; p=0,041) СОД (r=-0,41; p=0,042)	АкГ (r=-0,41; p=0,044) ГР (r=-0,53; p=0,006)
ДК	АсАт (r=+0,51; p=0,009) ОХ (r=+0,45; p=0,036) S (r=+0,47; p=0,038) Цитрат (r=+0,51; p=0,007) Каспаза-1 (r=+0,40; p=0,041)	Г-S-T (r=-0,37; p=0,049)	АсАт (r=+0,40; p=0,046) S (r=+0,50; p=0,011) Каспаза-3 (r=+0,49; p=0,013)	6-СМ (r=-0,48; p=0,015) α-токоферол (r=-0,40; p=0,046)
АГ	ХЭ (r=+0,39; p=0,047)	Каталаза (r=-0,47; p=0,016) I <sub>max</sub> (r=-0,44; p=0,028) Цитрат (r=-0,47; p=0,017)	Г-S-T (r=+0,46; p=0,020)	I <sub>max</sub> (r=-0,41; p=0,044) Каспаза-1 (r=-0,43; p=0,032)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH		АлАт (r=-0,41; p=0,041) S (r=-0,48; p=0,018) ГР (r=-0,57; p=0,003) Каспаза-3 (r=-0,50; p=0,012)	ХЭ (r=+0,43; p=0,031) ГР (r=+0,56; p=0,004) Г-S-T (r=+0,49; p=0,012) Каталаза (r=+0,41; p=0,043)	ГГТП (r=-0,45; p=0,025) ОХ (r=-0,47; p=0,019) IgA (r=-0,47; p=0,029) СОД (r=-0,45; p=0,026) S (r=-0,47; p=0,028)

				Каспаза-1 (r=-0,47; p=0,025)
ГР	ГГТП (r=+0,46; p=0,033) ОХ (r=+0,57; p=0,003) S (r=+0,42; p=0,042)	GSH (r=-0,57; p=0,003)	6-СМ (r=+0,50; p=0,010) GSH (r=+0,56; p=0,004) Каталаза(r=+0,46; p=0,023)	Іmax (r=-0,53; p=0,006)
ГП	ЛПНП (r=+0,47; p=0,027) Цитрат (r=+0,40; p=0,047) Іmax (r=+0,42; p=0,041) Каспаза-1 (r=+0,48; p=0,022)		Г-S-T(r=+0,62; p=0,001)	АлАт (r=-0,55; p=0,003) ГГТП (r=-0,39; p=0,046) ЦИК (r=-0,56; p=0,004)
Г-S-T		IgG (r=-0,52; p=0,008) Каспаза-1 (r=-0,41; p=0,048) ДК (r=-0,37; p=0,049)	АкГ (r=+0,46; p=0,020) GSH (r=+0,49; p=0,012) ГП(r=+0,62; p=0,001)	ЦИК (r=-0,46; p=0,020) Цитрат(r=-0,43; p=0,030)
Каталаза	СОД (r=+0,48; p=0,035) Каспаза-1 (r=+0,45; p=0,041)	АкГ (r=-0,47; p=0,016)	GSH (r=+0,41; p=0,043) 6-СМ (r=+0,44; p=0,034) ГР(r=+0,46; p=0,023)	АсАт (r=-0,46; p=0,023) IgM (r=-0,38; p=0,048) СОД (r=-0,38; p=0,047)
СОД	ОХ (r=+0,38; p=0,047) Каталаза (r=+0,48; p=0,035)	ХЭ (r=-0,41; p=0,039)	Іmax (r=-0,41; p=0,042) Каспаза-3 (r=+0,35; p=0,049)	GSH (r=-0,45; p=0,026) Каталаза (r=-0,38; p=0,047)
Цитрат	ЦИК (r=+0,42; p=0,044) ДК (r=+0,51; p=0,007) ГП (r=+0,40; p=0,047)	АкГ (r=-0,47; p=0,017) $\alpha$ -токоферол (r=-0,49; p=0,010)	ОХ (r=+0,39; p=0,046) IgG (r=+0,46; p=0,027) S (r=+0,45; p=0,032) Каспаза-1 (r=+0,40; p=0,042)	Г-S-T(r=-0,43; p=0,030)

$\alpha$ -токоферол		ГГТП Цитрат (r=-0,49; p=0,010) S (r=-0,44; p=0,042) Каспаза-3 (r=-0,47; p=0,031)		АлАт (r=-0,47; p=0,023) ЛПНП (r=-0,48; p=0,017) ДК (r=-0,40; p=0,046) Каспаза-3 (r=-0,49; p=0,012)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	ГГТП (r=+0,42; p=0,038) I <sub>max</sub> (r=+0,45; p=0,040) ДК (r=+0,40; p=0,041) ГП (r=+0,48; p=0,022) Каталаза (r=+0,45; p=0,041)	ХЭ (r=-0,36; p=0,048) Г-S-T (r=-0,41; p=0,048) 6-СМ (r=-0,55; p=0,003)	IgA (r=+0,42; p=0,040) S (r=+0,39; p=0,045) Цитрат (r=+0,40; p=0,042)	GSH (r=-0,47; p=0,025) АкГ (r=-0,43; p=0,032)
Каспаза-3	АсАт (r=+0,43; p=0,038) ЛПНП (r=+0,37; p=0,048) IgA (r=+0,36; p=0,049) S (r=+0,38; p=0,047)	GSH (r=-0,50; p=0,012) $\alpha$ -токоферол (r=-0,47; p=0,031)	ДК (r=+0,49; p=0,013) СОД (r=+0,35; p=0,049)	$\alpha$ -токоферол (r=-0,49; p=0,012)

Апоптотические показатели имели также положительные и отрицательные корреляционные связи. У каспазы-1 наблюдалось 8 связей, у каспазы-3 – 6 связей. Можно сделать вывод, что активность апоптотических процессов зависит от интенсивности СО биомолекул и степени дисбаланса АОС организма. Следует отметить, что маркеры апоптоза были ассоциированы с показателями глутатионовой системы (GSH, Г-S-T, ГП). Известно, что даже минимальная потеря клеточного глутатиона может запустить запрограммированную гибель клетки [602]. После проведения базисного лечения взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись. Полученные результаты представлены в таблице 41. Биохимические показатели проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, подтверждая роль последних в патогенезе ЛГ. Так, у АлАт, АсАт и ГГТП наблюдалось по 3 связи, у ХЭ и ЛПНП – по 2 связи, у ОХ и 6-СМ – по 5 связей. Активности показателей степени повреждения клеток печени (АлАт, АсАт, ГГТП) были тесно ассоциированы с показателями СО биомолекул (S, I<sub>max</sub>, ДК) и параметрами АОС организма (GSH, ГП, каталаза, α-токоферол). Это указывает, что положительные сдвиги в функционировании антиоксидантной защиты и снижение степени выраженности свободнорадикальных процессов, сопровождались уменьшением цитолиза гепатоцитов. Повышение активности ХЭ, являющейся одним из маркеров белково-синтезирующей функции печени при ЛГ, было ассоциировано корреляционной связью с GSH. Таким образом, очевидно, что при уменьшении воспалительного процесса, нормализовалась синтезирующая функция, а следовательно синтез GSH, 20% которого образуется в печени [137]. Показатели липидного обмена (ОХ, ЛПНП) имели ассоциации с показателями АОС (GSH, цитрат, α-токоферол), что доказывает роль эндогенных антиоксидантов в регуляции обмена веществ в организме. Концентрация 6-СМ имела корреляционные связи с ДК, ГР, каталазой. Очевидно, что после

проведения базисной терапии у больных с ЛГ происходило некоторое улучшение антиоксидантной функции организма, что в свою очередь приводило к возникновению тенденции изменения уровня эндогенного мелатонина в сторону нормы. Анализ ассоциативных связей иммунологических показателей: IgA (3 связи), IgM (2 связи), IgG (3 связи), ЦИК (3 связи) показал, что они проявляли прямые корреляционные связи с параметрами свободнорадикальных процессов (S, I<sub>max</sub>) и АОС (GSH, ГП, Г-S-T, каталаза, цитрат), что указывает на тесную связь работы иммунной и антиоксидантной систем организма, функционирование которых характеризовалось тенденцией к нормализации после проведения базисной терапии у больных с ЛГ. Параметры свободнорадикального окисления: S (6 связей), I<sub>max</sub> (6 связей), ДК (5 связей), АкГ (3 связи) были тесно ассоциированы с показателями повреждения клеток печени (АлАт, АсАт, ГГТП) и апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3), что указывает на то, что уменьшение выраженности цитолитического синдрома и степени выраженности апоптоза находится в тесной связи с интенсивностью ПОЛ, активность которого снижалась после базисного лечения. Показатели антиоксидантной системы: GSH (4), ГР (2), ГП (2), Г-S-T (2) каталаза (3), СОД (2), цитрат (2), α-токоферол (1) проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Компоненты глутатионовой системы (GSH, ГП, Г-S-T) имели обратную корреляционную связь с параметрами апоптотических процессов, что отражалось в снижении степени выраженности запрограммированной клеточной гибели после базисного лечения. С активностью АлАт и ГГТП, которые уменьшались после проводимого лечения, наибольшую связь показывали каталаза, цитрат и α-токоферол. По-видимому, именно изменение данных показателей АОС в сторону нормы и торможение СО было связано с уменьшением цитолитического синдрома. Изменения корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (3 связи), каспаза-3 (3 связи), свидетельствовали об уменьшении апоптотических процессов в организме больных ЛГ при снижении выраженности цитолитического синдрома и СО



биомолекул, а также изменении в сторону нормы иммунных показателей и концентрации восстановленного глутатиона.

Как и в предыдущей группе больных с ЛГ, развивающемся на фоне приема противотуберкулезных препаратов, анализ ассоциативных связей лабораторных параметров 2-ой группы пациентов до лечения показал, что биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (4), ГГТП (5), ХЭ (3), ОХ (3), ЛПНП (3), 6-СМ (5 связей) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса (IgA (3), IgM (2), IgG (2), ЦИК (4 связи)), свободнорадикального окисления (S (5), I<sub>max</sub> (4), ДК (7), АкГ (2 связи)), антиоксидантной системы (GSH (5), ГР (3), ГП (5), Г-S-T (5), каталаза (4), СОД (3), цитрат (4), α-токоферол (2 связи) ) и апоптотических процессов (каспаза-1 (6), каспаза-3 (5 связей)). Полученные результаты подтверждают роль процессов СО биомолекул в патогенезе ЛГ, а именно в развитии цитолитического синдрома, возникновении отклонений липидного обмена и иммунного статуса. Важную роль нарушение свободнорадикального гомеостаза играет также в развитии апоптоза. Следует отметить, что в обеих группах больных до лечения были выявлены ассоциативные связи нарушений функции печени, а также антиоксидантного статуса с пониженным уровнем в организме эндогенного мелатонина, концентрация которого оценивалась по содержанию в моче 6-СМ.

После проведения комбинированного лечения с эпифамином во 2-ой группе пациентов с ЛГ взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись (Таблица 42). Так, показатели цитолитического синдрома (АлАт, АсАт, ГГТП), липидного обмена (ОХ, ЛПНП) и белково-синтетической функции печени (ХЭ) имели корреляционные связи между собой и показателями свободнорадикальных процессов (S, I<sub>max</sub>, ДК). Очевидно, что при комплексной терапии происходило снижение СО биомолекул, что в свою очередь приводило к уменьшению цитолиза и нормализации функции печени. Все эти изменения также положительно влияли на показатели липидного обмена, которые снижались после

проводимого лечения. Концентрация 6-СМ имела отрицательные корреляционные связи с ОХ и АсАт. Это подтверждает предположение, что при комбинированном лечении с эпифамином происходит увеличение уровня эндогенного мелатонина, который за счет своего антиоксидантного действия, увеличивает гепатопротекторный эффект проводимой терапии – с одной стороны, а также снижает степень гиперлипидемии, вероятно, за счет ингибирующего действия на эффекты оксида азота, - с другой.

Показатели иммунологического статуса: IgA (6), IgM (3), IgG (4), ЦИК (5 связей) при корреляционном анализе проявляли множественные внутри - и межсистемные ассоциации в первую очередь с параметрами апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3) и ферментативным (ГР, ГП, каталаза) и неферментативным (цитрат,  $\alpha$ -токоферол) звеньями АОС. Вероятно, стабилизация работы антиоксидантной защиты организма была взаимосвязана с нормализацией иммунного ответа организма у больных с ЛГ.

Параметры свободнорадикального окисления: S (5), I<sub>max</sub> (6), ДК (3), АГ (3 связи) имели множественные внутри - и межсистемные связи. В первую очередь необходимо отметить, что после комбинированной терапии с эпифамином имели место ассоциации с компонентами глутатионовой системы (GSH, ГП, Г-S-T), также как и при АГ, и НАСГ. Очевидно, что эпифамин, корректирующий уровень мелатонина, активизирует глутатионовую систему, способствуя повышению уровня восстановленного глутатиона и стимулируя активности ГП и Г-S-T.

Параметры АОС организма: GSH (5), ГР (3), ГП (5), Г-S-T (5), каталаза (4), СОД (3), цитрат (4),  $\alpha$ -токоферол (2 связи) проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. Так, GSH, Г-S-T, СОД проявляли положительную корреляционную связь с маркером повреждения гепатоцитов (ГГТП).

Таблица 42. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных 2-ой группы с лекарственным гепатитом.

Показатель	2-я группа (комбинированное лечение с эпифамином; n=39)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	IgG (r=+0,49; p=0,019) S (r=+0,72; p=0,000) Каспаза-3 (r=+0,48; p=0,017)	ХЭ (r=+0,48; p=0,023) 6-СМ (r=-0,51; p=0,009)	ОХ (r=+0,54; p=0,006) ЛПНП (r=+0,39; p=0,035) S (r=+0,44; p=0,021) Каспаза-3 (r=+0,49; p=0,013)	ХЭ (r=-0,39; p=0,041)
АсАт	ГГТП(r=+0,55; p=0,005) ЛПНП (r=+0,46; p=0,030) ДК (r=+0,43; p=0,034) Каталаза (r=-0,49; p=0,015)		ДК (r=+0,39; p=0,043) Каспаза-1 (r=+0,52; p=0,004)	6-СМ (r=-0,48; p=0,015)
ГГТП	IgA (r=+0,52; p=0,007) Цитрат (r=+0,43; p=0,033) АсАт (r=+0,55; p=0,005) Каталаза (r=-0,48; p=0,018) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,019)		ДК (r=+0,49; p=0,012)	GSH (r=-0,62; p=0,001) Г-S-T (r=-0,37; p=0,047) СОД (r=-0,45; p=0,020)
ХЭ	ДК (r=+0,45; p=0,027)	АлАт (r=-0,48; p=0,023)	СОД (r=+0,51; p=0,008)	АлАт (r=-0,39; p=0,041)

		Г-S-T (r=-0,43; p=0,035)		ЛПНП (r=-0,45; p=0,021) IgA (r=-0,38; p=0,042)
ОХ	β-ЛП (r=+0,49; p=0,015) S (r=+0,48; p=0,017) Каспаза-3 (r=+0,42; p=0,035)		АлАт (r=+0,54; p=0,006) ЦИК (r=+0,46; p=0,015) S (r=+0,49; p=0,011) α-токоферол (r=+0,60; p=0,001)	6-СМ (r=+0,47; p=0,013)
ЛПНП	АсАт (r=+0,46; p=0,030) ОХ (r=+0,49; p=0,015)	GSH (r=-0,49; p=0,013)	АлАт (r=+0,39; p=0,035) Iмаx (r=+0,35; p=0,046)	ХЭ (r=-0,45; p=0,021)
6-СМ	АкГ (r=+0,38; p=0,042)	АлАт (r=-0,51; p=0,009) ЦИК (r=-0,42; p=0,033) S (r=-0,49; p=0,014) СОД (r=-0,53; p=0,007)	GSH (r=+0,56; p=0,004) ГР (r=+0,37; p=0,040)	ОХ (r=-0,47; p=0,013) АсАт (r=-0,48; p=0,015) IgG (r=-0,42; p=0,029) Iмаx (r=-0,56; p=0,003)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	Iмаx (r=+0,45; p=0,027) ГГТП (r=+0,52; p=0,007)	α-токоферол (r=-0,40; p=0,037)	ХЭ (r=+0,38; p=0,042) IgM (r=+0,44; p=0,022) ЦИК (r=+0,49; p=0,012) α-токоферол (r=+0,34; p=0,046) Каспаза-1 (r=+0,57; p=0,003)	Каталаза (r=-0,43; p=0,021)
IgM	Iмаx (r=+0,39; p=0,040) Каталаза (r=+0,44; p=0,026)		IgA (r=+0,44; p=0,022) IgG (r=+0,49; p=0,011)	

			Іmax (r=+0,47; p=0,018)	
IgG	АлАт (r=+0,49; p=0,019) СОД (r=+0,36; p=0,047)		IgM (r=+0,49; p=0,011) Каспаза-3 (r=+0,46; p=0,018)	6-СМ (r=-0,42; p=0,029) ГР (r=-0,50; p=0,009)
ЦИК	ДК (r=+0,39; p=0,045) Цитрат (r=+0,48; p=0,022)	6-СМ (r=-0,42; p=0,033) $\alpha$ -токоферол (r=-0,51; p=0,014)	ОХ (r=+0,40; p=0,034) IgA (r=+0,49; p=0,012) Цитрат (r=+0,42; p=0,026) Каспаза-1 (r=+0,43; p=0,023)	ГП (r=-0,46; p=0,017)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	АлАт (r=+0,72; p=0,000) ОХ (r=+0,48; p=0,017) Каспаза-1 (r=+0,51; p=0,008)	6-СМ (r=-0,49; p=0,014) GSH (r=-0,50; p=0,012)	АлАт (r=+0,44; p=0,021) ОХ (r=+0,49; p=0,011) Каспаза-1 (r=+0,49; p=0,0013)	GSH (r=-0,53; p=0,005) ГП (r=+0,50; p=0,011)
Іmax	IgA (r=+0,45; p=0,027) IgM (r=+0,39; p=0,040) Каспаза-3 (r=+0,44; p=0,030)	$\alpha$ -токоферол (r=-0,43; p=0,032)	ЛПНП (r=+0,35; p=0,046) IgM (r=+0,47; p=0,018) Каспаза-3 (r=+0,52; p=0,006)	6-СМ (r=-0,56; p=0,003) АГ (r=-0,45; p=0,022) Каталаза (r=-0,48; p=0,015)
ДК	АсАт (r=+0,43; p=0,034) ХЭ (r=+0,45; p=0,027) ЦИК (r=+0,39; p=0,045) ГР (r=+0,43; p=0,036) ГП (r=+0,44; p=0,034) СОД (r=+0,51; p=0,010)		АсАт (r=+0,39; p=0,043) ГГТП (r=+0,49; p=0,012)	Г-S-T (r=+0,50; p=0,010)

	Каспаза-1 (r=+0,49; p=0,015)			
АкГ	6-СМ (r=+0,38; p=0,042) GSH (r=+0,36; p=0,048)		Г-S-T (r=+0,40; p=0,029)	Иmax (r=-0,45; p=0,022) Цитрат (r=-0,58; p=0,002)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	Г-S-T (r=+0,48; p=0,019) АкГ (r=+0,36; p=0,048)	ЛПНП (r=-0,49; p=0,013) S (r=-0,50; p=0,012) Каспаза-1 (r=-0,47; p=0,019)	6-СМ (r=+0,56; p=0,004) ГП (r=+0,51; p=0,009) Г-S-T (r=+0,46; p=0,016)	ГГТП (r=-0,62; p=0,001) S (r=-0,53; p=0,005)
ГР	ДК (r=+0,43; p=0,036) ГП (r=+0,61; p=0,001) Каспаза-1 (r=+0,55; p=0,005)		Каспаза-3 (r=+0,34; p=0,045) 6-СМ (r=+0,37; p=0,040)	IgG (r=-0,50; p=0,009)
ГП	ДК (r=+0,44; p=0,034) ГР (r=+0,61; p=0,001) Каталаза (r=+0,39; p=0,042)		GSH (r=+0,51; p=0,009) Г-S-T (r=+0,42; p=0,026)	ЦИК (r=-0,46; p=0,017) S (r=-0,50; p=0,011) Каспаза-3 (r=-0,47; p=0,018)
Г-S-T	GSH (r=+0,48; p=0,019)	ХЭ (r=-0,43; p=0,035)	ДК (r=+0,50; p=0,010) АкГ (r=+0,40; p=0,029) ГП (r=+0,42; p=0,026) GSH (r=+0,46; p=0,016)	ГГТП (r=-0,37; p=0,047)
Каталаза	АсАт (r=+0,49; p=0,015) ГГТП (r=+0,48; p=0,018) IgM (r=+0,44; p=0,026) ГП (r=+0,39; p=0,042)			Цитрат (r=-0,54; p=0,005) IgA (r=-0,43; p=0,021) Иmax (r=-0,48; p=0,015) Каспаза-1 (r=-0,47; p=0,017)
СОД	IgG (r=+0,36; p=0,047) ДК (r=+0,51; p=0,010)	6-СМ (r=-0,53; p=0,007)	ХЭ (r=+0,51; p=0,008)	ГГТП (r=-0,45; p=0,020) Каспаза-3 (r=-0,48; p=0,017)

Цитрат	ГГТП (r=+0,43; p=0,033) ЦИК (r=+0,48; p=0,022) Каспаза-3 (r=+0,40; p=0,039)		ЦИК (r=+0,42; p=0,026) Каспаза-1 (r=+0,56; p=0,004)	АкГ (r=-0,58; p=0,002) Каталаза (r=-0,54; p=0,005)
α- токоферол		Имаx (r=-0,43; p=0,032) IgA (r=-0,40; p=0,037) ЦИК (r=-0,51; p=0,014)	ОХ (r=+0,60; p=0,001) IgA (r=+0,34; p=0,046)	
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	ГГТП (r=+0,46; p=0,019) S (r=+0,51; p=0,008) ДК (r=+0,49; p=0,015) ГР (r=+0,55; p=0,005)	GSH (r=-0,47; p=0,019)	АсАт (r=+0,52; p=0,004) IgA (r=+0,57; p=0,003) ЦИК (r=+0,43; p=0,023) S (r=+0,49; p=0,0013) Цитрат (r=+0,56; p=0,004)	Каталаза (r=-0,47; p=0,017)
Каспаза-3	АлАт (r=+0,48; p=0,017) ОХ (r=+0,42; p=0,035) Имаx (r=+0,44; p=0,030) Цитрат (r=+0,40; p=0,039)		АлАт (r=+0,49; p=0,013) Имаx (r=+0,52; p=0,006) IgG (r=+0,46; p=0,018) ГР (r=+0,34; p=0,045) СОД (r=+0,48; p=0,017)	ГП (r=-0,47; p=0,018)

Вероятно, что после комбинированной терапии с эпифамином данные компоненты антиоксидантной защиты имели ведущую роль в усилении гепатопротекторного и мембраностабилизирующего действия.  $\alpha$ -Токоферол имел сильную положительную корреляционную связь с ОХ. Можно предполагать, что коррекция уровня данного антиоксиданта в организме при комбинированной терапии с эпифамином приводила к снижению гиперхолестеринемии. Возможно, данный эффект был связан с тем, что  $\alpha$  —токоферол может стимулировать активность  $7\alpha$  —гидроксилазы, что приводит к снижению уровня холестерина в организме [454].

После проведения лечения во 2-ой группе больных апоптотические показатели имели положительные и отрицательные корреляционные связи. У каспазы-1 и каспазы-3 было выявлено по 6 связей, указанных в таблице 42. Каспазы имели ассоциации с компонентами глутатионовой системы (GSH, ГР, ГП). Можно сделать вывод, что активация глутатионовой системы сопровождалась снижением выраженности апоптотических процессов. Известно, что повышение содержания GSH обеспечивает клеточную защиту от Fas-индуцируемого апоптоза [446].

В 3-ей группе больных до лечения анализ ассоциативных связей показал, что биохимические показатели: АлАт (6), АсАт (4), ГГТП (6), ХЭ (3), ОХ (4), ЛПНП (4), 6-СМ (6 связей) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса (IgA (6), IgM (3), IgG (3), ЦИК (4) ), свободнорадикального окисления (S (5), I<sub>max</sub> (3), ДК (2), АкГ (3)), антиоксидантной системы (GSH (5), ГР (3), ГП (4), Г-S-T (3), каталаза (6), СОД (3), цитрат (4),  $\alpha$ -токоферол (3) ) и апоптотических процессов (каспаза-1 (5), каспаза-3 (6)). Полученные результаты подтверждают роль процессов СО биомолекул и апоптотических процессов в патогенезе ЛГ, а именно в развитии цитолитического синдрома, возникновении отклонений липидного обмена и иммунного статуса, также как и в предыдущих группах больных.



После проведения комбинированного лечения с мелаксенонм взаимоотношения биохимических, иммунологических, свободнорадикальных, антиоксидантных и апоптотических показателей изменялись. Полученные результаты представлены в таблице 43. Так, биохимические показатели: АлАт (5), АсАт (3), ГГТП (5), ХЭ (5), ОХ (7), ЛПНП (3), 6-СМ (8 связей) проявляли прямые внутри- и межсистемные ассоциации с параметрами иммунологического статуса, свободнорадикального окисления, антиоксидантной системы и апоптотических процессов, подтверждая роль последних в патогенезе. Активности аминотрансфераз и ГГТП были тесно ассоциированы с показателями СО биомолекул (S, I<sub>max</sub>), антиоксидантной системы (GSH, ГР, α-токоферол) и иммунного статуса (IgG, ЦИК). Это указывает, что при нормализации метаболических и свободнорадикальных процессов, происходило уменьшение степени цитолиза гепатоцитов и изменение иммунологического статуса в сторону нормы. Увеличение активности ХЭ, являющейся одним из маркеров белково-синтезирующей функции печени, после комбинированной терапии с мелаксенонм характеризовалось сильной связью с повышением концентрации 6-СМ в моче и нормализацией активностей ферментов АОС (каталаза, СОД). Очевидно, что при коррекции уровня эндогенного мелатонина в организме происходило уменьшение дисбаланса в ферментативном звене антиоксидантной защиты и усиление общей антиокислительной способности организма за счет данного метаболита, что сопровождалось нормализацией метаболизма в гепатоцитах. Показатели ОХ и ЛПНП, снижающиеся в 3-й группе больных, проявляли ассоциации с параметрами АОС (цитрат, GSH, каталаза, α-токоферол). Это указывает на то, что нормализация функционирования антиоксидантной защиты организма после комбинированного лечения с мелаксенонм благоприятно влияла на липидный обмен. Следует отметить, что концентрация 6-СМ в моче, отражающая содержание эндогенного мелатонина, имела тесные корреляции с компонентами СО (ДК, S).

Таблица 43. Ассоциативные связи биохимических показателей у больных 3-ей группы с лекарственным гепатитом.

Показатель	3-я группа (комбинированное лечение с мелаксеном; n=31)			
	До лечения		После лечения	
	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи	Положительные корреляционные связи	Отрицательные корреляционные связи
<b>Внутри- и межсистемные связи биохимических показателей</b>				
АлАт	АсАт (r=+0,36; p=0,047) IgM (r=+0,57; p=0,005) Имах (r=+0,50; p=0,009) ГП (r=+0,48; p=0,021)	6-СМ (r=-0,36; p=0,046) Цитрат (r=-0,48; p=0,021)	ГГТП (r=+0,42; p=0,037) ЦИК (r=+0,41; p=0,042) Каспаза-1 (r=+0,35; p=0,043) Имах (r=+0,55; p=0,004)	GSH (r=-0,57; p=0,003)
АсАт	АлАт (r=+0,36; p=0,047) ОХ (r=+0,47; p=0,024) IgM (r=+0,50; p=0,015) S (r=+0,46; p=0,028)		ГГТП (r=+0,52; p=0,010) S (r=+0,45; p=0,028)	$\alpha$ -токоферол (r=-0,56; p=0,003)
ГГТП	ЛПНП (r=+0,42; p=0,031) Имах (r=+0,44; p=0,029) Каспаза-3 (r=+0,43; p=0,035)	GSH (r=-0,58; p=0,002) $\alpha$ -токоферол (r=-0,45; p=0,027)	IgG (r=+0,37; p=0,041) АсАт (r=+0,52; p=0,010) АлАт (r=+0,42; p=0,037) Каспаза-3 (r=+0,53; p=0,010)	ГР (r=-0,32; p=0,046)

ХЭ		IgA (r=-0,39; p=0,038) S (r=-0,37; p=0,043) Каталаза (r=-0,36; p=0,047)	Каталаза (r=+0,37; p=0,040)	6-СМ (r=-0,40; p=0,038) IgA(r=-0,37; p=0,046) IgG (r=-0,47; p=0,023) СОД (r=-0,40; p=0,048)
ОХ	АсАт (r=+0,47; p=0,024) ГР (r=+0,42; p=0,046) Каспаза-1 (r=+0,37; p=0,045)	6-СМ (r=-0,57; p=0,005)	ЛПНП (r=+0,48; p=0,021) Цитрат(r=+0,55; p=0,004) Каспаза-1 (r=+0,55; p=0,004)	АкГ (r=-0,36; p=0,047) GSH (r=-0,47; p=0,023) Каталаза (r=-0,35; p=0,044) $\alpha$ -токоферол (r=-0,31; p=0,048)
ЛПНП	ГГТП (r=+0,42; p=0,031)	АкГ (r=-0,36; p=0,047) GSH (r=-0,52; p=0,011) $\alpha$ -токоферол (r=-0,49; p=0,014)	ОХ (r=+0,48; p=0,021) S (r=+0,42; p=0,035) Цитрат (r=+0,46; p=0,027)	
6-СМ	GSH (r=+0,49; p=0,012)	АлАт (r=-0,36; p=0,046) ОХ (r=-0,57; p=0,005) ДК (r=-0,36; p=0,044) СОД (r=-0,39; p=0,040) Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,028)	GSH (r=+0,54; p=0,003) СОД (r=+0,49; p=0,011) Каталаза (r=+0,46; p=0,026)	ХЭ (r=-0,40; p=0,038) IgA (r=-0,34; p=0,043) IgG (r=-0,45; p=0,024) S (r=-0,51; p=0,006) ДК (r=-0,51; p=0,009) Каспаза-1 (r=-0,58; p=0,001)
<b>Внутри- и межсистемные связи иммунологических показателей</b>				
IgA	IgG (r=+0,48; p=0,022) ЦИК (r=+0,41; p=0,045)	ХЭ (r=-0,39; p=0,038)	IgG (r=+0,36; p=0,044)	6-СМ (r=-0,34; p=0,043) ХЭ (r=-0,37; p=0,046)

	Каталаза (r=+0,44; p=0,035) Каспаза-1 (r=+0,39; p=0,041) Каспаза-3 (r=+0,45; p=0,030)			Г-S-T (r=-0,35; p=0,043) ГР (r=-0,42; p=0,039)
IgM	АлАт (r=+0,57; p=0,005) АсАт (r=+0,50; p=0,015)	Цитрат (r=-0,46; p=0,026)	Каспаза-3 (r=+0,41; p=0,042)	Каталаза (r=-0,36; p=0,048) ГП (r=-0,32; p=0,048)
IgG	IgA (r=+0,48; p=0,022) ЦИК (r=+0,38; p=0,039) I <sub>max</sub> (r=+0,51; p=0,009)		ГГТП (r=+0,37; p=0,041) ЦИК (r=+0,32; p=0,045) IgA (r=+0,36; p=0,044) ДК (r=+0,36; p=0,048) Каспаза-1 (r=+0,52; p=0,008) Каспаза-3 (r=+0,43; p=0,033)	ХЭ (r=-0,47; p=0,023) 6-СМ (r=-0,45; p=0,024) GSH (r=-0,33; p=0,045)
ЦИК	IgA (r=+0,41; p=0,045) IgG (r=+0,38; p=0,039) S (r=+0,52; p=0,008) Каталаза (r=+0,36; p=0,048)		АлАт (r=+0,41; p=0,042) IgG (r=+0,32; p=0,045) ГР (r=+0,36; p=0,049) Каспаза-1 (r=+0,48; p=0,017)	

<b>Внутри- и межсистемные связи показателей свободнорадикального окисления</b>				
S	АсАт (r=+0,46; p=0,028) ЦИК (r=+0,52; p=0,008) Каспаза-3 (r=+0,49; p=0,011)	ХЭ (r=-0,37; p=0,043) GSH (r=-0,48; p=0,015)	АсАт (r=+0,45; p=0,028) ЛПНП (r=+0,42; p=0,035)	ГП (r=-0,49; p=0,027) 6-СМ (r=-0,51; p=0,006)
Imax	АлАт (r=+0,50; p=0,009) ГГТП (r=+0,44; p=0,029) IgG (r=+0,51; p=0,009)		АлАт (r=+0,55; p=0,004)	ГП (r=-0,43; p=0,040) $\alpha$ -токоферол (r=-0,49; p=0,010)
ДК	Каталаза (r=+0,39; p=0,048)	6-СМ (r=-0,36; p=0,044)	IgG (r=+0,36; p=0,048) Каспаза-1 (r=+0,53; p=0,007) Каспаза-3 (r=+0,42; p=0,037)	ГР (r=-0,43; p=0,042) 6-СМ (r=-0,51; p=0,009)
АкГ		ЛПНП (r=-0,36; p=0,047) ГП (r=-0,39; p=0,042) Цитрат (r=-0,51; p=0,009)	Каталаза (r=+0,33; p=0,046) ГР (r=+0,41; p=0,040) Г-S-T (r=+0,42; p=0,035)	ОХ (r=-0,36; p=0,047) Цитрат (r=-0,53; p=0,006)
<b>Внутри- и межсистемные связи показателей антиоксидантной системы</b>				
GSH	6-СМ (r=+0,49; p=0,012) Г-S-T (r=+0,56; p=0,002)	ГГТП (r=-0,58; p=0,002) ЛПНП (r=-0,52; p=0,011) S (r=-0,48; p=0,015) ГР (r=-0,50; p=0,010)	ГР (r=+0,45; p=0,034) 6-СМ (r=+0,54; p=0,003)	АлАт (r=-0,57; p=0,003) ОХ (r=-0,47; p=0,023) IgG (r=-0,33; p=0,045)
ГР	ОХ (r=+0,42; p=0,046)	GSH (r=-0,50; p=0,010)	АкГ (r=+0,41; p=0,040)	ДК (r=-0,43; p=0,042)

	Каспаза-1 (r=+0,49; p=0,019)		GSH (r=+0,45; p=0,034) Г-S-T (r=+0,75; p=0,000)	ГГТП (r=-0,32; p=0,046) IgA (r=-0,42; p=0,039) ЦИК (r=-0,36; p=0,049)
ГП	АлАт (r=+0,48; p=0,021) СОД (r=+0,38; p=0,048)	АкГ (r=-0,39; p=0,042) Г-S-T (r=-0,52; p=0,012)	ХЭ (r=+0,37; p=0,040)	S (r=-0,49; p=0,027) Imax (r=-0,43; p=0,040)
Г-S-T	GSH (r=+0,56; p=0,002) Каспаза-1 (r=+0,45; p=0,031)	ГП (r=-0,52; p=0,012)	АГ (r=+0,42; p=0,035) ГР (r=+0,75; p=0,000) СОД (r=+0,36; p=0,043) Каталаза (r=+0,33; p=0,047)	IgA (r=-0,35; p=0,043)
Каталаза	IgA (r=+0,44; p=0,035) ЦИК (r=+0,36; p=0,048) ДК (r=+0,39; p=0,048) $\alpha$ -токоферол (r=+0,44; p=0,036) Каспаза-3 (r=+0,40; p=0,038)	ХЭ (r=+0,36; p=0,047)	6-СМ (r=+0,46; p=0,026) ХЭ (r=+0,37; p=0,040) АкГ (r=+0,33; p=0,046) Г-S-T (r=+0,33; p=0,047)	ОХ (r=-0,35; p=0,044)
СОД	ГП (r=+0,38; p=0,048) Каспаза-1 (r=+0,46; p=0,025)	6-СМ (r=+0,39; p=0,040)	Г-S-T (r=+0,36; p=0,043) 6-СМ (r=+0,49; p=0,011)	ХЭ (r=-0,40; p=0,048) Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,021)
Цитрат	АлАт (r=-0,48; p=0,021) IgM (r=-0,46; p=0,026) Каспаза-3 (r=-0,35;	АкГ (r=+0,51; p=0,009)	ОХ (r=+0,55; p=0,004) ЛПНП (r=+0,46; p=0,027)	АкГ (r=-0,53; p=0,006)

	p=0,048)			
$\alpha$ -токоферол		ГГТП (r=-0,45; p=0,027) Каталаза (r=-0,44; p=0,036) ЛПНП (r=-0,49; p=0,014)		АсАт (r=-0,56; p=0,003) ОХ (r=-0,31; p=0,048) I <sub>max</sub> (r=-0,49; p=0,010)
<b>Внутри- и межсистемные связи апоптотических показателей</b>				
Каспаза-1	ОХ (r=+0,37; p=0,045) IgA (r=+0,39; p=0,041) ГР (r=+0,49; p=0,019) Г-S-T (r=+0,45; p=0,031) СОД (r=+0,46; p=0,025)		АлАт (r=+0,35; p=0,043) IgG (r=+0,52; p=0,008) ЦИК (r=+0,48; p=0,017) ДК (r=+0,53; p=0,007) Цитрат (r=+0,55; p=0,004)	6-СМ (r=-0,58; p=0,001)
Каспаза-3	ГГТП (r=+0,43; p=0,035) Каталаза (r=+0,40; p=0,038) IgA (r=+0,45; p=0,030) S (r=+0,49; p=0,011)	Цитрат (r=-0,35; p=0,048) Каспаза-3 (r=-0,46; p=0,028)	IgM (r=+0,41; p=0,042) IgG (r=+0,43; p=0,033) ДК (r=+0,42; p=0,037) ГГТП (r=+0,53; p=0,010)	СОД (r=-0,46; p=0,021)

Таким образом, корреляционный анализ доказывает предположение, что мелатонин способен нейтрализовать АФК, в том числе  $O_2^{\cdot-}$  и  $OH^{\cdot}$ , [504], и тем самым уменьшать выраженность оксидативного стресса.

Анализ ассоциативных связей иммунологических показателей: IgA (5), IgM (3), IgG (9), ЦИК (4) показал, что они проявляли множественные связи с параметрами АОС и СО биомолекул, что указано в таблице 43. Вероятно, что при применении такого антиоксидантного препарата, как мелаксен, происходило изменение иммунного статуса в направлении нормы за счет уменьшения выраженности оксидативного стресса при данной патологии. Таким образом, можно сделать вывод, что существует тесная взаимосвязь показателей иммунного статуса с показателями, характеризующими не только интенсивность течения процессов СО, но и состояние системы антиоксидантной защиты.

Параметры свободнорадикального окисления: S (4), I<sub>max</sub> (3), ДК (5), АкГ (5) были тесно ассоциированы с АлАт, АсАт, а также показателями апоптотических процессов (каспаза-1, каспаза-3). Очевидно, что после комбинированной терапии с мелаксеном происходило снижение СО биомолекул, за счет проявления антиоксидантных свойств мелатонина, его способности активизировать АОС организма. Это вело к уменьшению выраженности цитолитического синдрома и процесса программируемой гибели клеток – апоптоза, что выражалось существенным снижением данных параметров.

Показатели АОС проявляли прямые как положительные, так и отрицательные внутри- и межсистемные корреляционные связи. При этом для GSH было обнаружено 5, ГР – 7, ГП – 4, Г-S-T – 5, каталазы – 5, СОД – 4, цитрата – 3,  $\alpha$ -токоферола – 3 связи. Полученные данные корреляционного анализа доказывают, что после комбинированной терапии с мелаксеном происходило урегулирование функционирования антиоксидантной защиты организма. Так, ассоциативные связи с концентрацией 6-СМ имели GSH, каталаза, СОД. Очевидно, что мелатонин, с одной стороны, снижал нагрузку на АОС за счет



своего антиоксидантного действия, а с другой стороны, стимулировал синтез антиокислительных ферментов.

Наблюдались изменения корреляционных связей апоптотических параметров: каспаза-1 (6 связей), каспаза-3 (5 связей). Следует отметить, что они были ассоциированы с показателями цитолитического синдрома (АлАт, ГГТП), уровнем б-СМ, а также с параметрами АОС и СО. По-видимому, изменение параметров, отражающих интенсивность СО и апоптотических процессов, в сторону контрольных значений свидетельствует о реализации мелатонином антиоксидантных свойств, благодаря которым он эффективно взаимодействует со свободными радикалами с образованием малотоксичных или нетоксичных, метаболизируемых в организме соединений, что в свою очередь приводит к нормализации функции печени.

Таким образом, с помощью корреляционного анализа убедительно доказана ключевая роль свободнорадикальных и апоптотических процессов в патогенезе ЛГ, развивающегося при полихимиотерапии. Сниженный уровень эндогенного мелатонина, корригируемый после проведения комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном, был тесно ассоциирован с компонентами АОС, что подтверждает результаты, полученные в данном научном исследовании, указывающие на способность мелатонина нормализовать дисбаланс в функционировании компонентов антиоксидантной защиты организма.

## Заключение

Одним из приоритетных направлений развития медицины выступают разработка диагностических тест-систем и восстановительно-корректирующей терапии, направленной на компенсацию нарушенных функций, реабилитацию и восстановление трудоспособности больных с диффузными заболеваниями печени различной этиологии. Патологические состояния печени входят в число основных причин смертности населения. Причем в последние годы отмечается тенденция к росту заболеваемости и смертности среди лиц трудоспособного возраста. Широкая распространенность диффузных заболеваний печени, с последующим переходом в цирроз, большие экономические потери, к которым приводят эти болезни, обуславливают необходимость исследования молекулярных основ патогенеза и разработки эффективных методов их диагностики и лечения.

К настоящему времени накоплен значительный объем данных относительно участия процессов СО биомолекул в развитии различных патологических состояний, включая аутоиммунные болезни, хронические воспаления, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные заболевания, болезни печени и другие [181, 207]. Окислительный стресс, или некомпенсированное образование в клетке АФК, является причиной систематического повреждения ДНК, белков и липидов, что может приводить к клеточной смерти и лежит в основе ряда патологических состояний. Функциональная активность АОС организма не всегда достаточна для детоксикации высоких концентраций АФК, образующихся при патологии, что приводит к развитию окислительного стресса. Окислительные повреждения различных структур клетки, в первую очередь мембран, негативно сказываются на энергообеспечении клеток и могут приводить к их апоптотической гибели [231, 258, 307, 369]. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о роли оксидативного стресса как одного из ключевых звеньев патогенеза ряда диффузных заболеваний печени и о возможности коррекции нарушений

метаболических процессов с помощью мелатонин-корректирующих препаратов – эпифамина и мелаксена.

Сравнительный анализ клинической картины заболевания, а также показателей инструментальных исследований при алкогольном гепатите, неалкогольном стеатогепатите, развивающимся на фоне СД2, и лекарственном гепатите при проведении базисной и комбинированной терапии с использованием эпифамина или мелаксена показал большую клиническую эффективность лечения при применении мелатонин-корректирующих препаратов. Так, после базисного лечения больных АГ общая клиническая эффективность составила 56,2%; после комбинированной терапии с эпифамином – 65,1%; после комбинированного лечения с мелаксеном – 74,3%. При приеме пациентами мелатонин-корректирующих препаратов значительно улучшались многие показатели, используемые для оценки клинической эффективности лечения. В частности, после базисного лечения болезненность в правом подреберье уменьшалась у 50% больных АГ, тогда как комбинированная терапия с эпифамином приводила к уменьшению болезненности в правом подреберье у 60% пациентов, лечение с мелаксеном – у 63% больных по сравнению с данными, полученными до проведения лечения. После базисного лечения тремор пальцев рук исчезал у 50% пациентов, что связано с временным прекращением употребления алкоголя и восстановлением работы нервной системы. Включение эпифамина в терапию способствовало исчезновению тремора пальцев рук у 60%, мелаксена – у 71,4% пациентов, что, по всей видимости, связано с позитивным действием мелатонина на деятельность нервной системы. Проявление такого клинического признака как нарушение сна после базисной терапии снижалось у 82,1% больных, после комбинированной терапии с эпифамином – у 90%, с мелаксеном – у 92,4% пациентов, что, очевидно, было сопряжено со снотворным и антидепрессивным действием мелатонина [14].

После курса базисного лечения пациентов с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, улучшение общего состояния отмечалось у 55,9% больных. У больных с НАСГ, принимавших на фоне базисного лечения мелатонин-корректирующие препараты, наблюдалось более значительное улучшение общего состояния по сравнению со стандартной терапией. Так, положительный клинический эффект при комплексной терапии, включающей эпифамин, осуществляемой при НАСГ, наблюдался у 62,1% больных, после лечения с мелаксеном – у 66,7% пациентов. Более высокая клиническая эффективность лечения была сопряжена с существенным улучшением основных клинических признаков патологии при приеме мелатонинергических препаратов. Так, после базисной терапии болезненность в правом подреберье снижалась у 48,5 % пациентов, что, очевидно, было связано с улучшением микроциркуляции, функциональной способности гепатоцитов и уменьшением на этом фоне воспалительного процесса в печени. После комбинированной терапии с эпифамином болезненность в правом подреберье уменьшалась у 53,5 % больных, с мелаксеном – у 61,5 % пациентов. Явно выраженный положительный эффект комбинированной терапии с применением мелатонин-корректирующих препаратов наблюдался при анализе психо-эмоционального состояния пациентов. Так, проведение базисного лечения при НАСГ приводило к уменьшению общей утомляемости у 81,8%, нарушения сна - у 78,7 % пациентов по сравнению с результатами до лечения. У больных НАСГ, принимавших на фоне базисного лечения эпифамин, общая утомляемость снижалась у 92,8%, улучшение сна - у 89,2% больных. При приеме мелаксена на фоне стандартного лечения данные клинические признаки уменьшались у 92,4 % пациентов. Очевидно, мелатонин, коррекция уровня которого происходила под действием применяемых препаратов, позитивно влиял на астено-вегетативные расстройства [14, 420]. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в соответствии с которыми мелатонин, являясь естественным хронобиотиком, синхронизирующим циркадианные биоритмы, способен обеспечивать нормализацию различных сторон деятельности ЦНС.

Анксиолитический эффект мелатонина реализуется за счет модулирующего влияния на ГАМК-ергические рецепторы, приводящего к повышению сродства ГАМК-рецепторов к ГАМК [573].

У больных с ЛГ после проведения базисного лечения улучшение общего состояния наблюдалось у 66,7%, при комбинированной терапии с эпифамином – у 78,3 %, а с мелаксеном – у 82,3%. Так, в 1-ой группе больных болезненность в правом подреберье снижалась у 40 %, гепатомегалия - у 42,9% пациентов. Во 2-ой группе при включении в комплексную терапию эпифамина болезненность в правом подреберье и гепатомегалия уменьшались у 46,1 % и 59 % больных, при комбинированном лечении с мелаксеном у 51,7 % и 74,3 % соответственно. Такие же тенденции прослеживались и при анализе других клинических показателей. Таким образом, можно сделать вывод, что терапия, корригирующая уровень мелатонина в организме, благоприятно влияла на динамику клинической картины. Следует отметить, что при проведении комбинированной терапии мелаксен обладал более выраженным клиническим действием, чем эпифамин. Очевидно, что мелаксен, содержащий непосредственно в своем составе мелатонин, действовал быстрее, чем эпифамин, эффект которого опосредуется через стимуляцию синтеза мелатонина эпифизом.

Существенных изменений показателей электрокардиографического исследования и УЗИ печени у пациентов исследуемых групп после проведения базисного лечения и комбинированной терапии с применением мелатонин-корригирующих препаратов не наблюдалось. Вместе с тем, включение в схему лечения эпифамина и, особенно, мелаксена приводило к появлению более выраженной положительной динамики изменений ЧСС, что согласуется с имеющимися литературными данными о способности мелатонина оказывать кардиопротекторное действие [164, 599], благоприятное влияние на сосудистый тонус за счет воздействия на адренергические и пептидергические окончания периваскулярных нервов [365, 667], а также на адренергические рецепторы или вторичные мессенджеры в цепи адренергической стимуляции мышечного

сокращения [350, 667]. Следует отметить, что после проведения комбинированной терапии с мелаксенон наблюдалась более заметная тенденция к снижению АД у больных АГ по сравнению с базисным лечением и терапией, включающей эпифамин. По-видимому, для коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина требуется более продолжительное время по сравнению с мелаксенон, в состав которого непосредственно входит мелатонин. При приеме мелаксена мелатонин, по-видимому, достаточно быстро связывается с рецепторами гладкомышечных клеток и эндотелия сосудов и более позитивно влияет на метаболические процессы в миокарде.

Положительный эффект комбинированного лечения с применением мелатонин-корректирующих препаратов подтверждался клинико-биохимическими показателями, оцениваемыми при исследуемых патологических состояниях. Проведение комбинированной терапии, включающей эпифамин и мелаксен, у больных с лекарственным гепатитом оказывало благоприятное влияние на показатели общего, биохимического анализов крови, печеночные пробы, характеризующие активность воспалительного процесса и синтезирующую функцию печени, степень выраженности цитолитического повреждения гепатоцитов (АлАт, АсАт, ГГТП, ХЭ). По-видимому, применение на фоне базисной терапии мелатонин-корректирующих препаратов усиливало гепатопротекторное действие за счет антиоксидантного и иммуностимулирующего эффекта мелатонина.

Включение мелатонин-корректирующих препаратов в лечение положительно влияло на липидный обмен, по всей видимости, за счет их гиполипидемического действия. Следует отметить, что мелатонин уменьшает содержание липопротеидов низкой плотности, вызывает снижение индекса атерогенности, а также ингибирует действие оксида азота, занимающее ведущее место в патогенезе атеросклероза [344, 522]. Это согласуется с полученными нами данными, в частности, оценкой индекса атерогенности у пациентов с НАСГ, развивающимся на фоне СД2. Так, после базисного лечения данный показатель у пациентов

уменьшался в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, после комбинированной терапии с эпифамином – в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза, после комбинированного лечения с мелаксеном – в 2,1 ( $p < 0,05$ ) раза.

Прослеживались и положительные тенденции в изменении ряда индикаторов углеводного метаболизма. Так, при НАСГ это было характерно для таких показателей как концентрации С-пептида, инсулина, уровня глюкозы натощак и постпрандиального уровня глюкозы, что, по-видимому, было связано со способностью мелатонина увеличивать пролиферацию и неогенез  $\beta$ -клеток, улучшать чувствительность к инсулину и уменьшать степень выраженности окислительного стресса [125].

Вероятно, за счет своей антиоксидантной активности мелатонин, уровень которого корректируется под действием эпифамина и мелаксена, усиливал гепатопротекторное и антиокислительное действие базисной терапии. Очевидно, применение мелатонин-корректирующих препаратов способствует более быстрой клинической ремиссии больных с заболеваниями печени различной этиологии. Побочных эффектов при применении эпифамина или мелаксена на фоне базисной терапии исследуемых нарушений функционирования печени не наблюдалось.

Иммуноферментный анализ содержания 6-сульфатоксимелатонина, уровень которого в моче может служить объективным критерием содержания мелатонина в организме [305], выявил существенное снижение концентрации гормона у больных исследуемых групп. Так, содержание 6-сульфатоксимелатонина у пациентов с АГ было снижено в среднем в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза, у больных НАСГ – в 1,2 ( $p < 0,05$ ), у пациентов с ЛГ – в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем. По-видимому, снижение содержания основного метаболита мелатонина было связано с биотрансформацией гормона в ходе его взаимодействия с АФК с образованием его различных производных -3-гидроксимелатонина, N[1]-ацетил-N[2]-формил-5-метоксикинумарина и других [511, 528, 541, 570]. После проведения базисной терапии наблюдалось возрастание уровня 6-сульфатоксимелатонина в организме пациентов АГ и ЛГ,

однако, значительно менее выраженное, чем после комбинированного лечения, включающего прием эпифамина и мелаксена. У большинства больных НАСГ после стандартного лечения достоверных изменений содержания 6-гидроксимелатонинсульфата выявлено не было. При применении мелатонин-корректирующих препаратов наблюдалось приближение содержания основного метаболита мелатонина к контрольным значениям у больных всех исследуемых групп. Поскольку профиль экскреции 6-сульфатоксимелатонина в моче позволяет судить об уровне мелатонина в организме, то, исходя из полученных результатов, можно сделать заключение о коррекции содержания гормона в организме пациентов при использовании в ходе лечения эпифамина или мелаксена.

Применение мелатонин-корректирующих препаратов оказывало существенное влияние на состояние иммунного статуса при АГ, НАСГ, развивающимся на фоне СД2 и ЛГ, возникающем при противотуберкулезной полихимиотерапии. Проведенные нами исследования выявили изменения ряда показателей иммунного статуса у больных – IgA, IgM, IgG, а также содержания ЦИК. Изменения в функционировании иммунной системы могут приводить к нарушениям других систем организма, усугублению текущего процесса, развитию осложнений, в основе которых лежат агрессивные иммунопатологические реакции [58, 102]. У большинства пациентов с АГ уровень ЦИК в крови превышал норму в среднем в 4,7 ( $p < 0,05$ ) раза, что свидетельствовало, по-видимому, о глубоком поражении макрофагов печени, приводящем к развитию хронического эндотоксикоза и иммунокомплексного синдрома. У больных НАСГ содержание ЦИК превышало контрольный уровень в среднем в 3,2 ( $p < 0,05$ ) раза, у пациентов с ЛГ – в 4,9 ( $p < 0,05$ ) раза. Как известно, уровень ЦИК в крови может служить как показатель развития различных воспалительных процессов в организме, а также параметр активности течения аутоиммунных заболеваний. Кроме того, у больных всех групп имела место гипериммуноглобулинемия А, М, G.



Обнаруженные иммунопатологические сдвиги наряду с другими клиническими и биохимическими показателями свидетельствуют о необходимости включения в программу лечения больных с данными заболеваниями иммуномодулирующих и антиоксидантных препаратов. Как показали наши исследования, включение мелатонин-корректирующих препаратов в комплексную терапию обеспечивало более существенное снижение уровня ЦИК по сравнению с базисным лечением. Так, после проведения базисной терапии больных АГ содержание ЦИК снижалось в 1,7 ( $p < 0,05$ ) раза, после комбинированного лечения, включающего эпифамин, – в 2,1 ( $p < 0,05$ ) раза, после лечения с мелаксеном – в 2,8 раза, по сравнению с соответствующим показателем до лечения. Проведение базисного лечения больных НАСГ приводило к снижению концентрации ЦИК в крови в среднем в 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза, что, по-видимому, было связано с положительными сдвигами в протекании метаболических процессов в организме в результате компенсаторных изменений, происходящих под влиянием сахаропонижающей терапии и гепатопротекторов. При включении эпифамина в базисную терапию уровень ЦИК уменьшался в среднем в 1,5 ( $p < 0,05$ ) раза, при приеме мелаксена – в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза. Комбинированная терапия, включающая мелатонин-корректирующие препараты, способствовала более существенному изменению содержания ЦИК в направлении нормы и у больных ЛГ. Так, в данном случае после базисного лечения уровень ЦИК снижался на 43,5% ( $p < 0,05$ ), после комбинированной терапии, включающей эпифамин – на 68,1% ( $p < 0,05$ ), после терапии с использованием мелаксена – на 73,2% ( $p < 0,05$ ). Под действием мелатонин-корректирующих препаратов происходило также более существенное изменение содержания иммуноглобулинов в сторону контрольных значений, что согласуется с имеющимися данными о тесной взаимосвязи иммунной системы с нейроэндокринной системой, неотъемлемой составляющей которой является эпифиз и синтезируемые им гормоны [261, 73]. Полученные результаты соотносятся с литературными данными относительно способности мелатонина

оказывать иммуномодулирующие действие, в основе которого может быть несколько механизмов, включая прямое воздействие через специфические рецепторы: МТ1, МТ2 и МТ3, на функцию лимфоидных органов и клеточных элементов крови [161, 394].

Известно, что в развитии многих заболеваний значительную роль играет активация свободнорадикальных процессов [4, 80, 143]. Функциональная активность АОС организма не всегда достаточна для детоксикации высоких концентраций АФК, образующихся при патологии, что может привести к развитию окислительного стресса. При этом происходят окислительные повреждения различных структур клеток, в первую очередь, мембран, что негативно сказывается на энергообеспечении клеток и может приводить к их гибели [184, 207, 231]. Окислительный стресс, согласно современным представлениям, является универсальным ключевым механизмом патогенеза широкого спектра заболеваний на клеточном уровне, включая ишемические повреждения тканей, аутоиммунные болезни, хронические воспаления, болезни печени и другие патологии, являющиеся проблемой чрезвычайной медицинской и социальной значимости. В рамках запланированных задач нашего исследования нами была осуществлена оценка уровня свободнорадикального окисления, степени развития апоптоза, активности ферментов АОС, содержания неферментативных антиоксидантов и активности ферментов – поставщиков NADPH для работы антиоксидантной глутатионовой системы у больных АГ, НАСГ, возникающим при СД2, и ЛГ, развивающимся на фоне противотуберкулезной полихимиотерапии. Полученные результаты свидетельствуют, что одним из ведущих механизмов патогенеза данных заболеваний является интенсификация свободнорадикальных процессов, сопровождающаяся изменением активности ряда ферментных систем организма. В ходе проведенных исследований показано, что при данных патологических состояниях в организме пациентов наблюдается усиление процессов СО и накопление продуктов липопероксидации, что позволяет отнести эти заболевания

к группе свободнорадикальных патологий. О значительной интенсификации образования АФК при исследуемых патологических состояниях свидетельствовали параметры биохемилюминесценции – светосумма и интенсивность максимальной вспышки, отражающие степень развития свободнорадикальных процессов, накопление диеновых конъюгатов – первичных продуктов ПОЛ, снижение активности аконитатгидратазы, маркеры активации процессов апоптоза.

Следует подчеркнуть, что при всех исследуемых диффузных заболеваниях печени на фоне значительного возрастания в сыворотке крови больных параметров биохемилюминесценции –  $S$  и  $I_{max}$ , отражающих интенсивность СО биомолекул, такой показатель, как  $tg\alpha_2$ , характеризующий степень функционирования АОС организма, был понижен в 1,3 – 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению с контролем. Это свидетельствует об истощении компенсаторных механизмов, направленных на снижение скорости свободнорадикальных процессов, что, очевидно, могло играть существенную роль в нарушении антиоксидантного статуса при патологии. Это указывает на целесообразность включения в схему лечения антиоксидантной терапии. После комбинированного лечения с эпифамином или мелаксеном происходило более существенное снижение  $S$  и  $I_{max}$  и возрастание  $tg\alpha_2$  по сравнению с базисной терапией. Очевидно, включение данных препаратов в лечение способствовало усилению АОС организма, что могло оказывать позитивный эффект на свободнорадикальный гомеостаз, а, следовательно, и на клиническую картину при изучаемых патологических состояниях. По-видимому, наблюдаемые эффекты эпифамина и мелаксена объясняются повышением уровня мелатонина в организме. Как известно, снижение интенсивности свободнорадикальных процессов может быть результатом проявления антиоксидантных свойств мелатонина в организме [77]. Нейтрализация свободных радикалов под действием мелатонина приводит к потере ими агрессивности и токсичности. Кроме того, мелатонин способен стимулировать активность АОС организма. При этом

чрезвычайно важное значение может иметь амфифильность мелатонина и его способность проникать во все органы и ткани [162].

О развитии оксидативного стресса в организме пациентов с АГ, НАСГ и ЛГ свидетельствовало также повышение уровня ДК, представляющих собой токсичные соединения, оказывающие повреждающее действие на клеточные структуры. У больных наблюдалось возрастание содержания ДК в сыворотке крови по сравнению с показателем в контрольной группе в 1,6 – 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза, что указывает на усиление протекания ПОЛ при патологии. После проведения базисного лечения у больных происходило уменьшение уровня ДК в сыворотке крови в 1,3 – 1,4 ( $p < 0,05$ ) раза по сравнению данными, полученными до лечения. По-видимому, действие гепатопротекторов и метаболической терапии приводило к улучшению микроциркуляции и функциональной способности гепатоцитов, что сопровождалось уменьшением воспалительного процесса в печени. При включении эпифамина или мелаксена в базисную терапию наблюдалось более значительное изменение содержания ДК в сторону нормы, что, очевидно, было взаимосвязано с коррекцией уровня мелатонина под влиянием данных препаратов. Полученные результаты согласуются с данными литературы, что действие мелатонина, как эффективного антиоксиданта, может проявляться, в частности, в обрыве реакций ПОЛ в фосфолипидном слое биомембран [4]. Таким образом, применение комбинированной терапии с использованием мелатонин-корректирующих препаратов, по-видимому, обеспечивало значительное возрастание антиоксидантного потенциала в организме больных за счет повышения уровня мелатонина, что проявлялось в снижении интенсивности ПОЛ, оцениваемой по содержанию ДК.

В качестве одной из наиболее чувствительных мишеней действия АФК в условиях окислительного стресса может выступать АкГ, активность которой подавляется супероксидным анион-радикалом и другими радикалами [409]. В зависимости от величины и продолжительности окислительного стресса, АкГ может подвергаться обратимому ингибированию вследствие окисления остатков

цистеина, а в дальнейшем необратимой инактивации через разборку  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  кластера, карбонилирование и АТР-зависимую деградацию [447]. При всех исследованных нами формах поражения печени наблюдалось существенное снижение активности АкГ, что, очевидно, было связано с чрезмерной генерацией АФК. Полученные нами результаты согласуются с точкой зрения, что АкГ может выступать в качестве чувствительной мишени действия свободных радикалов [619]. Следует отметить, что оценка активности АкГ в сыворотке крови больных АГ, НАСГ и ЛГ, как мишени действия свободных радикалов, в нашем исследовании была проведена впервые и свидетельствует о целесообразности определения активности данного фермента в качестве маркерного показателя интенсивности свободнорадикальных процессов в практике клинической лабораторной диагностики. Использование нового энзимопоказателя может иметь существенное значение, как для понимания происходящих нарушений метаболизма, так и повышения информативности о степени развития негативных процессов при патологии и эффективности проводимого лечения. Прием мелаксена и эпифамина способствовал более выраженной нормализации активности АкГ, чем в случае применения только базисной терапии. Очевидно, повышение активности аконитазы может объясняться более значительным снижением уровня АФК, связанным с положительным эффектом мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз организма, что обеспечивало защиту молекулы АкГ от негативного действия свободных радикалов. Таким образом, согласно полученным результатам, определение активности АкГ, изменения которой в сыворотке крови могут быть соотнесены с изменениями параметров БХЛ и уровня ДК, можно использовать в качестве информативного показателя выраженности оксидативного стресса и состояния АОС организма, т.е. может иметь важное диагностическое значение.

Более выраженное повышение активности АкГ при лечении с мелатонин-корректирующими препаратами было взаимосвязано с большей степенью снижения содержания цитрата в сыворотке крови пациентов с АГ и ЛГ. Что

касается больных НАСГ, то в результате проведенных нами исследований взаимосвязи между содержанием цитрата и активностью АкГ в сыворотке крови пациентов в большинстве случаев выявлено не было. Возможно, это сопряжено с существенными метаболическими сдвигами при СД2. Как известно, в превращения цитрата могут быть вовлечены помимо АкГ и другие ферменты, например, цитратсинтаза, АТФ-цитратлиаза, активность которых может значительно изменяться при СД. Так, известно, что в организме больных с СД2 с ожирением происходит активация липогенеза, в регуляцию которого непосредственно вовлечена АТФ-цитратлиаза [21]. В результате проведенных нами исследований выявлено, что при НАСГ, протекающем на фоне СД2, содержание цитрата в сыворотке крови у большинства пациентов уменьшалось почти вдвое по сравнению с контролем, что могло быть взаимосвязано с торможением цикла трикарбоновых кислот в связи с низким уровнем оксалоацетата и ингибированием цитратсинтазы, катализирующей начальную стадию цикла Кребса, а именно образование цитрата [74]. Вместе с тем, было выявлено, что у небольшой части больных НАСГ (~ 20%) все же имело место увеличение содержания цитрата в сыворотке крови (в среднем в 1,6 раза по сравнению с нормой) на фоне снижения активности АкГ. Накапливающийся при ингибировании АкГ субстрат фермента – цитрат, способен проявлять антиоксидантные свойства за счет хелатирования прооксидантных ионов металлов переменной валентности, что, в частности, может способствовать ограничению образования гидроксильного радикала в реакции Фентона и защите АкГ от инактивации. Следует подчеркнуть, что во всех случаях при включении эпифамина и мелаксена в терапию имели место более значительные изменения содержания цитрата в сторону контроля по сравнению с базисным лечением, что могло быть связано с адаптационными свойствами мелатонина при окислительном стрессе.

Имеются данные, что свободные радикалы, чрезмерно генерируемые при окислительном стрессе, не только обладают прямым повреждающим действием

на сосуды, ткани и органы, но и, активируя транскрипционный фактор Nf-kB, вызывают ускорение апоптоза [290, 461]. Кроме того, действие токсических соединений, включая этанол и различные ксенобиотики, приводит как к высвобождению митохондриального цитохрома С, так и экспрессии Fas–лиганда, что ведет к печеночному апоптозу [413, 417]. В связи с тем, что фрагментация молекулы геномной ДНК является главным признаком апоптотической гибели клеток, нами было исследовано структурное состояние ДНК лимфоцитов методом электрофореза в агарозном геле. Установлено, что ДНК лимфоцитов крови доноров контрольной группы представлена полосой с молекулярной массой 10 000 п.н., что характерно для ее интактной формы. При патологии во всех группах пациентов были обнаружены фрагменты ДНК, образующие так называемые «апоптозные лестницы», что свидетельствует о развитии процессов программируемой клеточной гибели. Как известно, подобные фрагменты возникают при действии апоптоз-специфических нуклеаз [538]. После проведения базисной терапии наблюдалось снижение степени фрагментации ДНК, свидетельствующее о положительном эффекте лечения. Включение эпифамина или мелаксена в терапию приводило к значительному уменьшению степени фрагментации ДНК, что может быть свидетельством антиапоптотического эффекта данных препаратов. В образцах крови больных, принимавших эпифамин или мелаксен на фоне базисной терапии, фрагментация ДНК в большинстве проб практически не визуализировалась. Действие мелатонина сопряжено с его способностью растворяться в воде и липидах, проникать через мембраны и сосудисто-тканевые барьеры, накапливаясь в ядрах клеток, что обеспечивает его участие в защите ДНК от свободнорадикального повреждения. Кроме того, данный гормон также обладает способностью нейтрализовывать АФК: гидроксильный радикал, радикал оксида азота [509, 511, 598]. Сочетание этих механизмов, по-видимому, обеспечивает выраженный антиапоптотический эффект мелатонин-корректирующих препаратов. Следует подчеркнуть, что полученные результаты соответствуют данным по изменению параметров БХЛ,

содержания ДК и активности АкГ при исследуемых патологиях печени, при проведении стандартного лечения и приеме эпифамина и мелаксена на фоне базисной терапии.

Результаты оценки фрагментации ДНК лейкоцитов крови пациентов с АГ, НАСГ и ЛГ соответствуют данным по изменению активности каспаз 1 и 3. Известно, что развитие апоптоза сопряжено с активацией каскада внутриклеточных цистеиновых протеаз – каспаз, которые могут приводить к реорганизации цитоскелета, нарушению структуры, репликации и репарации ДНК, прерыванию сплайсинга, разрыву ядерных структур и дезинтеграции клеток на апоптотические тела. Так, например, с участием каспазы-3 подвергается протеолизу ингибитор ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК. Каспаза 1 способствует активации ряда эффекторных каспаз, и в частности, каспазы 3, последняя в дальнейшем способна к автокатализу, и как следствие, стимуляции ряда других протеаз семейства каспаз. После этого процесс программируемой клеточной гибели становится необратимым [241]. После проведения базисной терапии наблюдалось изменение активности исследуемых каспаз в сторону нормы, что, по-видимому, было взаимосвязано со снижением скорости генерации АФК и, как следствие, торможением процессов апоптоза под влиянием проводимого лечения. Однако, применение комбинированной терапии, включающей мелатонин-корректирующие препараты, приводило во всех случаях к более выраженному снижению активности каспаз, что, по-видимому, было связано с коррекцией уровня мелатонина. Известно, что мелатонин снижает уровень окислительного повреждения липидов, ДНК и митохондрий [503], увеличивает экспрессию антиапоптотических генов группы Bcl-2, защищая клетки от апоптоза [516]. Очевидно, при терапии с эпифамином и мелаксеном имело место торможение свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствуют параметры БХЛ и уровень ДК, что и приводило к меньшей степени активации процессов апоптоза.



Интенсификация процессов СО и апоптоза при всех исследуемых патологических состояниях сопровождалась снижением антиоксидантного потенциала организма больных, сопряженным с существенными модификациями функционирования компонентов АОС.

В ходе наших исследований были выявлены изменения активности СОД и каталазы, отвечающих за эффективную элиминацию первичных АФК –  $O_2^{\bullet-}$  и  $H_2O_2$ , и играющих важную роль в защите клеток от эндогенных СР, так как именно эти АФК возникают в первую очередь и могут давать начало другим, более реакционноспособным формам [353, 355]. При ЛГ и АГ активность СОД в сыворотке крови, увеличивалась по сравнению с нормой. При оксидативном стрессе повышение активности СОД может быть связано с отщеплением ингибиторных фрагментов и конформационными модификациями молекулы фермента. По всей видимости, повышение активности СОД может играть адаптивную роль при усиленной генерации АФК, так как данный фермент катализирует реакцию превращения высокореакционноспособного  $O_2^{\bullet-}$  в менее активный  $H_2O_2$  [356]. Однако, при НАСГ, развивающимся при СД2, ферментативная активность уменьшалась относительно контроля, что, вероятно, могло быть связано как с истощением активности данного компонента АОС, так и с повышением уровня антител к СОД в условиях патологии, сопровождающимся угнетением функционирования фермента [13]. В сыворотке крови больных АГ, НАСГ и ЛГ до применения базисной терапии активность каталазы была повышена еще в большей степени, чем СОД, что, вероятно, было связано с необходимостью нейтрализации  $H_2O_2$ , образующегося при окислительном стрессе. Следует отметить, что, активация каталазы при алкогольной интоксикации может иметь значение, во-первых, для ускорения процессов окисления алкоголя при его высоких концентрациях, и во-вторых, для обезвреживания пероксидов, концентрация которых может при этом резко возрасть. Полученные данные отражают мобилизацию данного компонента ферментативного звена АОС в ответ на развитие оксидативного стресса в

организме пациентов. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что разнонаправленные изменения активностей СОД и каталазы при НАСГ указывают на дисбаланс в данном звене АОС, так как эти ферменты катализируют сопряженные реакции, обеспечивающие элиминацию первичных АФК. После базисной терапии ХАГ активность СОД незначительно уменьшалась, а после стандартного лечения пациентов с НАСГ наблюдалась тенденция к повышению активности данного фермента. Однако проведение базисной терапии при ЛГ не приводило к достоверным изменениям активности СОД. Согласно полученным результатам, при всех исследуемых патологических состояниях прием эпифамина и мелаксена способствовал более существенному изменению активности СОД в сторону нормы, что, по-видимому, может быть связано с антиоксидантным действием мелатонина, уровень которого корректируется при назначении этих препаратов. После базисной терапии АГ, НАСГ и ЛГ существенных изменений активности каталазы в сыворотке крови пациентов не наблюдалось. Применение мелатонин-корректирующих препаратов приводило к более выраженным изменениям ферментативной активности. Однако можно предполагать, что, по всей видимости, на активность данного фермента мог влиять ряд факторов, способных оказывать разнонаправленное воздействие. С одной стороны, сохраняющаяся повышенная активность фермента могла быть следствием его индукции, с другой стороны, согласно имеющимся сведениям, под действием мелатонина при окислительном стрессе происходит защита молекулы каталазы от АФК [354, 670], что указывает на возможность более стабильного функционирования каталазы при проведении комбинированной терапии с применением препаратов, корректирующих содержание мелатонина в организме. Вместе с тем, при снижении интенсивности СО биомолекул под влиянием антиоксидантной терапии, очевидно, могла уменьшаться концентрация субстрата каталазы –  $H_2O_2$ , скоростью диффузии которого к активному центру лимитируется активность фермента [356]. По-видимому, выявленные различия ферментативной активности в сыворотке крови пациентов после проведения стандартного лечения и

комбинированной терапии с применением препаратов, корректирующих уровень мелатонина, определяются суммарным эффектом действия вышеуказанных факторов.

Важная роль в защите организма от повреждающего действия СР, принадлежит глутатионовой АОС, предупреждающей неблагоприятные последствия оксидативного стресса. Глутатионовая система принимает ведущее участие в поддержании в тканях тиол-дисульфидного равновесия, которое необходимо для осуществления таких процессов жизнедеятельности клеток, как работа мембранных структур, деятельность цитоскелета, клеточное деление, регуляция активности гормонов пептидной структуры [502]. В этой связи в ходе нашей работы было уделено значительное внимание исследованию функционирования компонентов данного звена антиоксидантной защиты. Антиоксидантные свойства GSH определяются непосредственным взаимодействием его со свободными радикалами и гидропероксидами [137, 617]. Следует также отметить, что образующийся в ходе ГР- реакции GSH выполняет роль акцептора гидроксильного радикала, супероксида, а также является ингибитором процессов ПОЛ на стадии разветвления цепи. Кроме того, данный тиол может функционировать в качестве субстрата для ферментов глутатионовой АОС, участвующих в детоксикации АФК. ГП – один из ключевых ферментов, обеспечивающих утилизацию АФК и продуктов пероксидации [450]. Г-S-T является важным компонентом антиоксидантной защиты, осуществляющим детоксикацию продуктов, образующихся при метаболизме ксенобиотиков [633]. Действие патогенетических факторов, лежащих в основе исследуемых повреждений печени, сопряжено со значительной активацией процессов СО, что приводит к истощению уровня GSH. В частности, микросомальные ферменты монооксигеназной системы, активируемые при АГ и ЛГ, обладают способностью превращать ксенобиотики в высокотоксичные метаболиты [431]. Хроническая гипергликемия, являющаяся основным и объективным признаком наличия СД2,

тесно связана с развитием оксидативного стресса, взаимосвязанного с чрезмерной генерацией СР, которые обладают прямым повреждающим действием на сосуды, ткани и органы, а также, активируя транскрипционный фактор Nf-kB, вызывают тромбогенную трансформацию сосудистой стенки, нарушение секреции инсулина и ускорение апоптоза [20]. Полученные нами результаты свидетельствуют о дефиците GSH у пациентов с АГ, НАСГ и ЛГ. Уровень GSH снижался в среднем вдвое по сравнению с контрольной группой. Низкий уровень восстановленного глутатиона, очевидно, был взаимосвязан с его усиленным расходом при интенсификации СО при патологии. Значительное уменьшение количества GSH свидетельствует о снижении способности печени эффективно осуществлять детоксикацию. Комбинированная терапия с эпифамином и мелаксеном во всех случаях приводила к более существенной реверсии уровня GSH в сторону нормы по сравнению с базисным лечением. Более существенное возрастание уровня GSH на фоне приема мелатонинергических препаратов, очевидно, могло оказывать позитивный эффект не только за счет протективного действия на гепатоциты, но и повышения антиоксидантного статуса организма больных в целом. Прием мелаксена обеспечивал более выраженную коррекцию содержания GSH. Так, комбинированное лечение, пациентов с АГ, включающее данный препарат, восстанавливало концентрацию GSH практически до нормального уровня, что, очевидно, связано с мощным антиоксидантным эффектом мелатонина и его положительным действием на глутатионовую систему. По-видимому, за счет реализации антиоксидантного действия мелатонина происходило уменьшение степени развития оксидативного стресса и, как следствие, расходования восстановленной формы глутатиона в организме больных. Согласно имеющимся данным, мелатонин может способствовать восстановлению окисленной формы данного тиола [498]. В этой связи следует подчеркнуть, что возрастание концентрации GSH коррелировало с изменениями содержания 6-гидроксимелатонинсульфата, выступающего в качестве объективного критерия уровня мелатонина [305].

Известно, что скорость редокс-циклирования глутатиона, то есть NADPH-зависимого восстановления GSSG под действием ГР, намного превосходит возможности синтеза GSH в тканях [138]. Это согласуется с полученными нами данными о более значительном возрастании активности ГР при приеме эпифамина и мелаксена по сравнению с традиционным лечением. Повышение активности данного фермента, катализирующего восстановление глутатиона, может иметь адаптивное значение для формирования ответной реакции на развитие оксидативного стресса, так как это способствует возрастанию активности ГП, непосредственно участвующей в обезвреживании продуктов реакций СО при участии GSH. В этой связи следует отметить, что после проведения комбинированной терапии, включающей прием эпифамина или мелаксена, также происходило наиболее выраженное увеличение активности ГП.

Вместе с тем, следует отметить, что в ходе наших исследований было выявлено увеличение активности ГР и ГП в сыворотке крови больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, а также с ЛГ, вызванном приемом противотуберкулезных препаратов, до назначения гепатопротекторов. Вероятно, стимуляция ГП – ГР системы происходила в ответ на избыточное образование АФК в условиях развивающегося оксидативного стресса. Однако, очевидно, что уменьшение уровня GSH не могло быть уравновешено даже повышением активности ГР, наблюдающимся при данных патологических состояниях. В то же время, у пациентов с АГ активности ГП и ГР до назначения терапии имели пониженные значения. Так, активность данных ферментов, выраженная в виде Е на мл сыворотки, падала в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) и 1,2 ( $p < 0,05$ ) раза соответственно по сравнению с контрольным уровнем. Падение активности ГП, очевидно, было взаимосвязано со снижением при хронической алкогольной интоксикации содержания селена, необходимого для синтеза аминокислоты – селеноцистеина, играющего важную роль в катализе [428]. Это свидетельствует о том, что ГП-ГР система оказывается наиболее уязвимым звеном АОС в условиях развития АГ. В этой связи следует отметить, что, оценка активностей ГП и ГР при

анализе соответствующих ферментных констелляций могла бы способствовать дифференциальной диагностике заболеваний печени различной этиологии. В то же время полученные результаты указывают, что антиоксидантная терапия при АГ, направленная на коррекцию дисбаланса в глутатионовой АОС, очевидно, является весьма целесообразным подходом в разработке новых биомедицинских технологий лечения при данной патологии. Следует подчеркнуть, что при всех исследуемых патологических состояниях лечение с применением мелатонин-корректирующих препаратов способствовало повышению активности ГП - ГР системы в большей степени, чем в группах больных, находящихся на базисном лечении. Это согласуется с литературными сведениями о том, что антиоксидантная активность мелатонина может быть связана с его действием на антиоксидантные ферменты путем активации или стимуляции их синтеза [520, 596].

При поступлении пациентов с АГ, НАСГ и ЛГ в стационар было выявлено снижение активности Г-S-T в сыворотке крови по сравнению с нормой. По всей видимости, падение активности Г-S-T, использующей восстановленный глутатион для обезвреживания токсикантов, было сопряжено со значительными затратами данного тиола в ответ на избыточное образование АФК при развитии окислительного стресса, индуцированного при патологии. Это предположение согласуется с полученными данными о повышении активности Г-S-T на фоне возрастания уровня GSH после проведения лечения. Применение эпифамина и, особенно, мелаксена в ходе лечения обеспечивало наиболее значительное возрастание активности Г-S-T по сравнению с группами пациентов, находящихся на базисном лечении. Полученные результаты согласуются с данными из литературы о способности мелатонина активировать Г-S-T. Таким образом, одним из эффектов действия мелатонина является предотвращение чрезмерного образования АФК путем интенсификации реакции, катализируемой Г-S-T, благодаря которой происходит обезвреживание органических соединений почти всех классов, биотрансформация ксенобиотиков [617].

В роли лимитирующего фактора для функционирования глутатионового звена АОС, отвечающего за обезвреживание  $H_2O_2$  и органических пероксидов, включая пероксиды липидов, выступает уровень NADPH. Постоянное поступление NADPH – восстановленного эквивалента, используемого ГР для восстановления окисленного глутатиона, необходимо для поддержания данного звена антирадикальной защиты. Одним из основных поставщиков NADPH для ГП-ГР системы является пентозофосфатный путь, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ [29]. Альтернативным источником NADPH может быть реакция, катализируемая НАДФ-ИДГ [104]. При исследуемых диффузных поражениях печени происходило падение активности как Г6ФДГ, так и НАДФ-ИДГ, что могло быть сопряжено с нарушениями процессов тканевого дыхания при патологии, приводящих к подавлению функционирования ферментов окислительного метаболизма. Снижение активности NADPH-генерирующих ферментов, по-видимому, могло негативно сказаться на функционировании глутатионовой АОС. Базисная терапия приводила к повышению активностей, исследуемых NADPH-продуцирующих ферментов. Однако комбинированное лечение с эпифамином и мелаксеном обеспечивало более существенное возрастание активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. По всей видимости, применение мелатонин-корректирующих препаратов в комплексной терапии способствовало нивелированию истощения собственного антирадикального потенциала и нормализации свободнорадикального гомеостаза организма. Это могло оказывать корректирующее воздействие на сдвиги метаболизма, индуцированные патологическим состоянием, и сопровождаться изменениями активности исследуемых ферментов окислительного метаболизма в направлении нормы. Возрастание активностей NADPH-продуцирующих ферментов при проведении комбинированного лечения, включающего эпифамин или мелаксен, очевидно, отражалось на скорости образования GSH под действием ГР. Снижение дефицита данного тиола, как следствие, позитивно влияло на функционирование ГП и Г-S-T. Таким образом, возрастание активностей NADPH-

генерирующих ферментов в результате коррекции уровня мелатонина может быть важным фактором, обеспечивающим улучшение эффективности работы глутатионовой АОС организма в целом.

При исследуемых патологических состояниях наблюдалось снижение уровня  $\alpha$ -токоферола – важнейшего антиоксиданта неферментативного звена АОС, локализованного преимущественно в гидрофобном слое биологических мембран и обладающего способностью прерывать цепные свободнорадикальные реакции в процессе перекисления ненасыщенных жирных кислот в мембранах, предупреждать атерогенные изменения ЛПНП. Так, во всех группах больных с диффузными заболеваниями печени содержание  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови до назначения лечения было в 1,5-1,9 ( $p < 0,05$ ) раза ниже по сравнению с контрольным уровнем, что, по-видимому, сопряжено с повышенным расходом его восстановленной формы в процессах детоксикации активных кислородных метаболитов. Комбинированная терапия с эпифамином и мелаксеном приводила к более существенному возрастанию содержания данного антиоксиданта по сравнению с базисным лечением. Так, например, если после проведения базисного лечения пациентов с АГ уровень  $\alpha$ -токоферола увеличивался на 12,5% ( $p < 0,05$ ), то включение в терапию эпифамина или мелаксена приводило к возрастанию содержания данного антиоксиданта на 50,5% и 55,7% ( $p < 0,05$ ), соответственно. По-видимому, благоприятное влияние мелатонин-корректирующих препаратов на состояние свободнорадикального гомеостаза в организме больных способствовало нормализации окислительно-восстановительных процессов, что отражалось на интенсивности рецикла  $\alpha$ -токоферола, обеспечивающего поддержание данного антиоксиданта в активной восстановленной форме [151]. Изменение концентрации  $\alpha$ -токоферола в направлении нормы, очевидно, могло иметь положительное значение для защиты клеточных мембран от негативного действия свободнорадикальных соединений.

При исследовании корреляционных связей лабораторных показателей у больных с ЛГ, АГ и НАСГ были получены результаты, подтверждающие роль



процессов СО биомолекул в патогенезе, а именно в развитии цитолитического синдрома, возникновении отклонений липидного и углеводного обменов, и иммунного статуса. Важную роль нарушение свободнорадикального гомеостаза играет также в развитии апоптоза. Следует отметить, что у больных, как до, так и после лечения были выявлены ассоциативные связи нарушений функции печени, антиоксидантного статуса и апоптотических процессов с уровнем в организме эндогенного мелатонина, содержание которого корректировалась при проведении комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

Вышеприведенные результаты свидетельствуют, что оценка ряда исследованных нами параметров, а также их включение в констелляционные комплексы показателей, характеризующие состояние и функцию печени, может иметь важное значение в клинической лабораторной диагностике, особенно экспресс-анализе, в проведении контроля эффективности применения лекарственных средств, разработке новых биомедицинских технологий лечения с применением средств коррекции свободнорадикального гомеостаза.

Таким образом, выявлены существенные изменения клинических признаков заболеваний печени, показателей биохимического анализа крови, параметров состояния свободнорадикального гомеостаза и интенсивности процессов апоптоза при АГ, НАСГ и ЛГ, а также после проведения базисного лечения и комбинированной терапии, включающей эпифамин и мелаксен. По всей видимости, назначение гепатопротекторов положительно влияло на свободнорадикальный гомеостаз за счет антиокислительного действия применяемых препаратов. Известно, что силимарин обладает антиоксидантным эффектом, который обусловлен наличием фенольной структуры в молекуле, благодаря чему он способен взаимодействовать с АФК, превращая их в менее агрессивные соединения. Кроме того, данный препарат активирует собственные системы защиты тканей от продуктов ПОЛ, что способствует предотвращению разрушения клеточных структур [557]. Экзогенные эссенциальные фосфолипиды активируют расположенные в мембране фосфолипидзависимые ферменты. Это, в

свою очередь, оказывает поддерживающее воздействие на обменные процессы в клетках печени, повышая ее детоксикационный и экскреторный потенциал [107]. Вместе с тем, включение в лечение мелатонин-корректирующих препаратов значительно повышало эффективность терапии.

На основании проведенных исследований нами предложена гипотетическая модель участия мелатонин-корректирующих препаратов в регуляции свободнорадикального гомеостаза при патологиях печени, сопряженных с оксидативным стрессом. Согласно данным схемам, представленным на рисунках 54, 55, 56, развитие патологии сопряжено с активацией каскадных процессов СО и апоптоза, что сопровождается нарушением структурно-функциональных свойств биомембран, повреждением белков, нуклеиновых кислот и других биомолекул, что в итоге приводит к негативным сдвигам в метаболизме в целом и гибели клеток. В соответствии с полученными нами данными, повышение уровня мелатонина в организме при приеме эпифамина или мелаксена сопровождается уменьшением степени СО биомолекул, интенсивности апоптотических процессов и улучшением основных клинических признаков заболеваний печени. Снижение степени свободнорадикального повреждения молекул сопряжено с оптимизацией функционирования антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, ГП, ГР, Г-S-T), неферментативных антиоксидантов (глутатиона,  $\alpha$ -токоферола, цитрата), восстановлением активности ферментов окислительного метаболизма, что положительно коррелирует с нормализацией маркерных показателей цитолиза гепатоцитов (АлАт, АсАт, ГГТП) и других биохимических показателей, характеризующих течение патологического процесса. В основе благоприятного действия мелатонина, очевидно, лежит его способность участвовать в ингибировании свободнорадикальных процессов различными путями: снижая утечку электронов при работе электрон-транспортной цепи митохондрий, стимулируя ферменты АОС, активируя синтез одного из важнейших антиоксидантов – глутатиона, выступая в качестве синергиста при функционировании других антиоксидантов [283, 597, 613]. Следует также

подчеркнуть, что в качестве активной ловушки свободных радикалов может выступать не только сам гормон, но и продукты его взаимодействия с АФК, что многократно повышает его эффективность как антиоксиданта [511, 541]. Так, известно, что в процессе формирования N'-ацетил-N<sup>2</sup>-формил-5-метоксикинурамина из мелатонина нейтрализуется до четырех различных типов АФК [542]. Следует также отметить амфифильность мелатонина, что делает возможным его накопление в разных компартментах клетки. Более выраженный антиокислительный эффект мелаксена по сравнению с эпифамином, может быть связан с тем, что экзогенный мелатонин, входящий в состав данного препарата, быстрее включается в метаболизм, усиливая антиоксидантный потенциал организма. Что касается коррекции уровня мелатонина под действием эпифамина, очевидно, этот процесс требует определенного времени для воздействия через эпифаламо-эпифизарную область.

Таким образом, мелатонин-корректирующие препараты могут рассматриваться как регуляторы свободнорадикального гомеостаза на различных уровнях и как эффективные терапевтические агенты для применения в комплексном лечении поражений печени.

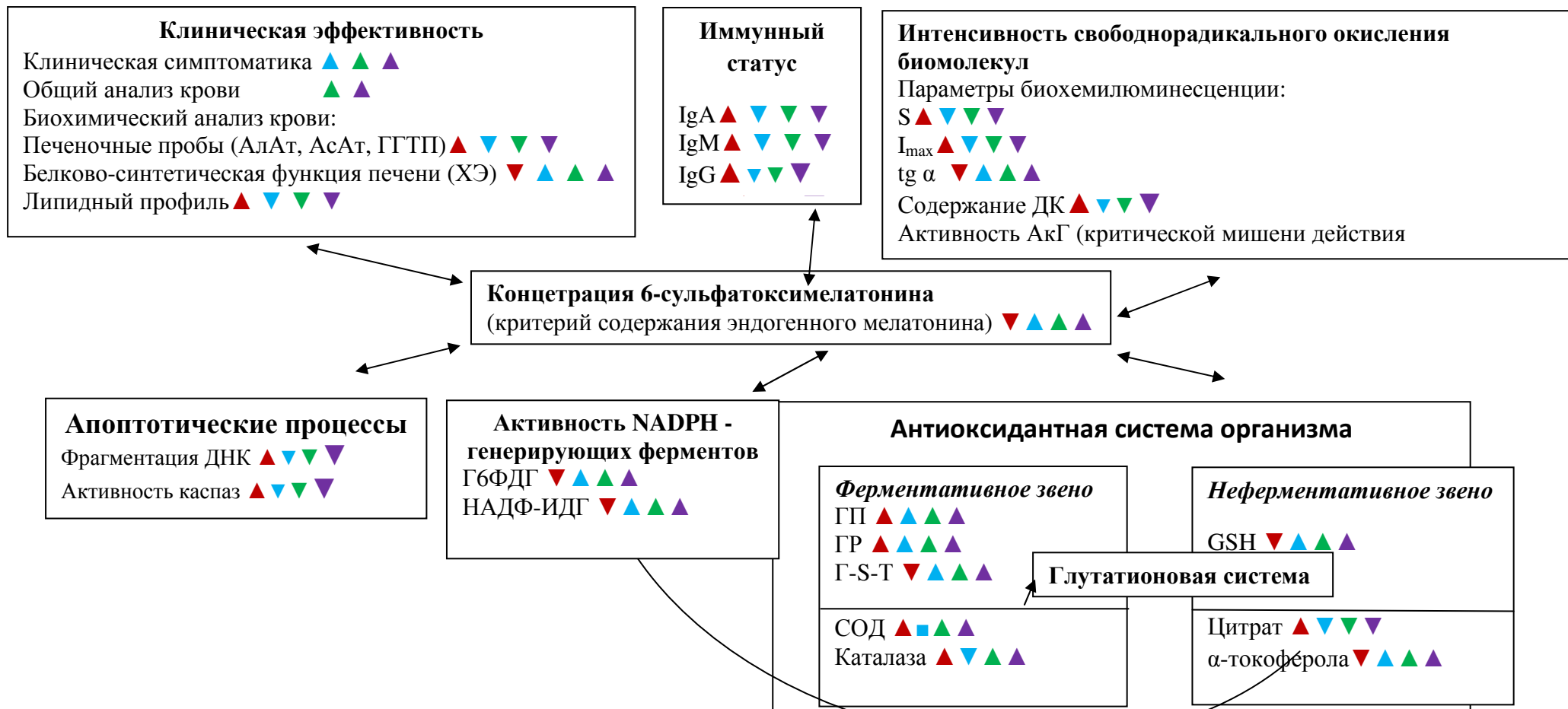


Рисунок 54. Оценка клинической эффективности эпифамина и мелаксена и их влияние на свободнорадикальный гомеостаз и апоптотические процессы в организме при лечении больных с лекарственным гепатитом. *Примечание:* Δ – возрастание, ∇ - снижение, □ - отсутствие изменения показателя при гепатите относительно контроля (●), при базисной терапии относительно патологии (●), при комбинированной терапии с эпифамином (●) или мелаксеном (●) относительно патологии. Размер условного знака в случае базисной терапии, комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном отражает результаты сравнительного анализа степени изменения показателя.

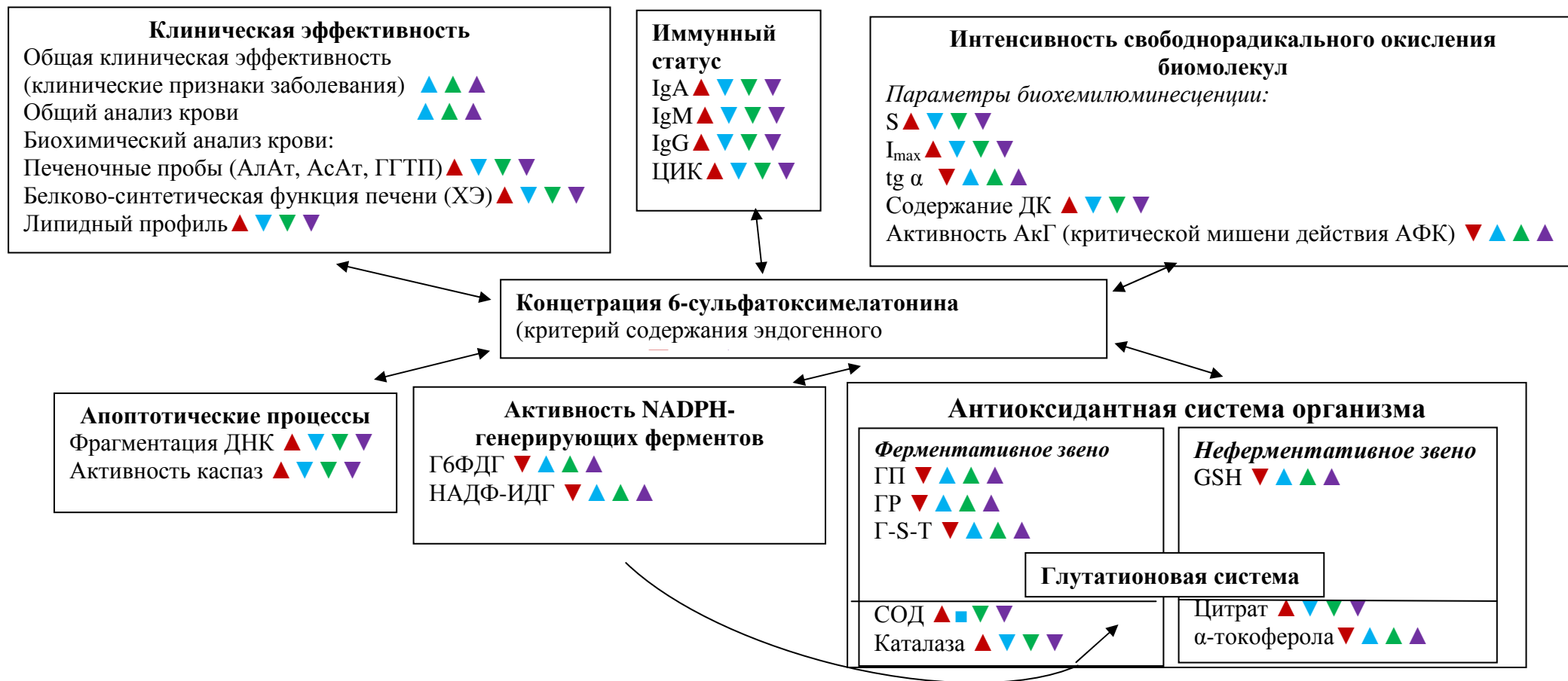


Рисунок 55. Оценка клинической эффективности эпифамина и мелаксена и их влияние на свободнорадикальный гомеостаз и апоптотические процессы в организме при лечении больных с хроническим алкогольным гепатитом в стадии обострения.  
*Примечание:* Δ – возрастание, ∇ - снижение, □ - отсутствие изменения показателя при гепатите относительно контроля (●), при базисной терапии относительно патологии (●), при комбинированной терапии с эпифамином (●) или мелаксеном (●) относительно патологии. Размер условного знака в случае базисной терапии, комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном отражает результаты сравнительного анализа степени изменения показателя.

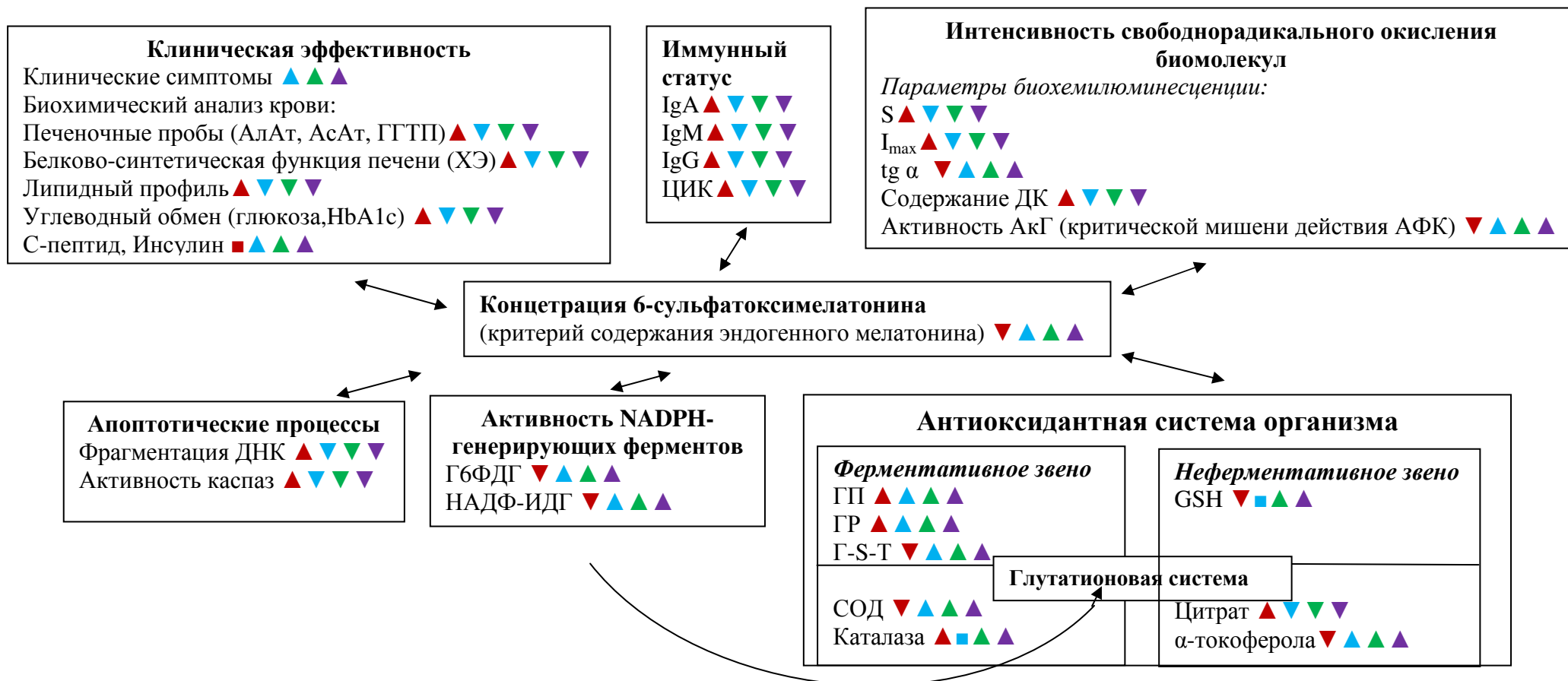


Рисунок 56. Оценка клинической эффективности эпифамина и мелаксена и их влияние на свободнорадикальный гомеостаз и апоптотические процессы в организме при лечении больных с неалкогольным стеатогепатитом. *Примечание:* Δ – возрастание, ∇ - снижение, □ - отсутствие изменения показателя при гепатите относительно контроля (●), при базисной терапии относительно патологии (●), при комбинированной терапии с эпифамином (●) или мелаксеном (●) относительно патологии. Размер условного знака в случае базисной терапии, комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном отражает результаты сравнительного анализа степени изменения показателя.

## Выводы

1. Комплексная оценка клинической картины, биохимических параметров, показателей состояния свободнорадикального гомеостаза и процессов апоптоза у пациентов с ДЗП выявила, что наряду с признаками нарушения функции печени, липидного и углеводного обмена, имеет место окислительный стресс. Базисная терапия оказывала в целом положительное влияние на исследуемые параметры. Однако для многих из них были характерны незначительные изменения в направлении нормы.
2. Сравнительный анализ клинической картины заболевания и показателей инструментальных исследований показал наибольшую клиническую эффективность лечения при применении эпифамина и мелаксена. Проведение комбинированной терапии, включающей мелатонин-корректирующие препараты, оказывало положительное воздействие на активность ферментов, характеризующих степень выраженности цитолитического синдрома, воспалительного процесса и синтезирующую функцию печени (АлАт, АсАт, ГГТП, ХЭ). Очевидно, мелатонин, уровень которого корректируется под влиянием данных препаратов, усиливал гепатопротекторное и антиокислительное действие базисного лечения.
3. Применение мелатонин-корректирующих препаратов при лечении больных с ДЗП оказывало благоприятное влияние на ряд параметров общего, биохимического анализов крови. Комбинированная терапия с эпифамином и мелаксеном положительно влияла на показатели липидного обмена (концентрация общего холестерина, ЛПВП, ЛПНП, индекса атерогенности) за счет гиполипидемического действия. В группе больных с НАСГ, развивающимся на фоне СД2, выявлены положительные тенденции изменений параметров углеводного обмена (концентрация глюкозы, инсулина, С-пептида, гликированного гемоглобина). У пациентов с АГ отмечалось снижение повышенного уровня мочевины в сыворотке крови, что, возможно, связано с проявлением в данном случае гипоазотемического эффекта мелатонина.

4. Иммуноферментный анализ содержания 6-СМ, уровень которого в моче служит объективным критерием содержания мелатонина в организме, выявил существенное снижение концентрации гормона при ДЗП, что, по-видимому, было связано с биотрансформацией гормона в ходе его взаимодействия с АФК. При применении мелатонин-корректирующих препаратов наблюдалось приближение содержания основного метаболита мелатонина к контрольным значениям при всех исследуемых патологических состояниях.
5. Оценка действия мелатонин-корректирующих препаратов на динамику изменений основных классов иммуноглобулинов – IgA, IgM, IgG, и концентрацию ЦИК в крови больных с ДЗП выявила их способность оказывать существенное влияние на состояние иммунного статуса организма, что свидетельствует о возможности проявления мелатонином иммуномодулирующей активности, способствующей нормализации содержания иммуноглобулинов и более значительному снижению уровня ЦИК по сравнению с базисным лечением.
6. Полученные результаты позволяют сделать заключение о роли окислительного стресса, как одного из ведущих механизмов патогенеза ДЗП, на что указывает возрастание параметров S и I<sub>max</sub>, накопление ДК, снижение активности АГ, являющейся критической мишенью действия АФК. Снижение tgα<sub>2</sub>, свидетельствует об истощении компенсаторных механизмов, направленных на нормализацию свободнорадикального гомеостаза. После комбинированного лечения с эпифамином и мелаксеном происходило более существенное изменение данных параметров в направлении контроля по сравнению с базисной терапией.
7. Результаты исследования степени фрагментации ДНК, являющейся главным признаком апоптоза, а также активности внутриклеточных цистеиновых протеаз - каспаз -1 и -3, со стимуляцией которых сопряжено индуцирование программируемой клеточной гибели, свидетельствуют, что патологические изменения при ДЗП сопровождаются апоптотическими процессами. Применение эпифамина или мелаксена приводило к более значительному уменьшению степени фрагментации ДНК и каспазной активности по сравнению с базисным



лечением, что может быть свидетельством антиапоптотического эффекта данных препаратов.

8. Выявлено изменение активности СОД и каталазы при назначении мелатонин-корректирующих препаратов больным с ДЗП в сторону контрольных значений, что может свидетельствовать о реализации их антиоксидантного эффекта, снижающего нагрузку на систему антиоксидантной защиты. Причем, при всех исследуемых патологических состояниях прием эпифамина или мелаксена способствовал более значительной нормализации активности данных ферментов по сравнению с базисной терапией.
9. Полученные результаты свидетельствуют о дефиците GSH у пациентов с ДЗП и значительных изменениях функционирования ферментов глутатионовой АОС. Комбинированная терапия с эпифамином и мелаксеном во всех случаях приводила к более существенной реверсии уровня GSH и активности ГП, ГР и GST в сторону нормы по сравнению с базисным лечением. После проведения лечения наблюдалось повышение активностей Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, снижающихся при ДЗП, которое было выражено более значительно в случае комплексной терапии, включающей эпифамин и мелаксен.
10. Включение мелатонин-корректирующих препаратов в лечение обеспечивало более существенные, по сравнению с базовой терапией, изменения в направлении контроля содержания в крови пациентов с ДЗП цитрата и  $\alpha$ -токоферола. Очевидно, благоприятное влияние эпифамина и мелаксена на состояние свободнорадикального гомеостаза в организме больных способствовало нормализации окислительно-восстановительных процессов, что отражалось на ферментативных превращениях цитрата и интенсивности рецикла  $\alpha$ -токоферола, обеспечивающего поддержание данного антиоксиданта в активной восстановленной форме.
11. Корреляционный анализ лабораторных показателей у больных с ДЗП свидетельствует о ключевой роли свободнорадикальных и апоптотических процессов в патогенезе заболеваний печени, а именно в развитии

цитолитического синдрома, возникновении отклонений липидного и углеводного обменов, иммунного статуса. Были выявлены ассоциативные связи показателей нарушений функции печени, антиоксидантного статуса и апоптотических процессов с уровнем в организме эндогенного мелатонина, содержание которого корректировалась при проведении комбинированной терапии с эпифамином или мелаксеном.

## Практические рекомендации

1. С целью повышения качества диагностики и контроля эффективности лечения больных с ДЗП, независимо от этиологических факторов заболевания, наряду с проведением общепринятых лабораторных тестов, отражающих нарушение функции печени (АлАт, АсАт, ГГТП), целесообразно проведение анализа интенсивности свободнорадикальных процессов по уровню БХЛ, ДК, активности АкГ, являющейся критической мишенью действия АФК.
2. Рекомендуется оценка антиоксидантного статуса пациентов с ДЗП на основе активности антиоксидантных ферментов (ГР, ГП, GST, СОД, каталазы), содержания ферментативных антиоксидантов (глутатиона,  $\alpha$ -токоферола, цитрата), а также НАДФН-генерирующих ферментов (Г6ФДГ, НАДФ-ИДГ).
3. Рекомендуется проводить оценку степени развития апоптотических процессов с помощью определения активности каспаз и степени фрагментации ДНК, которые позволяют отслеживать динамику течения заболевания при поступлении в стационар и назначении терапии.
4. При ДЗП необходимо назначать препараты, корригирующие уровень мелатонина (эпифамин, мелаксен), для повышения клинической эффективности проводимой терапии, снижения выраженности оксидативного стресса и процессов апоптоза.

## Литература

1. Агарков А.А. Оценка степени фрагментации ДНК, активности аконитатгидратазы и уровня цитрата при сахарном диабете 2 типа у крыс и введении мелатонина/ А.А. Агарков, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2012. – № 3. – С. 21-26.
2. Алкогольный цирроз печени и генетический полиморфизм алкогольдегидрогеназы (АДГ2) и ангиотензиногена (Т174М, М235Т) / О.С. Русакова [и др.] // Клиническая фармакология и терапия. –2006.– № 5.– С. 1–33.
3. Анисимов В.Н. Эволюция концепций в геронтологии / В.Н.Анисимов, М.В.Соловьев. –Санкт-Петербург: Эскулап, 1999. – 130 с.
4. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике/ В.Н. Анисимов. –Санкт- Петербург: Система, 2007. – 40 с.
5. Антиоксиданты в явлениях апоптоза и некроза / Н.Е. Павловская [ и др. ]// Биоантиоксидант: тезисы докладов VIII Междунар. конф. Москва, 4-6 октября 2010 г. –Москва : РУДН, 2010.– С. 90-101.
6. Антиоксиданты и антигипоксанты в комплексном лечении больных хроническим бронхитом / Е.А. Уклистая [и др.] // Южно-российский журнал. – 1998. – №4. – С. 94-98
7. Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран / В.Ф.Антонов // Соросовский Образовательный Журнал.–1998. –№10.– С. 10-17.
8. Анциферов М.Б. Осложнения сахарного диабета / М.Б. Анциферов, Г.Р. Галастян .– Москва : ЭНЦ РАМН, 1995. – 80с.
9. Апоптоз периферических лейкоцитов при хронических вирусных гепатитах/ А.О. Буеверов [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. – Т. 10, № 6. – С. 30–33.
10. Апросина З.Г. Хронические диффузные заболевания печени: пато- и морфогенез, клиническая характеристика / З.Г.Апросина // Терапевтический архив. –1995. –Т. 67, № 5. –С. 77-80.

11. Артюхов В.Г. Молекулярная биофизика: механизмы протекания и регуляции внутриклеточных процессов: учебное пособие/ В.Г.Артюхов, О.В.Башарина. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2012. – 220 с.
12. Арутюнян А.В. Механизмы свободнорадикального окисления и его роль в старении / А.В. Арутюнян, Л.С. Козина // Успехи геронтологии. –2009. – № 1. – С. 104-116.
13. Арушанян Э.Б. Физиологические и фармакологические особенности эпифизарных пептидов / Э.Б. Арушанян, Л.Г.Арушанян, И.А.Симонов // Эксперим. и клин. фармакология. – 2001. – Т. 64, №.4. – С.73–79.
14. Арушанян Э.Б. Эпифизарный гормон мелатонин и неврологическая патология / Э.Б. Арушанян // Рус. Мед. Журн. – 2006. – Т.14. № 23. – С. 1657-1773.
15. Арушанян Э.Б. Влияние мелатонина на тромбоцитарный гемостаз и его циркадную организацию / Э. Б. Арушанян // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 5. – С. 32-36.
16. Афанасьев В.В. Острая интоксикация этиловым алкоголем / В.В.Афанасьев, Л.Т.Рубитель, Л.Т. Афанасьев. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. –96 с.
17. Афанасьев И.Б. Кислородные радикалы в биологических процессах/ И.Б.Афанасьев // Успехи химии.– 1979. – Т. 48. –С. 977.
18. Ашмарин И.П. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих-объект молекулярной медицины / И.П.Ашмарин // Успехи биологической химии. – 2003. –Т. 43. –С. 13-18.
19. Ашмарин И.П. Нейропептиды / И.П. Ашмарин, Е.П.Каразеева // Нейрохимия / под ред. И.П. Ашмарина, П.В. Стукалова. — Москва: Ин-т биомед. химии РАМН, 1996. – С. 298-332.
20. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – № 6. – С. 29-34.

21. Балаболкин М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. – С. 4-16.
22. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов / В.А. Барабой // Успехи современной биологии. – Москва : Наука, 1991. –Т. 111, Вып. 6. – С.923-931.
23. Барабой В.А. Перекисное окисление и стресс / В.А.Барабой, И.И. Брехман, В.Г. Голотин // Сибирская наука. –1992. – С. 148.
24. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В.А.Барабой, Д.А.Сутковой. –Киев : Чернобыльинтеринформ, 1997. – 219 с.
25. Баранов А.А. Актуальные вопросы детской гастроэнтерологии / А.А.Баранов, П.Л.Щенрбаков // Вопросы современной педиатрии. – 2002. – Т.1, №1. – С.12-16.
26. Бацков С.С. Лекарственные поражения печени: учеб. пособие для слушателей / С.С.Бацков, А.В.Гордиенко. – Санкт-Петербург : ВМедА, 2002. –Т. 12. – 64 с.
27. Березов Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – Москва : Медицина, 2008. – 704с.
28. Биометрические аспекты оценки эффективности применения эпиталамина у больных пожилого и старческого возраста с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области/ В.Х. Хавинсон [и др.] / под ред. проф. В.Н. Балина. —Санкт-Петербург : Наука, 2000. —32 с.
29. Биохимия: учебник для вузов/ под ред. Е.С.Северина. – 5-е изд. – 2003. – 779 с.
30. Блюгер А.Ф. Практическая гепатология/ А.Ф.Блюгер, И.Н.Новицкий. –Рига: Звайгзне, 1984. – С. 223-229.
31. Болдырев А.А. Окислительный стресс и мозг / А.А. Болдырев // Соровский Образовательный Журнал. – 2001. – Т. 7, № 4. – С. 21-28.

32. Болезни печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей / под ред. В.Т. Ивашкина. – Москва: ООО Издат. дом «М–Вести, 2002. – 416 с.
33. Бондаренко Л.А. Современные представления о физиологии эпифиза/ Л.А. Бондаренко // Нейрофизиология. –1997. – Т. 29. №3. – С. 212-327.
34. Бондарь И.А. Антиоксиданты в лечении и профилактике сахарного диабета / И.А. Бондарь, В.В. Климентов // Сахарный диабет. – 2001. – № 1. – С. 47—52.
35. Бреинг Ф. Клиника и терапия повреждения мембран печени/ Ф. Бреинг. – Кельн, 1998. — 198 с.
36. Буеверов А. О. Алкогольная болезнь печени/ А.О. Буеверов, М.В. Маевская, В.Т. Ивашкин // Рус. мед. журн. –2001. – Т. 3, № 2.– С. 61–64.
37. Буеверов А.О. Лекарственные поражения печени / А.О.Буеверов // Рус. Мед. Журн. – 2001. – №9.– С. 13–14.
38. Буеверов А. О. Алкогольная болезнь печени/ А.О.Буеверов // Consilium medicum.– 2002. – Т. 4, № 9.– С. 23–25.
39. Буеверов А. О. Оксидативный стресс и его роль в повреждении печени/ А.О.Буеверов // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2002. –№ 4. –С. 21–25.
40. Буеверов А. О. Некоторые патогенетические и клинические вопросы неалкогольного стеатогепатита/ А.О.Буеверов, М.В.Маевская // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2003. – № 3. – С. 2–7.
41. Буеверов А. О. Место урсодехолевой кислоты в лечении алкогольной болезни печени / А.О.Буеверов // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. –2004.– № 1.– С. 15–20.
42. Буеверов А.О. Возможности клинического применения урсодезоксихолевой кислоты / А.О.Буеверов // Consilium medicum. – 2005. – Т. 7, № 6.– С. 460-463.
43. Букин В.Н. Биохимия витаминов / В.Н. Букин // Избранные труды. – Москва : Наука,1982. –С. 26-44.

44. Вартамян Л.С. Мембраны субклеточных органелл как источник супероксидных радикалов при ишемии печени / Л.С. Вартамян, Ю.Э. Рашба, Л.Г. Наглер // Бюл. экзеперим. биологии и медицины. — 1990. -№6. -С. 550-552.
45. Витер В. И. Патоморфология внутренних органов при смерти от острого отравления этиловым алкоголем / В.И.Витер, А.В. Пермяков //Актуальные аспекты судебно-медицинской экспертизы и экспертной практики. – Ижевск, 2000. – Вып. 6. - С. 103-111.
46. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А.Владимиров, А.И. Арчаков. –Москва: Наука, 1972. – 252с.
47. Владимиров Ю.А. Электрическая прочность мембран митохондрий / Ю.А. Владимиров, О.М. Парнев, З.П. Черемисина // Биол. мембраны. – 1984.–Т, 1, №4.– С. 428-434.
48. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран/ Ю.А. Владимиров // Биофизика. –1987. –Т.32, №5. – С.830-844.
49. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты/ Ю.А.Вадимиров // Вестник РАМН. –1998. – №7. – С.43-51.
50. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Сорос. образовательный журнал. – 2000. – № 12. –С. 13-19.
51. Власова С.Н. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей / С.Н. Власова, Е.И. Шабунина, И.А. Переслегина //Лаб. дело. –1990.– № 8. – С. 19-21.
52. Влияние мелатонина на мутагенность и противоопухолевую активность цитостатиков у мышей / С.А. Мусатов [и др.] // Вопр. онкологии.– 1997. – Т. 43. – С. 623-627.
53. Влияние средств растительного происхождения на показатели перекисного окисления липидов при остром токсическом гепатите / О.Ю. Катикова [и др.] // Вопросы медицинской химии. –2001. – Т.47, №5. – С.593-598.



54. Возненко А. А. Лекарственно-индуцированные поражения печени у больных туберкулезом органов дыхания и пути их преодоления: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. А. Возненко. – Москва, 2012. – 22 с.
55. Высокогорский В.Е. Характеристика обмена глутатиона при абстинентном алкогольном синдроме /В.Е. Высокогорский, Е.С. Ефременко, И.Е.Грицаев // Наркология. – 2006. – №8. – С.131-135.
56. Гастроэнтерология и гепатология: диагностика и лечение: руководство для врачей / под ред. А.В. Калинина, А.Ф. Логинова, А.И. Хазанова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва : МЕДпресс-информ, 2013. – 848 с.
57. Гастроэнтерология. Справочник практического врача / А.В.Калинин, И.В.Маев, С.И. Рапопорт; под общ. ред. проф. С.И. Рапопорта. – Москва: МЕДпресс-информ, 2009. – 320 с.
58. Гашкова В. Циркулирующие комплексы антиген-антитело у больных с иммунокомплексным заболеванием и после трансплантации почек /В. Гашкова, И.Матл, И.Кашлик // Чехословацкая медицина. –1978. –№ 2. – С. 117–122.
59. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С.Гланц. – Москва : Практика, 1999. – 459 с
60. Глутатион и ферменты его метаболизма у больных сахарным диабетом 2 типа / Л.С. Колесниченко [и др.] // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – Т. 85, № 2. – С. 56-58.
61. Голованова Н. Э. Влияние некоторых токсических соединений на активность глутатиона – S – трансфераз печени и эритроцитов крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. Э. Голованова. – Санкт- Петербург, 1993. – 25 с.
62. Горбенко М.В. Активность глутатионовой антиоксидантной системы при действии мелаксена и вальдоксана на фоне гипертиреоза у крыс/ М.В. Горбенко, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин // Биомедицинская химия. – 2013. – Т. 59, № 5. – С. 541-549.
63. Горбенко М.В. Влияние мелаксена и вальдоксана на активность глутатионовой антиоксидантной системы и НАДФН-генерирующих ферментов в

сердце крыс при экспериментальном гипертиреозе/ М.В. Горбенко, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 10. – С. 12-15.

64. Горбенко М.В. Особенности функционирования глутатионовой антиоксидантной системы крови больных с синдромом тиреотоксикоза при комбинированной терапии с мелаксеном/ М.В. Горбенко, С.С. Попов, К.К. Шульгин // Вестник Воронежского государственного университета. – 2013. - № 2. – С. 83-87.

65. Горбенко М.В. Воздействие мелаксена и вальдоксана на интенсивность свободнорадикальных процессов, активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при гипертиреозе/ М.В. Горбенко, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, № 4. – С. 462-468.

66. Гормоны – убийцы / Краснова С.А., Макарова Л.Г., Капустин К.М.. – Москва: Научная книга, 2008. – 270 с.

67. Горожанская Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях /Э. Г. Горожанская // Клин. лаб. диагн. – 2010.— №6. –С.28-41.

68. Горюшкин И.И. Алкоголизм: механизмы изменения активности гамма-глутамилтрансферазы и аспартатаминотрансферазы и возможность предотвращения жировой инфильтрации печени / И.И.Горюшкин // Вопросы наркологии. – 2001. – №1. – С. 60-66.

69. Григорьев П. Я. Диагностика и лечение болезней органов пищеварения / П.Я.Григорьев, Э. П.Яковенко. – Москва : Медицина, 1996. – 515 с.

70. Григорьев П.Я. Клиническая гастроэнтерология / П.Я.Григорьев, А.В.Яковенко. – Москва : МИА, 2001. –693 с.

71. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В.Гублер, А.А.Генкин. – Ленинград: Медицина, 1973. – 144 с.

72. Губский Ю. И. Коррекция химических поражений печени / Ю. И. Губский. – Киев : Здоровье, 1989. – 156 с.
73. Дадамбаев Е.Т. Состояние иммунологической реактивности и содержание мелатонина при бронхопневмонии у детей раннего возраста с увеличенной вилочковой железой: автореф. дис. ...д-ра мед. наук / Е.Т. Дадамбаев. –Москва, 1986. – 24 с.
74. Дедов И.И. Сахарный диабет: руководство для врачей / И.И.Дедов. – Москва : Универсум Паблишинг, 2003. – 455 с.
75. Дедов И.И. Биоритмы гормонов / И.И. Дедов, В.И. Дедов. — Москва : Медицина, 2008. — 228 с.
76. Демидов Д.В. Динамика перекисного окисления липидов под воздействием препаратов антиоксидантного типа действия в условиях экспериментального опухолевого роста /Д.В. Демидов, Н.А. Плотникова Н// Современные технологии в медицине. –2011. – №4.– С 14-17.
77. Диже Г.П. Тиреоидные гормоны и мелатонин как средства антиоксидантной терапии / Г.П. Диже, Р.В. Дятлов, А.А. Диже // Анестезиология и реаниматология. – 2001. – № 4. – С. 43-46.
78. Дмитриев Л.Ф. О механизме взаимодействия а-токоферола с перекисными радикалами /Л.Ф. Дмитриев, М. И. Верховский // Биохимия.– 1990. – Т.55, №11. – С.2025-2029.
79. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е.Е.Дубинина // Вопросы мед. химии. –2001. – Т. 47, № 6. – С. 561 - 581.
80. Дубинина Е.Е. Свободнорадикальные процессы при старении, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Биомедицинская химия.– 2007. – № 4. – С. 351-371.
81. Дубинина, Е. Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и

- клинико-биохимические аспекты / Е. Е. Дубинина. – Санкт-Петербург.: Издательство Медицинская Пресса. – 2006. – 400 с.
82. Евстигнеева Р.П. Витамин Е, как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П. Евстигнеева, И.М. Волков, В.В. Чудинова // Биологические мембраны. –1988. – Т.15, № 2. – С.119-136.
83. Евсюкова Е.В. Лечение аспириновой бронхиальной астмы препаратами эпифиза эпителином и эпифамином: методические рекомендации/ Е.В. Евсюкова, В.В. Малинин.–Санкт-Петербург, 1999. – 12 с.
84. Жеребцов Н.А. Биохимия: учебник / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. – Воронеж : Изд-во Воронеж. госун-та, 2002. – 696 с.
85. Журавель Е.В. Фосфолипидные препараты в гепатологии: реалии и перспективы / Е.В. Журавель, С.М.Дорогозов // Провизор. – 1998. – №. 12
86. Журавлев, А.И. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология/ А.И. Журавлев, С.М. Зубкова. – Москва: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2008. – 272 с.
87. Занозина О.В. Роль окислительного стресса в развитии и прогрессировании поздних осложнений сахарного диабета 2-го типа. Возможности антиоксидантной терапии: автореф. дис. доктора мед. наук / О.В. Занозина. – Нижний новгород, 2010. – 50 с.
88. Заславская Р.М. Мелатонин в комплексном лечении больных сердечно-сосудистыми заболеваниями / Р.М. Заславская.– Москва : ИД медпрактика-М, 2005. – 192 с.
89. Заславский Ю.С. Роль убихинона как антиоксиданта в структуре и функции мембран в норме и при действии радиации: автореф. дис. канд. биологических наук / Ю.С. Заславский. –Пушино, 1984. – 48 с.
90. Збровская И.А. Антиоксидантная система организма, ее значение в метаболизме. Клинические аспекты / И.А. Збровская, М.В. Банникова // Вестн. РАН – 1995. – №6. – С. 53-59.

91. Зенков Н. К. Окислительный стресс/ Н.К.Зенков, В.З.Ланкин, Е.Б.Меньшикова. – Москва: Наука, 2001. – 342 с.
92. Зозуля Ю.А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга Текст. / Ю.А. Зозуля, В.А. Барабой, Д.А. Стуковой. – Москва : Знание, 2000. – 344 с.
93. Зупанец И. А. Фармацевтическая опека: клинико-фармацевтические аспекты применения алкоголя в медицине / И.А. Зупанец, Н.В.Бездетко, Л.В.Деримедвель// Провизор. – 2003. – №4. – С. 12-17.
94. Иваников И.О. Общая гепатология /И.О.Ивников, В.Е.Сюткин. –Москва : Медпрактика. –Москва, 2005. –С. 17-106.
95. Иванова А.С. Характеристика защитного действия альфа-токоферола по показателям эритроцитарной системы при длительной нитритной интоксикации у крыс/ А.С. Иванова, С.Б. Назаров // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – № 4. – С. 38–40.
96. Ивашкин В.Т. Неалкогольный стеатогепатит / В.Т.Ивашкин, Ю.О.Шульпекова // Болезни органов пищеварения. – 2000. – № 2 – С. 41-46.
97. Ивашкин В.Т., Ющук Н.Д. Диагностика и лечение диффузных заболеваний печени. Москва: Медицина. – Москва, 2003. — 49 с.
98. Ивашкин В.Т., Буеверов А.О. Токсический гепатит, вызванный отравлением суррогатами алкоголя / В.Т.Ивашкин, А.О. Буеверов //Рос. журнал Гастроэнтер., Гепат., Колопрокт.– 2007. – Т.18, №1. – С.4-8.
99. Игнатова Т.М. Лекарственные поражения печени / Т.М.Игнатова // Гепатологический Форум. –2008. – № 2. – С. 2-9.
100. Ильченко Л.Ю. Алкогольный гепатит: клинические особенности, диагностика и лечение/ Л.Ю. Ильченко // Лечащий Врач. –2007.– № 6. –С. 14–19.
101. Илюха В.А. Супероксиддисмутаза и каталаза в органах млекопитающих различного экогенеза / В.А.Илюха // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2001. – Т.37. – С. 183-187.

102. Иммунные механизмы прогрессирования алкогольной болезни печени / И.Г. Никитин [и др.] // Гепатологический форум. – 2005. – № 4. – С. 8–11.
103. Индутный А.В. Патобиохимические особенности и факторы повреждения сердца при сочетании сахарного диабета с хронической интоксикацией алкоголем : автореф.дис....д-ра мед.наук / А.В.Индутный .– Челябинск, 2010. – 32с.
104. Интенсивность свободнорадикальных процессов и регуляция активности цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы в кардиомиоцитах крысы в норме и при ишемии / Л.В. Медведева [и др.] //Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 6. – С. 838-849.
105. Каладзе Н.Н. Итоги и перспективы изучения физиологических, патогенетических и фармакологических эффектов мелатонина / Н.Н.Каладзе, Е.М.Соболева, Н.Н.Скоромная // Здоровье ребенка. – 2010. –Т.2, №23. – С.156-166.
106. Калачнюк Т.Н. Этиология лекарственных поражений печени и оценка терапии / Т.Н.Калачнюк // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2006. – Т. 16, № 1. Приложение 27. – С. 88.
107. Калинин А. В. Эссенциале Н - опыт применения препарата при алкогольной болезни печени / А.Н.Калинин // Consilium medicum. Экстра выпуск. – 2001. –С. 6-8.
108. Калинин А.В. Алкогольная болезнь печени/ А.В. Калинин // Фарматека. – 2005. – №1(97). – С. 48–55.
109. Каминская Т.О. Оксид азота его биологическая роль и участие в патологии органов дыхания / Г.О. Каминская // Проблемы туберкулеза. – 2004. – № 6. – С.3-11.
110. Камскова Ю.Г. Изменение антиоксидантного статуса и уровня ПОЛ в крови и печени в динамике 30-суточной гипокинезии/ Ю.Г.Камскова // Бюлл. эксперим. биологии и медицины.– 2001. – Т. 132, №10. – С. 387-389.

111. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С.Камышников. – 3-е изд. – Минск : МЕДпрессинформ, 2009. – 896 с.
112. Капелько В.И. Активные формы кислорода, антиоксиданты и профилактика заболеваний сердца Текст. / В.И. Капелько // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 11, № 21. – С. 1185 -1188.
113. Кареткина Г.М.Фторотановый гепатит / Г.М.Кареткина, Д.С.Чешик // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2006. – Т. 16, № 1. Приложение 27. – С. 70.
114. Кахновер Н. Б. Основные функции, локализация и распространение глутатионтрансфераз / Н. Б. Кахновер, Ю. И. Хмелевский // Укр. биохим. журнал. – 1983. – Т. 55, № 1. – С. 86.
115. Кветная Т.В. Мелатонин — нейроиммуноэндокринный маркер возрастной патологии / И.В. Князькин, И.М. Кветной. —Санкт-Петербург: ДЕАН, 2005. — 142 с.
116. Кветная Т.В., Князькин И.В. Мелатонин: роль и значение в возрастной патологии. - СПб.: Изд-во ВМедА, 2003. —93 с.
117. Клиническая симптоматология острых лекарственных гепатитов / А.П. Васильев [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерологии , гепатологии. – 1993. – № 3. – С. 56–60.
118. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика / А.И.Кобзарь. – Москва : Физматлит, 2006. – 238 с.
119. Коган А.Х., Модулирующая роль CO<sub>2</sub> в действии активных форм кислорода / А.Х. Коган, С.В. Грачев, С.В. Елисеева. – Москва: ГЭОТАР- Медиа, 2006. – 224 с.
120. Козак М.В. Исследование влияния "альфа"-токоферола и синтетических антиоксидантов на гонадотропную функцию аденогипофиза самцов и самок белых крыс : диссертация ... кандидата медицинских наук : 03.00.13 / М.В. Козак;

[Место защиты: Саратовский государственный медицинский университет]. – Саратов, 2003. – 131 с.

121. Козлов А.И. Потребление алкоголя и связанные с алкоголем проблемы у коренного населения Севера России / А.И.Козлов // Наркология. – 2006. –Т. 10, № 58.– С. 22-29.

122. Колесниченко Л.С. Обмен глутатиона/ Л.С.Колесниченко // Успехи биол. химии. – Москва : Наука, 1990. –Т.31.– С. 157- 179.

123. Колесниченко Л.С. Глутатионтрансферазы/ Л.С.Колесниченко, В.И.Кулинский // Успехи современной биологии. – 2004. –Т. 107, № 2.– С. 179.

124. Кольтовер В.К. Свободнорадикальная теория старения: -исторический очерк / В.К. Кольтовер, // Успехи геронтологии. – 2000. – Вып. 4. –С. 33-40.

125. Коненков В.И. Мелатонин при сахарном диабете: от патофизиологии к перспективам лечения / В.И. Коненков, В.В. Климонтов, С.В. Мичурина // Сахарный диабет. –2013. – № 2. – С. 11-16.

126. Конторщикова К.Н. Перекисное окисление липидов в норме и патологии: учеб. пособие / К.Н.Конторщикова. –Нижний Новгород, 2000. – 24 с.

127. Коркушко О.В. Пинеальная железа: пути коррекции при старении / О.В.Коркушко, В.Х.Хавинсон, В.Б.Шатило.—Санкт- Петербург: Наука, 2006. – 204 с.

128. Костюк В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты DJVU / В.А.Костюк, А.И.Потапович. –Минск: Изд-во БГУ, 2004. – 179 с.

129. Кошкина Е.А. Проблема алкоголизма и наркомании в России на современном этапе / Е.А. Кошкина // Вопросы наркологии. – 2003. – №4. – 256 с.

130. Кузник Б.И. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований / Б.И.Кузник, В.Г.Морозов, В.Х. Хавинсон. —Санкт-Петербург: Наука, 1998. – 310 с.

131. Кузьменко А.И. Свободнорадикальное окисление липидов сыворотки крови здоровых доноров в зависимости от содержания в ней витамина Е. / А.И.



Кузьменко, Е.П. Клименко, Г.В. Донченко //Бюл.эксперим.биол. –1997, Т. 124, № 9. –С. 298-301.

132. Кузьмина Е.И. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободнорадикальных реакций в биологических субстратах/ Е.И. Кузьмина, А.С. Нелюбин, М.К. Щенникова // Межвузовский сборник: Биохимия и биофизика микроорганизмов. – Горький, 1983.– С.179-183.

133. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных / А.П.Кулаичев. – Москва : Форум-Инфра-М, 2006. – 162 с.

134. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Биологическая роль глутатиона / В.И.Кулинский // Успехи современной биологии. – 1990. – № 114. – С. 20-33.

135. Кулинский В.И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / В.И.Кулинский, Л.С.Колесниченко// Успехи современной биологии. – 1993. – Т.113, Вып.1. –С.107- 122.

136. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соровский Образовательный Журнал. – 1999. – Т. 38, № 1. – С. 2-7.

137. Кулинский В.И. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы /В.И.Кулинский, Л.С. Колесниченко // Биомедицинская химия. – 2009. –Т. 55, Вып. 3. –С. 255-277.

138. Кураласов А.К. Модифицирующее действие темноты на рост рака молочной железы и эффективность гормонотерапии в эксперименте / А.К. Кураласов // Бюлл. экспер. биологии и медицины. –1975. – Т. 7. – С. 82-84.

139. Кухтина Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глущенко // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 6. – С. 993-997.

140. Куценко С.А. Основы токсикологии/ С.А. Куценко. – Москва: Фолиант, 2004. — 144 с.

141. Куцый М.П. Участие протеаз в апоптозе / М.П. Куцый, Е.А. Кузнецова, А.И. Газиев // Биохимия. – 1999. – Т. 64. – С. 149-163.

142. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред В.В. Меньшиков. – Москва : Медицина, 1987. –364 с.
143. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – Москва : Москва, 2000.–78 с.
144. Лелевич С.В. Функциональное состояние некоторых путей метаболизма глюкозы в печени крыс при хронической алкогольной интоксикации / С.В. Лелевич // Биомед. химия. – 2009. – Т. 55, вып. 6. – С. 727-733.
145. Литвиненко Т.К. Суточные вариации показателей иммунного статуса и содержания мелатонина в сыворотке крови пациентов с бронхиальной астмой / Т.К. Литвиненко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. – Т. 142, №11. – С. 553-556.
146. Луцак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий / В.И. Луцак // Биохимия. – 2001. – Т. 66, № 5. – С. 592 – 609.
147. Лысенко А.В. Пептидная регуляция адаптации организма к стрессорным воздействиям / А.В. Лысенко, А.В.Арутюнян, Л.С.Козина / под ред. В.Х. Хавинсона. —Санкт-Петербург : Изд-во ВМедА, 2005. —208 с.
148. Маев И.В. Влияние урсодезоксихолевой кислоты в качестве монотерапии и в комбинации с лактулозой на биохимические показатели крови больных неалкогольным стеатогепатитом / И.В. Маев, Ю.А. Кучерявый, С.В. Морозов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2013. – Т.23, №1. – С.37-51.
149. Маевская М.В. Алкогольная болезнь печени / М.В.Маевская //Consilium medicum. – 2001. – Т. 3, 6. –С.256–260.
150. Макаренко Н.П. Эндокринная терапия рака молочной железы у женщин / Н.П.Макаренко //Русский мед. журнал. –1998. – №10. – С.643-645.
151. Макеева А.В. Гепатопротекторное действие тиоктовой кислоты при развитии токсического гепатита у крыс/ А.В. Макеева, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова // Молекулярная медицина. – 2008.–№ 1. –С.27-30.

152. МакНелли П.Р. Секреты гастроэнтерологии: пер. с англ. под ред. А. А. Курыгина, И.С. Осипова / П.Р. МакНелли. – Москва – Санкт- Петербург : ЗАО "Издательство БИНОМ", Невский диалект, 1998. – 1023 с.
153. Малиновская Н.К. Мелатонин в лечении язвенной болезни двенадцатиперстной кишки / Н.К. Малиновская, Ф.И. Комаров, С.И. Рапопорт // Клиническая медицина. — 2006. — № 1. — С. 5-11.
154. Малиновская Н.К. Роль мелатонина в организме человека /Н.К.Малиновская//Клиническая медицина. – 1997. – №10. – С.15-22.
155. Маниатис Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – Москва : Мир, 1984. – 478с.
156. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия / В. Дж. Маршалл : пер. с англ. – Москва; Санкт- Петербург : Бином-Невский диалект, 2002. – 348 с.
157. Матасова Л.В. Аконитаза млекопитающих при окислительном стрессе / Л.В. Матасова, Т.Н.Попова // Биохимия. – 2008. – Т.73, Вып.9. – С. 1189-1198.
158. Матвеева Л.В. Иммунопатогенетические реакции при хроническом алкогольном гепатите: диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.16 / Матвеева Любовь Васильевна; [Место защиты: ГОУ ВПО "Мордовский государственный университет"].- Саранск, 2007.- 120 с.
159. Матюшин Б.Н. Современные подходы к лабораторной диагностике свободно-радикальных процессов в печени при ее вирусном поражении / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов //Клинич. и лаб. диагностика. –1997. –№6. –С.37-38.
160. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсмон , М.Г. Пшенникова. – Москва : Медицина, 1988. – 256.
161. Мелатонин – теория и практика / под ред. С.И. Рапопорта, В.А. Голиченкова . – Москва: ИД Медпрактика – Москва, 2009. – 97с.
162. Мелатонин в норме и патологии / Ф.И. Комаров [ и др.]. – Москва: ИД Медпрактика-М, 2004. –308 с.
163. Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта / В.Н. Анисимов [ и др.]—Москва : Советский спорт, 2001. – 184 с.

164. Мелатонин и сердечно-сосудистая система/ Н.К. Малиновская [и др.] // Мелатонин в норме и патологии. — Москва: ИД Медпрактика-М. 2004. — С. 85-101.
165. Меньшикова Е.Б. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов / Е.Б. Меньшикова, Н.К. Зенков // Успехи современ. биологии. — 1993. — Т.113, №4. — С.442-455.
166. Метаболические заболевания печени: проблемы терапии / Э.П. Яковенко [и др.] // Фарматека. — 2003. — Т. 73, № 10. — С. 47-52
167. Метелица Д.И. Механизмы окисления алифатических спиртов ферментными системами / Д.И. Метелица, Е.М. Попова // Биохимия. — 1979. — Т.44, №11. — С. 1923-1935.
168. Методы биохимических исследований / под ред. М.И.Прохоровой. — Ленинград: Изд-во Ленинградского университета, 1982. — 271с.
169. Механизм антиатерогенного действия пробукола и перспективы его клинического применения / В. З. Ланкин [ и др.] // Кардиология. — 1991. —Т. 31, №6. — С. 87-90.
170. Мжельская Т.И. Биологические функции церулоплазмينا и их дефицит при мутациях генов, регулирующих обмен меди и железа/ Т.И.Мжельская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. —2000. — Т. 130, № 8. — С. 124-126.
171. Минушкин О.Н. Опыт терапии заболеваний печени эссенциальными фосфолипидами / О. Н.Минушкин //Consilium medicum. Экстра выпуск . —2001. — С. 9-11.
172. Михайличенко Т.Е. Динамика показателей свободнорадикального окисления у больных сахарным диабетом / Т.Е. Михайличенко // Збірник статей. — Донецкий нац. мед. унив. — 2008. — Т.2, Вып.12. — С.102.
173. Морозов В.Г. Пептидные биорегуляторы: 25-летний опыт экспериментального и клинического изучения / В.Г.Морозов, В.Х.Хавинсон. — Санкт- Петербург : Наука, 1996. — 74 с.

174. Мычка В.Б. Сердечно-сосудистые осложнения сахарного диабета типа 2 / В.Б. Мычка, И.Е.Чазова // *Consilium medicum*. – 2003. – Т.5, №9. – С.100-107.
175. Науменко Е.В. Серотонин и мелатонин в регуляции эндокринной системы / Е.В. Науменко, Н.К.Попова . – Новосибирск.: Наука, 1975. – 123 с.
176. Наумов В.А. Исследование взаимодействия убихинона и убихинола с перекисными радикалами хемилюминесцентным методом / В.А.Наумов, Н.Г. Хралова // *Биофизика*. – 1983. – Т.5. – С.730-736.
177. Нелаева А.А. Состояние перекисного окисления липидов в мембранах тромбоцитов у больных ИЗСД при кетоацидозе и коррекция витаминами-антиоксидантами / А.А. Нелаева, И.А.Трошина // *Сахарный диабет*. – 1999. – Вып.3, №4. – С. 55.
178. Норман Г.Э. Активные формы кислорода и люстра Чижевского / Г.Э. Норман // *Биохимия*. – 2001. – Т. 66, № 1. – С. 123 – 126.
179. Образование свободных радикалов при взаимодействии гипохлорита с ионами железа Текст. / Э.Ш. Якутова [и др.] // *Биофизика*. –2004. – Т. 39, вып. 2. – С. 275-279.
180. Окислительный стресс /Е.Б. Меньшикова [и др.] // *Прооксиданты и антиоксиданты*, –Москва: Изд-во Слово, 2006. – 554с.
181. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшикова [и др.] – Новосибирск: АРГА. 2008. – 284 с.
182. Опарин А.А. Динамика мелатонин-серотонинового содержания в процессе лечения язвенной болезни /А.А.Опарин // *Лекарства — человеку*. — 2003. — Т. 18, № 1. — С. 124-127.
183. Осадчук М.А. Диффузная нейроэндокринная система: общебиологические и гастроэнтерологические аспекты / М.А. Осадчук, В.Ф. Киричук, И.М. Кветной. —Саратов: Изд-во Сарат. мед. ун-та, 1996. —128 с.
184. Осипов А.И. Активные формы кислорода и их роль в организме / А.И.Осипов, О.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // *Успехи биологической химии*. – 1990. –Т.31. –С.180-209.

185. Особенности лекарственных и вирусно-лекарственных поражений печени / А.И.Хазанов [и др.] // Кремлевская медицина. – 2000. – № 1. – С. 44–47.
186. Охрименко С.М. Адаптация ферментов липидного и азотистого обмена у крыс при оксидативном стрессе, вызванном солями кобальта и ртути / С.М.Охрименко, Н.Ю. гурьева, П.А.Калиман // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2005. – Т.1-2, №709. – С. 56-60.
187. Павлов Ч.С. Структура хронических заболеваний печени по данным биопсии и морфологические исследования ее ткани / Ч.С. Павлов, В.Б.Золотаревский, В.Т.Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 1. – С. 90–95.
188. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии / М.А. Пальцев. – Москва : ОАО Из-во Медицина, 2006. –384 с.
189. Пашков А.Н. Влияние мелатонина на оксидативный статус, содержание цитрата и активность аконитатгидратазы в печени крыс при токсическом гепатите / А.Н. Пашков, С.С. Попов, А.В. Семенихина // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 41-43.
190. Пашков А.Н. Состояние системы глутатиона и активность некоторых NADPH-генерирующих ферментов в печени крыс при действии мелатонина в норме и при токсическом гепатите/ А.Н. Пашков, С.С. Попов, А.В. Семенихина // Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 139, № 5. – С. 520-524.
191. Пашков А.Н. Влияние мелатонина на уровень цитрата и токоферола в сыворотке крови крыс при токсическом гепатите / А.Н. Пашков, С.С. Попов, В.И. Золоедов // Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – 2006. – Т. 5., № 1. – С. 120-122.
192. Пентюк А.А. Активности глутатионзависимых ферментов, каталазы и СОД в печени и сердце крыс с дефицитом витамина/ А.А. Пентюк //Биохимия. – 1987. – №6. – С. 1009.

193. Переслегина И.А. Клинико – патогенетическое значение нарушений перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты организма при хроническом гастродуодените и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки у детей : автореф. дис....д-ра. мед.наук / И.А.Переслегина. – Москва, 1991. – 41с.
194. Петровский В.Д. Большая медицинская энциклопедия / под ред. Б.В. Петровского. – 3-е изд., дораб. Т.5. – Москва : Советская энциклопедия, 1977. – 568 с
195. Подымова С.Д. Оценка эффективности препарата гептрал у больных хроническими диффузными заболеваниями печени с синдромом внутрипеченочного холестаза / С.Д.Подымова, М.Ю. Надинская // Клин. мед. – 1998. – № 10. – С. 45-48.
196. Подымова С. Д. Патогенетическая роль эссенциальных фосфолипидов в терапии алкогольной болезни печени // Consilium medicum: Экстра-выпуск. 2001. –С. 3–5.
197. Подымова С.Д. Болезни печени: руководство для врачей/ С.Д. Подымова. – 4-е изд. – Москва : Медицина, 2005. – С. 239-264.
198. Показатели липидного обмена и системы перекисного окисления липидов у мужчин с учетом наследственной предрасположенности к атеросклеротической сосудистой патологии/ Е.Ф. Давиденкова [и др.] // Кардиология. – 1991. –N8. –С. 41-44.
199. Полунина Т.Е. Лекарственные поражения печени/ Т.Е.Полунина // Лечащий врач. – 2005. – № 3. – С. 69-72.
200. Попов С.С. Активность каталазы при экспериментальном тиреотоксикозе в тканях крыс / С.С. Попов, А.В. Семенихина, Т.И. Рахманова // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2006. – № 2. – С. 414-415.
201. Попов С. С. Оксидативный статус и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном гипертиреозе и действии мелатонина / С.С. Попов, А.Н.

- Пашков, Т.Н. Попова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2007. – Т. 144. № 8. – С. 170-173.
202. Попов С.С. Влияние мелатонина на параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови крыс при введении фактора некроза опухоли- $\alpha$ / С.С. Попов, А.Н. Пашков, А.В. Семенихина // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования : материалы 3-й Всероссийской научно-методической конференции / под ред. С.А. Боева. – Воронеж, 2007. – С. 291-293.
203. Попов С.С. Мелатонин как фактор коррекции процессов свободнорадикального окисления при токсическом поражении печени крыс/ С.С. Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70, № 1. – С. 48-51.
204. Попов С.С. Активность глутатионовой антиоксидантной системы при гипертиреозе и при действии мелатонина/ С.С. Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т. 54. № 3. – С. 47-50.
205. Попов С.С. Влияние мелатонина на свободнорадикальный гомеостаз в тканях крыс при тиреотоксикозе/ С.С. Попов, А.Н. Пашков, Т.Н. Попова // Биомедицинская химия. – 2008. – Т. 54, № 1. – С. 114-121.
206. Попов С.С., Пашков А.Н., Золоедов В.И. Клиническая эффективность комбинированной терапии с эпифамином у больных с синдромом тиреотоксикоза / С.С. Попов, А.Н. Пашков, В.И. Золоедов //Курский научно-практический вестник. "Человек и его здоровье". – 2010. – № 1. – С. 76-80.
207. Попова Т.Н. Свободнорадикальные процессы в биосистемах: учебное пособие/ Т.Н. Попова. – Старый Оскол: Кириллица, 2008 – 192с.
208. Попова Т.Н. Воздействие мелатонинергических препаратов на удельную активность ферментов глутатионового редокс-цикла при экспериментальном гипертиреозе/ Т.Н. Попова, А.А. Агарков, М.В. Горбенко // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48, № 8. – С. 14-19.



209. Применение антиоксиданта убихинона в комплексном лечении больных ИБС / В.А. Дудаев [ и др. ]// Кардиология. – 1989. – № 1. – С. 48-52.
210. Применение пептидных биорегуляторов в хирургии и онкологии / Б.И. Кузник [и др.]. – Чита: Полиграфсервис, 2001. —352 с.
211. Применение эпиталамина при климактерической миокардиопатии/ / Ф.И. Комаров // Клин. медицина. – 1995. –Т. 73, № 4. – С. 40-42.
212. Пучкова Т.Е. Снижение электрической прочности как основной механизм нарушения барьерной функции биомембран / Т.Е. Пучкова, А.В. Путвинский, Ю.А. Владимиров //Докл. АН СССР.– 1983.–Т. 270, № 6.– С. 1489-1492.
213. Радченко В.Г., Основы клинической гепатологии. Заболевания печени и билиарной системы. / В.Г. Радченко, А.В. Шабров, В.Н. Зиновьева // Санкт-Петербург : Диалект; Москва: БИНОМ, 2005. – 864с.
214. Райхлин Н.Т. АПУД-система: структура, функция, патология // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1997. - Т. 7, № 3. - С. 34-36.
215. Райхлин Н.Т. Мелатонин: вчера, сегодня, завтра / Н.Т. Райхлин // Клиническая медицина. — 2002. — № 5. — С. 72.
216. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов пищеварения / под ред. В.Т. Ивашкина. – 2-е изд. – Москва: Литтерра, 2011. – С. 49–58.
217. Роль окислительного стресса как компонента критических состояний в генезе нарушений гемостаза / И.Н. Пасечник [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2001. – №3. –С. 41-43.
218. Роль процессов свободнорадикального окисления в патогенезе инфекционных болезней / А.П. Шепелев [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 2000. – №2. –С. 54-59.
219. Роль системы Fas/Fas-лиганд в индукции апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах / Е.Н. Дмитриева [и др.] // Арх. Патологии. – 2003. – Т. 65, № 6. – С. 13–16.

220. Роль фосфолипазы А<sub>2</sub> в аноксическом повреждении энергозависимых функций митохондрий / Е.О. Брагин [и др.]// *Вопр. мед. химии.* –1977.– Т. 23, № 5. –С. 673—677.
221. Руководство по гастроэнтерологии / Т. 2 Болезни печени и билиарной системы / под ред. Ф.И. Комаров, А.Л. Гребенев. – Москва: Медицина, 1995. – Т. 2. – 525 с.
222. Рябиченко Е.В. Роль активных форм кислорода, генерируемых фагоцитами, в патогенезе заболеваний / Е.В. Рябиченко, В.М. Бондаренко, В.В. Рябиченко // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* –2000. –№ 4. Приложение. – С. 65 – 71.
223. Самуилов В.Д. Биохимия программируемой клеточной смерти (апоптоза) у животных/ В.Д.Самуилов // *Соросовский образовательный журнал.* – 2001. – Т. 7, №10. –С. 18-25.
224. Санина О.Л. Биохимическая роль церулоплазмينا и возможности его химического применения / О.Л. Санина, Н.К. Бердинских // *Вопросы медицинской химии.* – 1986. – Т. 32, № 5. – С. 7 – 14.
225. Свиридов М. М. Каталитические свойства 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крысы в норме и при токсическом гепатите / М. М. Свиридов, А. В. Семенихина, Т. Н. Попова// *Биомедицинская химия.* – 2006. – Т. 52, № 5. – С.479-488.
226. Свободнорадикальное окисление и старение/ В.Х. Хавинсон [и др.]. – Санкт- Петербург: Наука, 2003. –327 с.
227. Связь мелатонина с интенсивностью апоптоза и пролиферативной активностью в опухолях человека/ И.М. Кветной [и др.] // *Материалы 1-го съезда онкологов стран СНГ.* — Москва, 1996. — Ч.1. — С. 173.
228. Сеницкая Н.С. Роль пептидов в свободнорадикальном окислении и старении организма Текст. / Н.С. Сеницкая, В.Х. Хавинсон // *Успехи совр. биологии.* –2002. –Т. 122, №6. – С. 557-568.

229. Скулачев В.П. Возможная роль активных форм кислорода в защите от вирусных инфекций / В.П. Скулачев // Биохимия. – 1998. – Т. 63. –С. 1691-1694.
230. Скулачев В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма/ В.П. Скулачев // Биохимия. – 1999. –Т. 64. –С. 1679-1688.
231. Скулачев В.П. Кислород и явления запрограммированной смерти / В.П. Скулачев. – Москва: ИБМХ РАМН, 2000. – 47 с .
232. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода / В.П. Скулачев //Соросовский Образовательный Журнал. – 2001. – Т. 7, №6. –С. 4-10.
233. Слепушкин В.Д. Эпифиз, иммунитет и рак (теоретические и клинические аспекты) / В.Д. Слепушкин. –Томск: Изд-во Томского ун-та, 1990. –48 с.
234. Смирнова О.М.Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете / О.М. Смирнова, Т.В.Никонова / под ред. И.И.Дедова. – Москва: Медицина, 2003. – 40с.
235. Соловьева Д.В. Применение тималина и эпиталамина для коррекции возрастных нарушений гомеостаза у женщин/ Д.В. Соловьева, В.Х. Хавинсон // Клинич. геронтология. – 2000. – Т. 6, № 7-8.– С. 106.
236. Сорочан П.П. Рак молочной железы и мелатонин/ П.П. Сорочан, И.А.Громакова, Н.Э. Прохач // Онкология. – 2007. – Т9, №1. –С. 11-16.
237. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В.Н. Бобырев [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 1994. – Т. 57, № 1. – С. 47 – 54.
238. Справочник по гастроэнтерологии / под ред. В.Т. Ивашкина, С.И. Рапопорта. – Москва: Медицинское информационное агенство, 2011.– 472 с.
239. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / под ред. В.Н. Ореховича. – Москва: Медицина, 1972. – С. 63-64.
240. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснопольский. – Москва: Наука, 1991. – 136 с

241. Суханова Г.А. Апоптоз: учебное пособие / Г.А.Суханова, О.Е.Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ. 2009. – 172 с.
242. Сюткин В.Е. Современные представления и фиброзе печени / В.Е.Сюткин // Гепатологический форум. –2007. – № 2. — С. 3-8.
243. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях Текст. / Ю.И. Губский [и др.]// Современные проблемы токсикологии. – 2005. – № 3. – С. 20-27.
244. Трубников Г.А. Антиоксиданты в комплексной терапии больных хроническим бронхитом / Г.А. Трубников, Ю.И. Журавлев // Рос. мед. журн. – 1998. –№ 2. – С.38-41.
245. Турков М.И. Супероксиддисмутаза: свойства и функции / М.И. Турков // Успехи соврем. биологии. – 1976. – Т. 81, № 3. – С. 341 – 354.
246. Утешев Д.Б. Апоптоз: фармакологические аспекты / Д.Б. Утешев, А.В. Сергеев, Б.С. Утешев // Экспериментальная и клиническая фармакология – 1998. – Т.61, №4. – С.57-65.
247. Участие железа в образовании ОН-радикалов в системе генерирующей супероксидный анион-радикал / А.Н. Осипов [и др.] // Биофизика. – 1981.– Т. 26.– С. 193—199.
248. Файззулина Р.А. Влияние микроэлементарных нарушений на состояние ПОЛ при хроническом гастродуодените у детей / Р.А. Файззулина // Педиатрия. – 2002. –№3. –С. 44-48.
249. Факторы риска гепатотоксичности при проведении противоопухолевой терапии по поводу рака молочной железы / И.А. Королева [и др.]// Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17, № 1. Приложение 29. – С. 66.
250. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства «гепатон» при экспериментальном повреждении печени / С.В. Лемза [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – Т. 72. № 2. – С. 181–184.

251. Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов при экспериментальной ишемии мозга / Т.Н. Федорова, А.А. Болдырев, И.В. Ганнушкина // Биохимия. – 1999.– Т. 64, №1. –С. 94-98.
252. Фролов В.М., Пересадин Н.А., Пустовой Ю.Г. Комбинированная фармакотерапия токсических гепатитов у больных туберкулезом легких / В.М. Фролов, Н.А. Пересадин// Пробл. туберкулеза. – 1992. –№ 5–6. –С. 32–41.
253. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью/ П.М.Чумаков // Биохимия. – 2000. – Т.65. – С. 34-47.
254. Хавинсон В.Х. Применение эпیتالамина при инсулиннезависимом сахарном диабете / В.Х. Хавинсон, Т.С.Шутак. – Санкт-Петербург: ИКФ Фолиант, 2000. – 61 с.
255. Хазанов А.И. Клинические аспекты лабораторной диагностики острых повреждений печени / А.И.Хазанов // Лаб. дело. – 1987. – № 10. – С. 736–738.
256. Хазанов А.И. Алкогольная болезнь печени — важная проблема современности /А.И. Хазанов// Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 2003.-№ 2. -С. 13-20.
257. Ханина Р.Л. Кинетика активности каталазы в сыворотке крови, печени и структурах мозга при хронической алкоголизации животных / Р.Л.Ханина, Г.Н.Смелянская // Алкогольная интоксикация и зависимость. Механизмы развития, диагностика, лечение. – Минск, 1988. – С.70-78.
258. Хансон К.П. Апоптоз: современное состояние проблемы/ К.П. Хансон // Известия АН. Серия биологическая. – 1998. – №2. –С. 134-141.
259. Харченко Н.В. Применение урсодезоксихолевой кислоты в лечении больных с различными заболеваниями печени и желчевыводящих путей / Н.В. Харченко // Сучасна гастроентерологія. – 2002. – № 1. – С. 36-38.
260. Хомерики С. Г. Алкогольная болезнь печени: механизмы развития, морфологические проявления, дифференциальная диагностика и патогенетические подходы к терапии / С.Г. Хомерики, Н.М.Хомерики // Consilium medicum. Гастроэнтерология. –2012, –№1. –С. 27–34.

261. Чазов Е.И. Эпифиз: роль и место в системе нейроэндокринной регуляции / Е.И.Чазов, В.А.Исаченко. – Москва: Наука, 1974. – 238 с.
262. Чекнев С.Б. Активные метаболиты кислорода в обеспечении и контроле естественных цитотоксических реакций / С.Б. Чекнев // Вестник РАМН. – 1999. – № 2. – С. 10-15.
263. Ченас Н.К. Соотношение между глутатионредуктазной и диафоразной активностью глутатионредуктазы из *Sacharomyces cerevisiae* / Н.К. Ченас, Р.К. Ракаускенс, Ю.Ю. Кулис // Биохимия. – 1989. – Т. 54, № 7. – С. 1090-1097.
264. Чиркин, А.А. Молекулярные механизмы повреждения печени / А.А. Чиркин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – № 1. – С. 26–33.
265. Шайдукова Л.К. Мишени психотерапии при алкоголизме у женщин / Л.К. Шайдукова // Вопросы наркологии. – 1994. – № 3. – С. 13-20.
266. Шаранов Б.П. Окисление церулоплазмина гипохлоритом, потеря голубой окраски и сохранения оксидазной активности / Б.П. Шаронов, Н.Ю. Говорова // Биохимия. – 1990. – Т. 55, № 6. – С.1145-1148.
267. Шелепина Е.П. Молекулярный механизм трансформации активности ксантиноксидазы под действием субстрата / Е.П. Шелепина, В.Г. Антонов, Л.А. Кожемякина // Биохимия. – 1990. –Т. 55, №9. –С. 1707 – 1712.
268. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей: практическое руководство / Ш. Шерлок, Дж.Дули: пер. с англ./ под ред. З. Т. Апросиной, Н. А. Мухина. –Москва: Гэотар- Мед., 2002. – 859 с.
269. Шульпекова Ю.О. Лекарственные поражения печени Ю.О. Шульпекова // Справочник поликлин, врача. – 2008. – № 8. – С. 29-32.
270. Экстрапинеальный мелатонин: место и роль в нейроэндокринной регуляции гомеостаза/ И.М. Кветной [и др.] // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1999. – Т. 127, № 4. – С. 364-370.
271. Эфендиев А.М. Взаимосвязь биохимических показателей и avidности антител у больных сахарным диабетом 2 типа / А.М.Эфендиев, Г.И.Азизова, Г.Р. Гусейнова // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – №3. – С.74-79.

272. Юрьев К.Л. Силимарин: эффекты и механизмы действия, клиническая эффективность и безопасность/ К.Л. Юрьев//Укр. мед. Часопис. – 2010. – Т.2. – С. 71–75
273. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1998. – №2. – С. 3848.
274. A comparative study of the effects of the pineal gland on prolactin synthesis, storage and release in male and female blind-anosmic rats / C. A. Leadem [et al.] // Biol. Reprod. – 1982. – Vol. 26. – P. 413-421.
275. A comparison of superoxide releasing response in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes/ S. Kitagawa [et al.] // Immunology. – 1980. – Vol.125. – P. 359-364.
276. A critical revaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity / S. Goldstein [et al.] // Free radic. biol. and med. – 1988. – Vol. 4, N5. – P. 295 – 303.
277. A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C / I. Semak [et al.] // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44, N 26. – P. 9300-9307.
278. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes/ C. Tomas- Zapico [et al.] // J. Pineal Res. – 2005. – N 39. – P. 99-104.
279. A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis / S.S. El-Kamary [et al.] //Phytomedicine. – 2009. – Vol.16. – P. 391–400.
280. Abel E.L. Maternal risk factors in Fetal Alcohol Syndrome: provocative and permissive influences/ E.L. Abel, J.H. Hannigan //Neurotoxicol. Teratol. –1995. – Vol.17, N 4. – p. 445–462.
281. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration /D.J. Tuma [et al.]// Hepatology. – 1996. – Vol. 23, N 4. – P. 872 - 880.

282. Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin / P. Winyard [et al.]// *Int. J. Biochem.* –1984. – Vol. 16. – P. 1273-1278.
283. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review/ R.I. Reiter [et al.] // *J. Biomed Sci.* – 2000. – Vol.7. – P. 444-458.
284. Activation of ccp32-like caspases contributes to newonal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury/ A.G. Yakovlev [et al.] // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol.17. – P. 7415-7424.
285. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets/ M.C. Picinato [et al.] // *J. Pineal Res.* – 2008. – Vol. 44. – P. 88—94.
286. Activity of polyunsaturated phosphatidylcholine in HbsAg negative chronic active hepatitis and active alcoholic hepatitis/ G.L.A. Bird [et al.] // *J. Gastroenterol.* – 1991. – Vol. 29. – P. 21-24.
287. Adams J.M. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival/ J.M. Adams, S. Cory // *Science.* – 1998. – Vol.281. – P. 1322-1326.
288. Administration of melatonin after onset of ischemia reduces the volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model / Z.Pei [et al.]// *Stroke* – 2003. – Vol.32.– P. 770–775.
289. Afanas'ev I.B., Chelating and Free Radical Scavenging Mechanisms of Inhibitory Action of Rutin and Quercetin in Lipid Peroxidation / I.B. Afanasev// *Biochem Pharmacol.* –1989. – Vol.38. – P.1763-1769,
290. Aggarwal B.B. Tumor necrosis factors receptors associated signaling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kB / B.B. Aggarwal // *Ann. Rheum. Dis.* – 2000. – Vol. 59. – P. 6-16.
291. Alcohol and paracetamol/ G. Graham [et al.] // *Australian Prescriber.* – 2004. – Vol. 27, N 1. – P. 14-15.



292. Alcohol-metabolizing genes and alcoholism among Taiwanese Han men: Independent effect of ADH2, ADH3 and ALDH2 /W. J. Chen [et. al.]//British J. of Psychiatry. – 1996. –N 168. – P. 762 - 767.
293. Alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulinresistance and fat accumulation in the liver in humans/ H. Stefan [ et al.] // Diabetes Care. – 2006. – Vol. 29. –P. 853-857.
294. Ameisen J.S. Programmed cell death (apoptosis) and AIDS pathogenesis // AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1994, Vol.10, Suppl.1, P.3-5.
295. American Gastroenterological Association medical position statment: nonalcoholic fatty liver disease //Gastroenterology. – 2002. – Vol.123. – P. 1702-1704.
296. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9/ H. Zou [ et al.] //J. Biol. Chem. – 1999. – Vol.274. – P. 11549-11556.
297. An induced proximity model for caspase-8 activation/ M. Muzio [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, N 5. – P. 2926-2930 .
298. Anisimov V.N. Carcinogenesis and aging/ V.N. Anisimov //Adv. Cancer Res. – 1983 – Vol.40. – P. 265-324.
299. Antioxidant enzyme response to exercise and aging/ L.L. Ji[ et al.] //Med. Sci. Sports Exerc. – 1993. – Vol.25. – P. 225–232.
300. Antioxidant status in newborns and infants suferring from congenital heart defects / W. Rokicki [et al.] // Wiad Lek. – 2003. – Vol. 56, N 8. – P.337-340.
301. Apoptosis: a basic biological phenomen with wide-rinding implications tissue kinetics/ J.F. Kerr [et al.] //Brit. J. Cancer. – 1972. – Vol. 26. – P. 239—257.
302. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury/ M.E. Guicciardi [ et al.] //Gut. – 2005. – Vol. 54. – P. 1024-1033.
303. Arends M.J. Apoptosis. Mechanism and role in pathology/ M.J. Arends, A.H. Wyllie // Intern.Rev. Exp. Pathol. – 1991. – Vol.32. – P.223-254.
304. Arendt J. Effect of melatonin on the human electrocardiogram and simple reaction time responses/ J. Arendt // Pineal Res. Rev. –1988. – Vol. 5. – P. 427-435.

305. Arendt J. Melatonin and Mammalian Pineal Gland / J. Arendt. –London: Chapman and Hall, 1995. – 331 p.
306. Ashkenasi A., Dixit V.M. Death Receptors: Signaling and Modulation/ A. Ashkenasi, M. Dixit // Science. – 1998. – Vol.281. – P.1305-1308.
307. Attenuation of alcoholinduced apoptosis of hepatocytes in rat liver by polyenylphosphatidylcholine (PPC) / I. Mil [et al.]// Alcohol. Clin. Exp.Res. – 2000. – Vol.24, – P.207-212.
308. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family/ M. Enders [et al.] //J. Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1998. – Vol.18. – P. 238-247.
309. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor/ H. Yaoita [et al.] //Circulation. – 1998. – Vol.97, N 3. – P. 276-281.
310. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization/ S.M. Srinivasula [et al.] // Mol Cell. –1998. – Vol.1, N 7. – P. 949-957.
311. Bakker S.J. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure / S.J. Bakker, U. Teerlink // Atherosclerosis. – 2000. – Vol. 148. – P. 17-21.
312. Ban F. Removal of phenol from waste water in the Fenton process/ F.Ban, H.Z.Wu //Safety and Environ.Eng. – 2005. – N.3. – P. 39-41.
313. Banerjee R. Redox biochemistry/ R. Banerjee. – New Jersey: John Wiley & Sons. – 2008. – 318 p.
314. Barigana M. Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide/ M. Barigana //Science. 1998. – Vol. 281. – P. 1302-1303.
315. Bartsch C. Melatonin in clinical oncology/ C. Bartsch //Neuroendocrinology letters. – 2002. – Vol. 23. – P. 30-38.
316. Bartsch C. The Pineal Gland and Cancer, Neuroimmunoendocrine Mechanisms in Malignancy/ C. Bartsch. — Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag, 2001. – 578 p

317. Bartsch H. Seasonality of pineal melatonin production in the rat: possible synchronization by the geomagnetic field / H. Bartsch // *Chronobiol. Int.* – 1994. – Vol.1 1. – P. 21-26
318. Basaga H.S. Biochemical aspects of free radicals/ H.S. Basaga // *Biochem. and Cell Biol.* – 1990. – Vol. 68. – P. 989-998.
319. Bast A. Oxidants and antioxidants: State of the art/ A. Bast [et al.] // *Amer. J. Med.* – 1991. – Vol. 91. – P. 2-13.
320. Bates S. Mechanisms of p53-mediated apoptosis / S. Bates, K.H. Vousden // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – Vol.55. – P.28-37.
321. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis/ A. Gross [et al.] // *Genes and Dev.* – 1999. – Vol.13. – P. 1899-1911.
322. Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis and to preclude autoimmunity / P. Bouillet [et al.]//*Science.* – 1999. – Vol.286. – P. 1735-1738.
323. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells / M. Jaattela [et al.]//*Oncogene.* – 1995 – Vol. 10, N 12. – P. 2297-2305.
324. Beinert H. Iron-sulfur clusters: agents of electron transfer and storage, and direct participation in enzymic reactions / H. Beinert // *Biochem. Soc. Trans.* – 1986. – Vol. 14, N 3. – P. 527-533.
325. Ben-Nathan D. Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses/ D. Ben-Nathan // *Arch. Virol.* – 1995. – Vol.140. – P. 223-230.
326. Berdanier C.D. Linking mitochondrial function to diabetes mellitus: an animal's tale / C.D. Berdanier // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol.293. – P.830-836.
327. Betke K. Standardized method for G-6-PD assay of haemolysates / K. Betke, G. J. Brewer, H. N. Kirkman // *Technical Report Series*, 1967.- V.366. – p. 30–32
328. Bianchini A. Inhibition of endothelial nitric-oxide synthase by ceruloplasmin / A. Bianchini, G. Musci, L. Calabrese // *J. Biol. Chem.* –1999. – Vol. 274. – P. 20265-20270.

329. Biburger M. Tiegs G.  $\alpha$ -Galactosylceramide – induced liver injury in mice is mediated by TNF- $\alpha$  but independent of Kupffer cells/ M. Biburger // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 175. – P. 1540–1550.
330. Binding of 2-[125I]melatonin by rat thymus membranes during postnatal development/ F. Martin- Cacao [et al.] // *Immunol. Lett.* –1993. – Vol.36, N 1. – P. 59-63.
331. Biotherapy with the pineal immunomodulating hormone melatonin versus melatonin plus aloe vera in untreatable advanced solid neoplasms/ P. Lissoni [et al.] // *Natural Immunity.* – 1998. – Vol.16. – P. 27-33.
332. Biswal S.S. Glutathione Oxidation and Mitochondrial Depolarization as Mechanisms of Nordihydroguaiaretic Acid-Induced Apoptosis in Lipoygenase-Deficient FL5.12 Cells / S.S. Biswal, K. Datta, S.D. Shaw // *Toxicolog. Sci.* – 2000. – Vol. 53. – P. 77-83.
333. Blaser M.J., Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach /M.J. Blaser // *Cancer.Res.*- 1995. – Vol. 55. – P. 2111-2115.
334. Blask D.E. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture/ D.E. Blask // *J. Pineal Res.* – 1991. – Vol. 10. – P. 36-42.
335. Blask D.E. Melatonin in oncology /D.E. Blask // *Melatonin. Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications*/ ed. H.-S. Yu., R.J. Reiter. –Boca Raton, FL: CRC Press, 1993. – P. 447-475.
336. Blum K. Alcoholism: Scientific basis of a neuropsychogenic sease / K. Blum, M.C. Trachtenberg // *Int. J. Addict.* – 1988. – Vol. 23, N 8. – P. 781-796.
337. Boerner L. J. Metal complex-DNA interactions: from transcription inhibition to photoactivated cleavage / L. J. Boerner, J. M. Zaleski // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2005. – Vol. 9, N 2. – P. 135-144.

338. Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats/ K. Hayashida [et al.] //Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol. – 2004. – Vol.286. – P.359—365.
339. Brigelius-Flone H. Vitamin E: function and metabolism / H. Brigelius- Flone // Faseb. J. – 1999. – Vol.13, N 10. – P.1145-1155.
340. Brown G. M. Light, melatonin and the sleep-wake cycle / G. M. Brown // J. Psychiatry Neurosci. – 1994. –Vol. 19, N 5. – P. 345–353.
341. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications/ M. Brownlee //Nature. – 2001. – Vol.414. – P.813–820.
342. Brzezinski A. Melatonin in humans/ A. Brzezinski // The New Engl. J. Med. – 1997. – Vol.336. – P. 186–195.
343. Burton G.W. Vitamin E: molecular and biological function/G.W. Burton // Proc. Nutr. Soc. –1994. –Vol.53, N 2. –P.251-262.
344. Cagnacci A. Effect of exogenous melatonin on vascular reactivity and nitric oxide in postmenopausal women: role of hormone replacement therapy/ A.E. Cagnacci // Clin. Endocrinol. –2001. – Vol.54. – P. 261-266.
345. Cagnacci A. The effect of light on core body temperature is mediated by melatonin in women /A.Cagnassi, R.Soldani, S.S.C.Yan //J. Clin. Endocr. – 1993. –Vol. 76. – P. 1036-1038.
346. Cairns J.S., Mainwaring M.S., Cacchione R.N. et al. Regulation of apoptosis in thymocytes/ J. Cairns // Thymus. – 1993. – Vol.21, N.3. – P. 177-193.
347. Cales P., Laine F., Boursier J. et al. Comparison of blood tests for liver fibrosis specific or not to NAFLD/ P. Cales [et al.] // Hepatology. – 2009. – Vol. 50, N1. – P. 165–173.
348. Campylobacter pylori-associated gastritis and immune response in a population at increased risk of gastric carcinoma/ J.G. Fox [et al.] //Am. J. Gastroenterol. – 1989. – Vol. 84. – P. 775-781.

349. Cardioprotective effects of melatonin against myocardial injuries induced by chronic intermittent hypoxia in rats/ Y. Hang-Mee [ et al.] //J. Pineal Res. – 2015. – Vol. 58, N 1. – P. 12-25.
350. Cardiovascular effects of melatonin in hypertensive patients well controlled by nifedipine: a 24-hour study/ P. Lusardi [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. – 2000. – Vol.49. – P.423–427.
351. Carmen R. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin / R. Carmen, C. Juan // Journal of Pineal Research. – 2004. – Vol. 36. – P. 1–9.
352. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta/ T. Nakagawa [et al.] // Nature. – 2000. – Vol. 403. – P. 98-103.
353. Catalase and superoxide dismutase activities as biomarkers of oxidative stress in workers exposed to mercury vapo / R. Perrin-Nadif [et al.] // J. Toxicol. Environ. Health. – 1996. – Vol. 48, N2. – P. 107-119.
354. Catalase inhibition with 3-amino-1,2,4-triazole does not abolish infarct size reduction in heat-shocked rats/ Y. Auyeung [et al.] // Circulation. – 1995. –Vol. 92.– P. 3318-3322.
355. Catalase: its role in xenobiotic detoxification / E.J. Calabrese [et al.] // Pharmacol. Ther. – 1989. – Vol. 44 – P. 297-307.
356. Catalasedependent ethanol oxidation in perfused rat liver. Reffluirement for fatty acidstimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by peroxisomes/ J.A. Handler [et al.] // Eur.J. Biochem. – 1988. – Vol. 176. - P.477 – 484.
357. Cellular regulation by hydrogen peroxide. /Ree S. G. [et al.] //J. Amer. Soc. Nephrol. – 2003. – N 14. – P. 211—215
358. Cellular signaling mechanisms in alcohol-induced liver damage/ J.B. Hoek [et al.] //Seminars in Liver Disease. – 2004. – Vol. 24. – P. 257-272.
359. Ceruloplasmin and cardiovascular disease/ B. Mazumder [et al.] //Free Radic Biol Med. – 2000. – Vol. 28, N 12. – P. 1735 – 1744.

360. Changes in serotonin level and turnover in discrete hypothalamic nuclei after pinealectomy and melatonin administration to rats / J. M. Miguez [et al.] // *Neurochem. Int.* – 1996. – Vol. 29, N 6. – P.651-658.
361. Characterization of melatonin binding site in the rat hypothalamus using 2-(125I)-idomelatonin/ J. English [et al.] // *Chinese J. Physiol.* – 1988. – N 4 – P. 236
362. Chen X. L. Superoxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and iron are required for TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 gene expression in endothelial cells: role of Rac1 and NADPH oxidase / X. L. Chen, Q. Zhang, R. Zhao // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2004. – Vol. 286, N 3. – P. 1001-1007.
363. Chopp M. Apoptosis in focal cerebral ischemia/ M. Chopp, Y.Li // *Acta Neurochir.* – 1996. – Vol. 66. – P. 21-26.
364. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants/ J. Liu [ et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol. 89. – P. 21–29.
365. Circadian rhythms of atrial natriuretic peptide, blood pressure and heart rate in normal subjects / F. Portaluppi [et al.] // *Cardiology.* – 1989. – Vol.76. – P.428–432.
366. Circulating immune complexes among diabetic children / G. Nicoloff [et al.] // *Clin. Dev.Immunol.* – 2004. – N 11. – P.61.
367. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis/ H.Li [et al.] // *Cell.* – 1998. – Vol. 94. – P.491-501.
368. Cohen G. M. Caspases: the executioners of apoptosis/ G.M. Cohen. // *J. Biochem.* – 1997. – Vol.326. – P. 1-16.
369. Cohen J.J. Apoptosis/ J.J. Cohen // *Immunol. Today.* – 1993. –Vol. 14. – P. 126-130.
370. Comparison of the effects of dopamine agonists on self-stimulation of the hypothalamus with lesioning of mesolimbic brain structures in rats reared in conditions of social isolation / G.N. Panchenko[ et al.] // *Neurosci. Behav. Physiol.* – 1998. – Vol. 28, N 2. – P. 130-135.

371. Comparison of two clinical scale in the causalty assessment of druy induced liver disease / M. Garcia- Cortes [et al.]// J. Hepatol. – 2006. – Vol. 44, Suppl. 2. – P. 253.
372. Components of biological variation, including seasonality, in blood concentration of TSH, FT3, FT4, PRL, cortisone and testosterone in healthy volunteers / M. Maes [et al.]// Clin. Endocrinol. (Oxf). – 1997. –Vol.46. –P.587-598.
373. Conti A. Melatonin-induced immunoopioids: role in lymphoproliferative and autoimmune diseases./ A.Conti, G.J. M. Maestroni //Adv. Pineal Res. – 1994. – Vol.7. – P. 83-100.
374. Contrasting effects of propionate and propionyl-L-carnitine on energy-linked processes in ischemic hearts/ R. Di Lisa [et al.] //Am. J. Physiol. – 1994. – Vol.267. – P. 455-461.
375. Controlled study of the effect of silymarin on alcoholic liver disease/ D. Bunout [ et al.] //Rev. Med. Chil. – 1992. – Vol. 120. – P. 1370-1375.
376. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation/ F.Martin- Cacao [et al.] //Blood. – 2005. – Vol. 105, N. 12. – P. 4613 – 4619.
377. Correa P. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation/ P. Correa, M.J. Miller //Br. Med. Bull. – 1998. – Vol.54. – P. 151-162.
378. Crabb D.W. Matsumoto M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. / D.W. Crabb, M. Matsumoto //Proc. Nutr. Soc. 2004 –Vol. 63, N 1. – P. 49–63.
379. Crabtree J.E.Mucosal IgA recognition of Helicobacter pylori 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology/ J. E. Crabtree // Lancet. – 1991. – Vol. 338. – P. 332—335.
380. Cryptogenic Cirrhosis: Clinical Characterization and Risk Factors for Underlying Disease/ H. Stephen [et al.] //Hepatology. – 1999. – Vol. 29, N 3. – P. 664–669.
381. Cytochrom P-450-mediated differential oxidative modification of proteins: albumin, apolipoprotein E, and CYP2E1 as targets/D.W. Choi [ et al. ]//J. Toxicol. Environ. Health A. – 2004. – Vol. 67. –P. 2061-2071.



382. CytochromeP450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes/ H. Yamazaki [et al.]//Carcinogenesis. – 1992. – Vol. 13. – P.1789–1794.
383. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study/ A.E. Feldstein [et al.]// Hepatology. – 2009. – Vol.50. – P. 1072-1078.
384. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension / A.J.L. Frank [et al.]//Hypertension. – 2004. – Vol.43. – P. 192-197.
385. Das A.M. Regulation of the mitochondrial ATP synthase in intact rat cardiomyocytes/ A.M. Das [et al.] //Biochem. J. – 1990 – Vol. 266. – P. 355-361.
386. Das U.N. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acid in cardiovascular diseases: but, why and how? / U.N. Das // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. – 2000. – Vol. 63, N 6. – P. 351 – 6217.
387. Davis C. Longitudinal changes of manganese-dependant superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron in women/ C. Davis, J.T. Greger // Am. J. Clin. Nutr. – 1992. –Vol. 55. – P. 747-752.
388. Dawson D. Integrating the actions of melatonin on human physiology / D. Dawson, C. J. van den Heuvel. // Ann. Med. – 1998. – Vol. 30. – P. 95 – 102.
389. De Almeida A.F. Maximal activities of key enzymes of glutaminolysis, glycolysis, Krebs cycle and pentoseposphate pathway of several tissues in mature and aged rats / A.F. De Almeida, R. Curi, P. Newsholme // Int. J. Biochem. – 1989. – Vol. 21, N 8. – P. 937-940.
390. Desagher S. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis/ S. Desagher // J. Cell Biol. – 1999. – Vol. 44. – P. 891-901.
391. Dey A. Cederbaum A. I. Alcohol and oxidative liver injury/ A. Dey// Hepatology. – 2006. – Vol. 43, N 2. – P. 63–74.
392. Diabetes and cancer / P.Vigneri [et al.]. // Endocrine-Related Cancer. – 2009. – Vol.16. – P. 1103–1123.

393. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats / I.B. Afanas'ev [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 1995. – Vol.50. – P.627-635
394. Different Expression of the Melatonin Receptor in Human Monocytes 1 / J.B. Marc [et al.]// *Journal of Immunology.* – 1998. – Vol.160. – P. 1191-1197.
395. Differential expression and estrogen response of lactoferrin gene in the female reproductive tract of mouse, rat and hamster/ C.T. Teng [et al.] // *Biol Reproduct.* – 2002. – Vol.67. – P. 1439—1449.
396. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations / H.W. Gedde [et al.]// *Hum. Genet.* – 1992. – Vol. 88. – P. 344-346.
397. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization/ A. Menerndez- Pelarez [et al.] // *J. Pineal Res.* – 1993. – Vol.15. – P. 59-69.
398. Do plasma melatonin concentrations decline with age?/ J.M. Zeitzer [et al.] // *Am. J. Med.* – 1999. – Vol. 107. – P.432-436.
399. Dopamine receptors: From structure to function/ C. Missale [ et al.] // *Physiol. Rev.* –1998. – Vol. 78, N 1. – P. 189-225.
400. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function / W. Droge // *Physiol. Rev.* – 2002. –Vol. 82. –P. 47–95.
401. Drug induced hepatitis/ N. Kaplowitz [et al.] // *Chronic hepatitis: metabolic, cholestatic, viral and autoimmune* / eds. M. Diel [et al.]. – Dordrecht: Springer, 2007. – P. 32–42.
402. Earnshaw W.C. Nuclear changes in apoptosis/ W.C. Earnshaw // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1995.– N 7. – P. 337–343.
403. Eaton J. W. Molecular bases of cellular iron toxicity / J. W. Eaton, M. Qian // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – Vol. 32, N 9. – P. 833-840.
404. Effect of ethanol on carbon tetrachloride levels and hepatotoxicity after acute carbon tetrachloride poisoning/ R. Teschke [et al.] // *Arch Toxicol.* – 1984. – Vol.56. – P. 78–82.

405. Effect of insulin and melatonin on acetylcholinesterase activity in the brain of amnesic mice/ R. Agrawal [et al.] // *Behav. Brain Res.* – 2008. – Vol. 189. – P. 381—386.
406. Effects of exogenous melatonin on pituitary hormones in humans / T. Ninomiya [et al.] // *Clin. Physiol.* – 2001. – Vol. 21. –P. 292-299.
407. Effects of ischemia on function and metabolism of the isolated working rat heart/ J.R. Neely [ et al.] // *Am. J. Physiol.* –1973. – Vol.225. – P. 651-658.
408. Effects of melatonin in perimenopausal and menopausal women: a randomized and placebo controlled study / G. Bellipanni [ et al.] // *Exp. Gerontol.* –2001. – Vol. 36. – P. 297-310.
409. Effects of transgene expression of superoxidedismutase and glutathione peroxidase on pulmonary epithelial cell growth in hyperoxia/ H.C. Koo [et al.] // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 718–726.
410. Effects of vitamin E supplementation on plasma membrane permeabilization and fluidization induced by chlorpromazine in the rat brain/ N. Maruoka [et al.] // *J. Psychopharmacol.* – 2008. – Vol.22, N 2. – P. 119–127.
411. Epitopes and functional responses defined by a panel of anti-Fas (CD95) monoclonal antibodies/ Y. Komada [ et al.] // *Hybridoma.* – 1999. – Vol. 18. –P. 391-398.
412. Ethanol potentiates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition./ J.G. Pastorino [et al.]// *Hepatology.* – 2000. – Vol.31. – p. 1141-1152.
413. Ethanol-induced apoptosis in polarized hepatic cells possibly through regulation of the Fas pathway/ B.L. Mc Vicker [et al.] // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research.* – 2006. – Vol. 30. – P. 1906-1915.
414. Ethanol's acute effects on thermoregulation: Mechanisms and consequences / R.L. Alkana [et al.]// *Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System.* – Philadelphia: CRC Press, 1995. – P. 291 - 328.

415. Experimental studies of the pineal gland preparation Epithalamin/ V. Khavinson [et al.] // The pineal gland and cancer. —Springer; Verlag; Berlin ;Heidelberg, 2001. — 578 p.
416. Expression and possible functions of the cholinergic system in a murine embryonic stem cell line/ L.E. Paraoanu [ et al.] // Life Sci. —2007.— Volk. 80, N 24–25.— P. 2375–2379.
417. Fas system and apoptosis in viral hepatitis / N. Hayashi [et al.]//J. Gastroenterol. Hepatol. — 1997. —Vol.12. —P.223-226.
418. Ferreira D.S. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring/ D.S. Ferreira //PLoS One. — 2012. — Vol.7, N 6. —P. 387-395.
419. Finocchiaro L.M. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes/ L.M. Finocchiaro //Biochem. J. — 1991. — Vol. 280. — P. 727–731.
420. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system / R.J. Reiter [et al.] // Acad. Sci. — 2001. — N 939. — P. 200-215.
421. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system/ R.J. Reiter [ et al.] //Annals of the New York Academy of Sciences. — 2001. — Vol. 939. — P. 200–215.
422. Freiberg R.A. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts/ R.A. Freiberg [ et al.] //J. Invest. Dermatol. — 1997 — Vol. 108. — P. 215-219.
423. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets/ R.D. Ramracheya [ et al.] //J. Pineal Res. — 2008. — Vol.44, N 3. — P.273–279.
424. Gall C. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction / C. Gall, JH. Stehle, Dr. Weaver // Cell Tissue Res. — 2002. — Vol.309. — P.151-62.

425. Ganesh Pai C. Evidence for oxidant stress in chronic pancreatitis / C. Pai Ganesh // Indian. J. Gastroenterol. – 1999. – Vol. 18, N 4. – P. 156-157.
426. Gardner P.R. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs / P.R. Gardner, D.M. Nguyen, C.W. White // Proc. Nat. Acad. Sci. – 1994. – Vol. 91, N 25. – P. 12248 – 12252.
427. Gastrointestinal and Liver Diseases: pathophysiology, diagnosis, management / M. Feldman] et al.]– 7th ed.– Philadelphia: Saunders, 2002. – P. 1403–1447.
428. Gastroprotective Effect of Selenium on Ethanol-Induced Gastric Damage in Rats/ K. Jeong- Hwan [et al.] //Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13. – P. 5740-5750.
429. Glutathione reductase from human erythrocytes. The sequences of the NADPH domain and of the interface domain / R.L. Krauth-Siegel [et al.] // Eur. J. Biochem. – 1982. – Vo. 121. – P. 259-267.
430. Glutathione reductase: comparison of steady-state and rapid reaction primary kinetic isotope effects exhibited by the yeast, spinach, and Escherichia coli enzymes / M.A. Vanoni [et al.] // Biochemistry. – 1990. – Vol. 29. – P. 5790-5796.
431. Gonzalez F.J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1/ F.J. Gonzalez //Mutat Res. – 2005. – Vol. 569, N 1-2. – P. 101-110.
432. Gorbenko M.V. The effect of melaxen and valdoxan on the activity of the glutathione antioxidant system in rats with experimental hyperthyroidism/ M.V. Gorbenko, T.N. Popova, K.K. Shulgin // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. – 2013. – Vol. 7, N 1. – P. 27-31.
433. Gorbenko M.V. Effects of melaxen and valdoxan on superoxide dismutase and catalase activities in experimental hyperthyroidism/ M.V. Gorbenko, T.N. Popova, K.K. Shulgin // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2014. – Vol.47, N 11. – P. 1-4.
434. Goth L. A new type of inherited catalase deficiencies: its characterization and comparison to the Japanese and Swiss type of acatalasemia/ L. Goth //Blood Cells Mol Dis. – 2001. – Vol.27. – P. 512-517.

435. Green D.R. Apoptotic pathway: the road to ruin/ D.R. Green //Cell. – 1998. – Vol. 94. – P. 695-698.
436. Guerrero J.M. Melatonin-immune system relationships /J.M. Guerrero, R.J. Reiter //Curr. Top. Med. Chem. –2002. –Vol.2, N2. – P.167-179.
437. Gutteridge J.M.C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage / J.M.C. Gutteridge // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, N 12. – P.1819 – 1828.
438. Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge // Clarendon Press, Oxford. – 1989. – P. 8445-8449.
439. Ham A.J. Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation / A.J. Ham, D.C. Liebler // Arch. Biochem. Biophys. – 1997. – Vol. 339. – P. 157 – 164.
440. Hardeland R. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology/ R. Hardeland // Int.J.Biometeorol. – 1997. – Vol.41, N2. – P.47-57.
441. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin – Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance/ R. Hardeland //Endocrine. – 2005. – Vol. 27. – P. 119-130.
442. Haus E. Principles in clinical chronobiology/ E. Haus // Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine / eds. Y. Touitou, E. Haus. — 2007. — P. 6-34.
443. Hawke R.L. Silymarin Ascending Multiple Oral Dosing Phase I Study in Noncirrhotic Patients With Chronic Hepatitis C/ R.L. Hawke //J. Clin. Pharmacol. – 2010. – Vol.50. – P. 434–449.
444. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis/ A.E. Feldstein [et al.] // Gastroenterology. – 2003. –125, N 2. – P. 437–443.
445. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis / S. Natozi [et al.]// J. Hepatol. – 2001. – N 34. – P. 248-253.
446. High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice/ S. Cazanave [et al.] //Journal of Hepatology. – 2007. – Vol.46. – P. 858–868.

447. Hirling H. Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase / H. Hirling, B.R. Henderson, L.C. Kühn // *EMBO J.* – 1994. – Vol. 13. – P. 453–461.
448. Hohnholt M.C. Iron-dependent formation of reactive oxygen species and glutathione depletion after accumulation of magnetic iron oxide nanoparticles by oligodendroglial cells / M. C. Hohnholt, R. Dringen // *Journal of Nanoparticle Research.* – 2011. – Vol. 13, N 12. – P. 6761-6774.
449. Hojer J. Severe metabolic acidosis in the alcoholic: Differential diagnosis and management / J. Hojer // *Human and Exper. Toxicol.* – 1996. – Vol. 15, N 6. – P. 482 – 488.
450. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase/ G.R. Upchurch [et al.]//*J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P.17012-17017.
451. Hoyos M. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet – induced hypercholesterolemic rats/ M. Hoyos//*J. Pineal Res.* – 2000. –Vol. 28. – P. 150-155.
452. Human aldehyde dehydrogenase isozymes and alcohol sensitivity. Isozymes/ D.P. Agarwal [et al.] // *Curr. Top. Biol. Med. Res.* – 1987. – Vol. 16. –P. 21 -48.
453. Huppertz B. The apoptosis cascade -morphological and immunohistochemical methods for its visualization/ B. Huppertz // *Anat. Embryol.* – 1999. – Vol.200. – P. 1-18.
454. Hypocholesterolemic effect of vitamin E on cholesterol-fed rabbit m/ C. Phonpanichrasamee [et al.]//*Int. J. Vit. Nutr.* – 1990. –Vol. 60. –P. 240-244.
455. Hypotensive effect of melatonin in essential hypertension /N. Birau [ et al.] // *IRSC Med. Sci.* – 1981. – Vol.9. – P.906.
456. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by FAS (CD95), Bax, caspases and anticancer drugs / I. Tamm [et al.] // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 5315-5320.

457. Imai T. Lipid peroxidation and antioxidant activities in regeneration liver after partial hepatectomy in splenectomized rats / T.Imai, K. Nishimaki, T. Shiga // Res. Exp.Med. (Bezl). – 1996. – Vol. 196, N 1. – P. 1-7.
458. Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells/ J.R. Calvo [ et al.] // J. Pineal.Res. – 1995. – VOL.18. – P.119-126.
459. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis/ P. Angulo [ et al.] //Hepatology. – 1999. – Vol.30.–P. 1356-1362.
460. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia/ J. Chen [et al.] //J. Neurosci.– 1998. – Vol. 18. – P. 4914-4928.
461. Induction of gadd45 (3 by NF-kB downregulates proapoptotic JNK signaling / Z. De Smaele [et al. // Nature. –2001. –Vol. 414.–P. 90-94.
462. Inhibition ofinterleukin IP converting enzyme family protease reduces ischemic and excitotoxic damage/ H. Hara [ et al.]//Proc. Natl. Acad. Sc. USA. – 1997. – Vol.94. – P. 2007-2012.
463. Interaction between alpha- and beta-adrenoceptors in rat pineal adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase activation. / D. P. Cardinali [et al.] // J. Neural Transm. – 1985. – Vol. 62, N 3-4. – P. 295-304.
464. Iron-induced oxidant stress leads to irreversible mitochondrial dysfunctions and fibrosis in the liver chronic iron-dosed gerbils. The effect of silybin / A. Masini [et al.]// J. Bioenerg. Biomembr. –2000. – Vol.32, N 2. – P.175-182.
465. Ishak K.G. Chronic hepatitis. Morphology and nomenclature/ K.G. Ishak //Modern Pathol. – 1994. – Vol. 7. – P. 690-713.
466. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes/ A. Lerner [et al.]// J. Amer. Chem. Soc. —1958. —Vol. 81. —P. 6084-6086.
467. John T.M. Melatonin replacement nullifies the effect of light-induced functional pinealectomy on nociceptive rhythm in the rat/ T.M. John [et al.] // Physiol-Behav. – 1994. – Vol.55, N 4. – P. 735-739



468. Kato Y. The hydrogen peroxide/copper ion system, but not other metal-catalyzed oxidation systems, produces protein-bound dityrosine / Y. Kato [et al.]// *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 31, N 5. – P. 624-32.
469. Kelly G.S. Insulin resistance: lifestyle and nutritional interventions/ G.S. Kelly // *Altern Med Rev.* – 2000. – Vol.5, N 2. – P. 109-132.
470. Kennaway D.J. Free-running rhythms of melatonin, Cortisol, electrolytes, and sleep in humans in Antarctica / D. J. Kennaway, C. F. Van Dorp // *Am. J. Physiol.* – 1991.– Vol. 260. – P. 1137-1144.
471. Khavinson V. Kh. Peptides and ageing/ V.Khavinson // *Neuroendocrinology. Letters.* – Stockholm, 2002. —144 p.
472. Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Gerontological aspects of genome peptide regulation/ V.Kh. Khavinson [et al.] // Basel (Switzerland): Karger AG, 2005. —104 p.
473. Kidd V.J. Proteolytic activities that mediate apoptosis/ V.J. Kidd // *Annu Rev. Physiol.* – 1998. – Vol. 60. – P. 533-573.
474. Kinscherf R. Effect of glutathione depletion and oral N-acetyl-cysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells / R. Kinscherf, T. Fischbach, S. Mihm // *FASEB J.* –1994. – Vol. 8. -P. 448-451.
475. Kireev R. Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis/ R. Kireev//*Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – V. 701. –P. 185-193.
476. Kluck R.M. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in *Xenopus* cell-free apoptosis system/ R.M. Kluck // *EMBOJ.* – 1997. – Vol.16. – P. 4639-4649.
477. Krause D.N. Regulatory sites in the melatonin system of mammals /D.N.Krause, M.L.Dubocovich // *Trends Neurosci.* – 1990. – Vol. 13. – P. 464-470.
478. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis/ G. Kroemer // *Nature medicine.* – 1997. – Vol. 3, N 6. – P. 614-620.
479. Kusiak J. Neurodegeneration in Alzheimer disease. Is apoptosis involved?/ J. Kusiak // *Mol. Chem. Neuropathol.* – 1996. – Vol. 28, N 1-3. – P. 153-162.

480. Lankin V., Tikhaze A., Kukharchuk V. Antioxidant decreases their tensification of low density lipoprotein free radical peroxidation during therapy with status/ V. Lankin, A. Tikhaze, V. Kukharchuk // *Mol. Cell. Biochem.* –2003. – Vol. 249. – P. 129-140.
481. Larrey D. Drug – induced liver disease / D. Larrey // *J. Hepatol.* – 2000. – Vol. 32. – P. 77–88.
482. Lee W.M. Drug-induced hepatotoxicity/ W.M. Lee // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – Vol. 349. – P.474.
483. Leon-Blanco M. M.Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro/ M.M. Leon- Blanco // *J. Pineal Res.* 2003. – Vol. 35. – N 3. – P. 204-211.
484. Levin G., Popov I. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences / G. Levin, I. Popov // *Med. Hypotheses.* –1994. – Vol.42, N. 4. – P.269-279.
485. Levine S.A. Biochemical pathology initiated by free radicals, oxidant chemicals and therapeutic drugs in the etiology of chemical hypersensitivity disease/ S.A. Levine // *J. Orthomol. Psychiatry.* – 1983. – Vol.12. – P. 166-183.
486. Levy R.H. On the Structure and Catalytic function of mammary glucose-6-phosphate dehydrogenase / R.H. Levy, R.R. Rainer, B.H. Nevaldine // *J. Biological Chem.* - 1966. – Vol. 241, N 10. – P. 2181-2187.
487. Liver failure and mitochondrial disease/ D. Pessayre [et al.]. – Postgraduate :Course. Dallas, 1999. – P. 147–157.
488. Liver lipid peroxidation and glutation-related defence enzyme systems in mice treated with paracetamol / G. Ozdemizler [et al.]// *J. Appl. Toxicol.* –1994. – Vol. 14, N. 4. – P.297-299.
489. Liu J. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. / J. Liu, H. Yeo, E. Overvik-Douki // *J. Appl. Physiol.* – 2000. – Vol.89. – P. 21–29.

490. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappa B/ D.Cai [et al.] //Nat. Med. – 2005. –N 11. –P. 183-190.
491. Lu S.C. S-Adenosylmethionine/ S.C. Lu //The International Journal of Biochemistry & Cell Biology – 2000. – Vol.32, N 4. – P. 391-395.
492. Lucey M. Is liver transplantation an appropriate treatment for alcoholic hepatitis?/ M. Lucev // Hepatology. – 2002. – Vol. 36. – P. 829-831.
493. Luo J.Z. Ginseng on hyperglycemia: effects and mechanisms / J.Z. Luo, L. Luo // eCAM. – 2009 – Vol.6, N .4. – P.423–427.
494. Maestroni G.J. Melatonin and the immune- hematopoietic system /G.J. Maestroni //Adv. Exp. Med. Biol. –1999. –Vol.460. –P. 395-405.
495. Maestroni G.J. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin/ G.J. Maestroni // J. Pineal Res. – 1995. – Vol.18. – P. 84.
496. Maharaj D.S.Melatonin: New Places in Therapy/ D.S. Maharaj // Biosci. Rep. – 2007. – Vol.27. – P. 299-320.
497. Male D.K. Advanced Immunology/ D.K. Male. –London: Mosbi, 1996 . –P. 385.
498. Malik R. The relationship between the thyroid gland and the liver / R. Malik, H. Hodgson // Quart. J. Med. — 2002. — Vol. 95, N 9. — P. 559-569.
499. Mammalian alcohol dehydrogenase – Functional and structural implications / J.O. Hoog [et al.]//J. Biomed Sci. – 2001. – Vol. 8. – P. 71–76.
500. Management of and risk factors related to hepatotoxicity during tuberculosis treatment [et al.]/ A. Babalik // Tuberk. Toraks. – 2012. – Vol. 60, N 2. – P. 136–144.
501. Manchini G. Futher studies on single radial immunodiffusion. Quantitative analysis of related and unrelated antigens /G.Manchini, D.K. Nash, J.F. Heremans// Immunochemistry. – 1970. – Vol. 7. – P.261–264.
502. Mannervik B. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects / B. Mannervik, J. Carlberg, K. Larson // Coenzymes and cofactors.– N.Y.: Wiley, 1989. – Vol. 3. –P. 693.

503. Maternaly administration of melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative mitochondrial damage in premature fetal rat brain/ K. Watanabe [ et al.] // J Pineal Res. – 2004. – N 37. – P. 276–280.
504. Matuszak Z. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigation / Z. Matuszak, K.Reszka, C.F. Chignell // Free Rad. Biol. Med. – 1997. – Vol.23, N 3. – P.367-372.
505. Maurizi C.P. Short note: The fetal origins hypothesis: linking pineal gland hypoplasia with coronary heart disease and stroke/ C.P. Maurizi // Med. Hypotheses. – 1998. – Vol.50. –P. 357-358.
506. Maytin M. Oxidant stress in the vasculature / M. Maytin, J. Leopold, J. Loscalzo // Curr. Atheroscler. Rep. – 1999. – Vol. 2, N 1. – P. 56-64.
507. Mazza A.D. Update on diabetes in the elderly and the application of current therapeutics. / A.D. Mazza, J.E. Morley //J. Am. Med. Dir. Assoc. – 2007. – Vol.8. – P.489–492.
508. Mechanisms of neuronal cell death/ R. Sadoni [et al.] //Adv. Neurol. – 1996. – Vol. 71. – P. 419-424.
509. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical/ D.Tan [ et al.] // J. Pineal Res. – 2003. – Vol. 34, N 4. – P. 249-259.
510. Mehmet H. Apoptosis — Caspases find a new place to hide/ H. Mehmet // Nature. – 2000. — N 403. — P. 29-30.
511. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotranformation / D.X. Tan [et al.] // Free Radical Biology Medicine. – 2000. – Vol.29, N11. – P.1177-1185.
512. Melatonin improve glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice/ C. Sartori [et al.] //Endocrinology. – 2009. –Vol. 150. – P. 5311—5317.

513. Melatonin improves mitochondrial respiratory chain activity and liver morphology in ob/ob mice / P. Solis-Munoz [et al.] // Journal of Pineal Reseach. – 2011. – Vol.51, N1. – P.59-65.
514. Melatonin in sleep disorders and jet-lag / D.P. Cardinali [et al.]//Neuroendocrinol Lett. – 2002. – Vol. 23. – P. 9-13.
515. Melatonin inhibition oxytocin response to insulin-induced hypoglycemia, but not induce angiotensin II in normal men /L.D. Chiodera [et al.] //J.Neural Transm. – 1998. – Vol.105, N 2-3. – P. 173-180.
516. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic/ G. Baydas [ et al.] // J Pineal Res. – 2007. – N 43. – P. 225–231.
517. Melatonin prolongs islet graft survival in diabetic NOD mice/ G.J. Lin [ et al.]// J. Pineal Res. – 2009. – Vol. 47. – P. 284—292.
518. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review / J.Cipolla-Neto // J. Pineal. Res. – 2014. – Vol. 56., № 4. – P. 371–381.
519. Melatonin receptors in pancreatic islets: good morning to a novel type 2 diabetes gene / H. Mulder [et al] // Diabetologia. – 2009. – Vol. 277. – P. 1240.
520. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression/ J.C. Mayo [ et al.] //Cell Mol. Life Sci. – 2002. – Vol. 59. – P. 1706–1713.
521. Melatonin stimulates glucagon secretion in vitro and in vivo/ I.Bahr [et al.]// J Pineal Res. – 2011. – Vol. 50. – P. 336—344.
522. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding / W.G. Deng [et al.]//Blood. – 2006. – Vol. 108. – P. 518–524.
523. Melatonin Suppression of colloid droplet formation in the thyroid is not related to the alteration of prostacyclin synthesis/ A. Lewinski [ et al.] // J. Pineal Res. – 1986 . – P. 285-289.

524. Melatonin versus vitamin E as protective treatment against oxidative stress after extra-hepatic bile duct ligation in rats/ P. Montilla [et al.]// J. Pineal Res. – 2001. – Vol.31, N2. – P.138-144.
525. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug/ R. Hardeland [et al.] //Nutr. Metab. – 2005. – Vol. 2. – P. 22.
526. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease / G. Paradies [et.al.] // Find Journal of Pineal Reseach. – 2010. – Vol.48, N4. – P. 297-310.
527. Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger /D. Tan [et al.] // Endocrine J. — 2007. — Vol. 1. — P. 57-60.
528. Melatonin's unique scavenging properties – roles of its functional substituents as related be a comparison with its structural analogues / B.Poeggeter [et al.] // J.Pineal.Res. – 2002. – Vol.33, N1. – P.20-30
529. Melatonin-insulin interactions in patients with metabolic syndrome/ R.Robevea [ et al.] //J. Pineal Res. – 2008. – Vol. 44. – P. 52—56.
530. Mendez-Sanchez N. Current concepts in patho-genesis of nonalcoholic fatty liver disease / N. Mendez-Sanchez, M. Arrese // Liver intern. – 2007. – Vol. 27, N 4. – P. 423-433.
531. Messingham K. A. Alcohol injury and cellular immunity/ K.A. Messingham [et al.] // Alcohol.– 2002. –N 28.– P. 137–149.
532. Metabolic control may influence the increased superoxide anion generation in diabetic serum / A. Ceriello [et al.] // Diabetic Med. – 1991. – Vol.8. – P.540-542.
533. Miranda M. Oxidative stress in a model of experimental diabetic retinopathy: the utility of peroxynitrite scavengers / M. Miranda, M. Muriach, J. Roma // Arch. Soc. Esp. Oftalmol. – 2006. – Vol.81 – P.27-32.
534. Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell/ H.M. Piper [et al.] //Cardiovasc. Res. – 1994. – Vol. 28. – P. 1-15.
535. Mitochondrial functions in ischemic myocardium. I. Proton electrochemical gradient, inner membrane permeability, calcium transport and oxidative

- phosphorylation in isolated mitochondria/ J. Toleikis [et al.] // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1979. – Vol.11. – P. 57-76.
536. Moser O.K. Is anxiety early after myocardial infarction associated with subsequent ischemic and arrhythmic events? /O.K.Moser, K.Dracup //Psychosom. Med. – 1996. – Vol.58. – P.395-401.
537. Muller J.E. Circadian variatic and triggers of onset of acute cardiovascular disease /J.E.Muller, G.H.Toiler, P.H.Stone //Circulation. – 1989. – Vol.79. – P.733-743.
538. Muller K. Gpl20 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine / K. Muller // Eur. J. Pharmacol. – 1992. – Vol. 226, N6. – P. 209-214.
539. Murakami K. Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress / K. Murakami, M. Yoshino //Biochem. Mol.Biol.Int. – 1997. – Vol. 41, N 3. –P. 481-486.
540. Mussig K. Genetic variations in MTNR1B affecting insulin secretion/ K. Mussig [et al.] //Ann Med. – 2010. – Vokl. 42.– P. 387—393.
541. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant / D.X. Tan [et al] // FASEB J. - 2001. – Vol.15, N 12. – P.2294-2296.
542. N-Acetylserotonin and 6-Hydroxymelatonin against Oxidative Stress: Implications for the Overall Protection Exerted by Melatonin/ R. Alvarez- Diduk [et al.] //J. Phys. Chem. B. – 2015. – Vol.119. – P. 8535–8543.
543. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease/ H. Kono [ et al.] //J. Clin. Invest. – 2000. – Vol.106. – P. 867.
544. Nash P.B., Toxoplasma gondii-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis/ P.B. Nash [et al.]// J. Immunol. – 1998. –Vol.160, N 4. – P. 1824-1830.
545. Natelson S. Response of citric acid levels to oral administration of glucose/ S. Natelson // J. Clin. Invest. – 1948. – Vol.27, N4. – P. 446-449.
546. Neurobiologie der Haut: Apoptose/ R.Paus [ et al.] // Hautarzt. – 1995. – Vol.46, N 3. – P. 285-303.

547. Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia/ F.Y. Sun [ et al.] //J. Pineal Res. – 2002. – Vol.33. – P. 48–56.
548. Nogueira T.C. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response/ T.C. Nogueira // Endocrinology. – 2011. – Vol.152, N 4. – P.1253-1263.
549. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity/ C.A. Matteoni [et al.]//Gastroenterology. – 1999. – Vol.116. – P. 1413-1419.
550. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity/ B.R.Bacon [ et al.]//Gastroenterology. – 1994. –Vol. 107. –P. 1103–1109.
551. Noninvasive markers of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: validating the European Liver Fibrosis Panel and exploring simple markers / I.N. Guha [ et al.]// Hepatology. – 2008. – Vol. 47 , N 2. – P. 455–460.
552. Ohbayashi H. Twelve-month chronic administration of polyenephatidylcholine (EPL) for improving hepatic function of fatty liver patients/ H. Ohbayashi // Progr.Med. – 2004 – Vol.24. – P.1117-1122.
553. Okatani Y. Role of melatonin in nocturnal prolactin secretion in women with normoprolactinemia and mild hyperprolactinemia / Y. Okatani, Y. Sagara//Am. J. Obstet-Gynecol. – 1993. – Vol. 168. –P. 854-861.
554. Oppenheim R.W. Cell death during development of the nervous system/ R.W. Oppenheim //Annu. Rev. Neurosci. – 1991. – Vol.14. – P. 453-501.
555. O'Shea R.S. Alcoholic liver disease/ R.S. O Shea // Hepatology. – 2010. – Vol. 51. – P. 307-328.
556. Oxidants in chronic kidney disease / S.V. Shah [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. – 2007. – Vol.18. – P. 16–28.
557. Oxidative stress and antioxidant defense in alcoholic liver disease and chronic hepatitis C/ A.Par [et al.]// Orv. Hetil. – 2000. – Vol.141, N 30. – P. 1655–1659.



558. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans [et al.]. // *Endocrine Reviews* – 2009. – Vol.23, N 5 – P.599–622.
559. Oxidative stress as an early prognostic factor in acute pancreatitis: its correlation with serum phospholipase A2 and plasma polymorphonuclear elastase in different-severity forms of human AP/ A. Wereszczynska- Siemiatkowska [ et al.] // *Pancreas*. – 1998. – V. 17, N 2. – P. 163-168.
560. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy / A.M. Vincent [et al.]. // *Endocrine Reviews*. – 2010. – Vol.25, N.4. – P.612–628.
561. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C/ F. Matrinez- Cruz [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2002. – Vol. 69. – P. 550–558.
562. P53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer/ S.E. Morgan [et al.]// *Adv. Cancer Res.* – 1997. – Vol.71. – P. 1-25.
563. Paakkonen T. Seasonal levels of melatonin, thyroid hormones, mood, and cognition near the Arctic Circle/ T. Paakkonen // *Aviat. Space Environ. Med.* –2008. – Vol.79, N 7. – P.695-699.
564. Padayatty, S. J. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention / S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang // *Journal of the American College of Nutrition.*– 2003. – Vol. 22. – P. 18-35.
565. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cells/ E. peschke[ et al.] // *J. Pineal Res.* – 2006. – Vol. 40. – P. 184—191.
566. Pashkov A.N. Glutathione system and activity of NADPH-generating enzymes in the liver of intact rats and animals with toxic hepatitis receiving melatonin /A.N. Pashkov, S.S. Popov, A.V. Semenikhina // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2005. – N 5. – P. 565-568.
567. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes/ E. Peschke // *J. Pineal Res.* – 2008. – Vol. 44. – P. 26-40.

568. Pessayre D, Mansouri AM, Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis/ D. Pessayre [et al.] //Am. J. Physiol. – 2002. – Vol.282. – P.193-199.
569. Pharmacokinetics of acetaminophen-protein adducts in adults with acetaminophen overdose and acute liver failure/ L. James [et al.] //Drug Metab Dispos. – 2009. – Vol. 37. – P. 1779-1784.
570. Photophysical studies on melatonin and its receptor agonists / J.E. Roberts [et al.] // J. Pineal. Res. – 2000. – Vol.29, N 2. – P.94-99.
571. Physiological and metabolic functions of melatonin/ J. Barrenetxe [ et al.] //J Physiol Biochem. – 2004. – Vol.60. – P. 61–72.
572. Pim-1 kinase promotes inactivation of the proapoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site/ T.L. Aho [et al.]// FEBS Lett. – 2004. – Vol. 571. – P. 43–49.
573. Pineal hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily / M. Becker-Andre [et al.] // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 28531—28534.
574. Poitout V. Minireview: secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity/ V. Poitout, R.P. Robertson //Endocrinology. – 2002. —Vol. 143. –P. 339–342.
575. Pons Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery / P. Tauler [ et al.]// Pflügers Archiv. – 1995. – Vol. 438, N 6. – P. 782-787.
576. Popov S.S. Oxidative status and citrate concentration in rat tissues during experimental hyperthyroidism and melatonin treatment/ S.S. Popov, A.N. Pashkov, V.I. Zoloedov // Bull. of Exper. Biol. and Med. – 2007. – Vol. 144, N 2. – P. 203-206.
577. Popov S.S.The effect of melatonin on free radical homeostasis in rat tissues at thyrotoxicosis / S.S. Popov, A.N. Pashkov, V.I. Zoloedov // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. – 2008. – Vol. 2, № 3. – P. 302-305.

578. Popova T. N. Regulation of mitochondrial NADP-isocitrate dehydrogenase in rat heart during ischemia / T. N. Popova // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2007. – Vol.294. – P. 97-105.
579. Popova T.N. Citrate and isocitrate in plant metabolism / T.N. Popova, M.A.A. Pinheiro de Carvalho // *Biochim. et Biophys. Acta*. –1998. – Vol.1364. –P.307-325.
580. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury/ C.B. Cairns [ et al.] // *Circulation*. – 1997. – Vol.96. – P. 260-265.
581. Potter J.J. Regulation of rat alcohol dehydrogenase by cyclic AMP in primary hepatocyte culture / J.J. Potter, O.A.Mac Dougal, E.Mezey // *Arch. Biochem. Biophys*. – 1995. – Vol.321, N 2. – P.329-335.
582. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants / G. Paolisso [et al.] // *Diabetes Metab*. – 1999. – Vol. 25. – P. 298-306.
583. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen/ M.D. Jacobson [et al.] // *Nature*. – 1995. – Vol.374. – P. 814-816.
584. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. / M. Cam [et al.] // *J Pineal Res*. – 2003. – Vol. 35. – P. 212–220.
585. Protective effect of essential phospholipids on liver injury due to total parenteral nutrition/ J.Lata [et al.] // *Vnitr. Lek*. – 2001. – Vol.47. – P. 599-603.
586. Protective effect of melatonin on myocardial infarction/ C. Zhongyi [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. – 2003. – Vol.284. – P. 1618-1624.
587. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases/ A.W. Siu [et al.] // *J. Pineal Res*. – 2006. – Vol. 40. – P. 101-109.
588. Pyrazimide – induced granulomatous hepatitis/ B.Knobel [et al.] // *J Clin Gastroenterol*. – 1997. – Vol. 124,N 4. – P. 264–266.
589. Raff M. Cell suicide for beginners/ M.Raff // *Nature*. – 1998. – Vol. 396. – p. 119-122.

590. Raikhiin N.T. Melatonin: general biol. and oncoradiol. aspecte. / N.T. Raikhiin, M.N. Kvetnoy, S.A. Blinova // *Obnillsk.* – 1994. – P. 9-16
591. Ramakrishnan G. Silymarin downregulates COX-2 expression and attenuates hyperlipidemia during NDEA-induced rat hepatocellular carcinoma/ G. Ramakrishnan // *Mol. Cell Biochem.* – 2008. – Vol.313. – P. 53-61.
592. Rebeccamycin derivatives as dual DNA damaging agents and potent checkpoint kinase 1 inhibitors/ C. Marminon [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 74. – P. 1620–1629
593. Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery / P. Tauler [et al.] // *Pflügers Archiv.* – 1995. – Vol. 438, № 6. – pp. 782-787.
594. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart and disease/ G.D. Lopaschuk [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta* 1994. – Vol. 12, N 13. – P. 263-276.
595. Reinehr T. Relationship between MTNR1B (melatonin receptor 1B gene) polymorphism rs 10830963 and glucose levels in overweight children and adolescents/ T. Reinehr // *Pediat. Diabet.* – 2011. – Vol. 10. – P. 1399—1444.
596. Reiter R.J. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals. A brief review / R.J. Reiter // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1993. – Vol. 6. – P. 1141-1155.
597. Reiter R. J. Melatonin: mechanism and action as an antioxidant/ R.J. Reiter [et al.] // *Curr. Topics Biophys.* – 2000. – Vol. 24. – P. 171-183.
598. Reiter R.J. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence / R.J. Reiter, D.X. Tan, L.C. Manchester// *Cell Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 34. – P. 237-256.
599. Reiter R.J. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart / R.J. Reiter, D.-X. Tan // *Cardiovascular Research.* – 2003. – Vol. 58, N 1. P. 10-19.

600. Reiter R.J. Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue-damage induced by free-radicals /R.J. Reiter // Eur. J. Endocr. — 2005. — Vol. 134. — P. 412-420.
601. Relationship between aminotransferase levels and histopathological findings in patients with nonalcoholical steatohepatitis/ A.Sonsuz [et al.] //Am J Gastroenterol. — 2000. — Vol.95. — P. 1370-1371.
602. Rescue of Cells from Apoptosis by Inhibition of Active GSH Extrusion/ L. Ghibelli [et al.] // FASEB J. — 1998. — Vol.12. — P. 479-486.
603. Review article: The use of potentially hepatotoxic drugs in patients with liver disease/ J.H.Lewis [et al.]//Aliment Pharmacol Ther. — 2008. — Vol. 28. — P. 1021-1041.
604. Reyes-Toso C.F. In vitro effect of melatonin on oxygen consumption in liver mitochondria of rats/ C.F. Reyes- Toso // Neuroendocrinol Lett. — 2003. — Vol. 24. — P. 341-344.
605. Roberts E.A. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): A "growing" problem? / E.A. Roberts //J. Hepatology. — 2007. — Vol. 46, N 6. — P. 1133-1142.
606. Role of granulocytes in endothelial injury in coronary heart disease in humans/ G. Riccivuti [et al.] //Atherosclerosis. — 1991. — Vol. 91. — P.1-14.
607. Role of oxidative stress in alcohol-nduced liver injury/ A.I. Cedebraum [et al.] //Archives of Toxicology. — 2009. — Vol.83. — P. 519-548.
608. Rosen P. Antioxidants in diabetes managen / P. Rosen, Du. Xuellang, Sui. Guang-Zhi . —New York, 2000. — P. 17-32.
609. S-Adenosyl-L-methionine and mitochondrial re-duced glutathione depletion in alcoholic liver disease/ J.C. Fernandez-Checa [et al.]//Alcohol. — 2002. — Vol.27. — P. 179-183.
610. Sanyal A.J. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance with mitochondrial abnormalities/ A.J. Sanyal //Gastroenterology. — 2001. — Vol.120.— P. 1183-1192.
611. Scalbert E. Melatonin and regulation of the cardiovascular system /E.Scalbert, B.Guardiola-Lemaitre, P.Delagrange //Therapie. — 1998. — Vol.53. —P. 459-465.

612. Scavenging of reaction oxygen species by silibinin dihemisuccinate/ L.Mira [ et al.]// Biochem. Pharmacol. – 1994. – Vol.48. – P.753-758.
613. Scavenging of reactive oxygen species be melatonin / L.Y.Zang [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 1998. – Vol.1425, N 3. – P.469-477.
614. Seasonal variation in thyroid size in healthy males/ L. Hegediis [ et al. ]// Horm. Metab. Res. – 1987. – Vo.19, N 8. P.391-392.
615. Sequential activation of ICE–like and CPP32–like proteases during Fas–mediated apoptosis/ M. Enari [et al.] //Nature. – 1996. –Vol.380. – P. 723–726.
616. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system/ E. Sewerynek //Neuroendocrinology Letters – 2002. – Vol.23. – P. 79-83.
617. Shelly C. Lu. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies / C. Lu. Shelly // FASEB J. – 1999. – N 13. – P. 1169-1183.
618. Silymarin effects on intracellular calcuim and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury / H. Farghali [et al.] // Pharmacol Res. – 2000. – Vol. 41, N 2. – P.231-237.
619. Skulachev V.P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen nad its one-electrone reductants / V.P. Skulachev // Quant. Rev. Biophys. – 1996. – Vol.29. – P. 169-203.
620. Skulachev V.P. Membrane-linked systems preventing superoxide formation / V.P. Skulachev // Biosci. Rep. – 1997. – Vol. 17, N 3. – P. 347-366
621. Skulachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concept of programmed death of organelles, cells and organisms./V.P. Skulachev //Mol. Aspects of Medicine. – 1999. – Vol.20. –P. 139-184.
622. Skulachev V.P. Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "It is better to die than to be wrong"/ V.P. Skulachev //IUBMB Life. – 2000. – Vol.49. – P. 365-372.
623. Skwarlo-Sonta K. Melatonin in immunity: comparative aspects /K. Skwarlo-Sonta// Neuroendocrinol. Lett. –2002. –Vol.23, N 1. – P.61-66.

624. Sliwinski T. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair/ T. Sliwinski [et al.] // *Mutat Res.* – 2007. – Vol. 634. – P. 220–227.
625. Smyth G.E. Inactivation of pig heart NADP-specific isocitrate dehydrogenase by two affinity reagents is due reaction with acysteine not essential for function / G.E. Smyth, R.F. Colman // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1992. – Vol. 293, N 2. – P. 356-361.
626. SOD, CAT, GSH-PX and GSH-RED in soluble fraction and in mitochondria of pigment frog liver at various stages of maturation / E. Ceremia [et al.] // *Ital. J. Biochem.* – 1989. – Vol. 38, N 1. – P. 50.
627. Solani G. Biochemical disfunction in heart mitochondria exposed to ischemia and reperfusion/ G. Solani, D.A. Harris // *Biochem.J.* – 2005. – Vol. 390. – P. 377-394.
628. Specific binding of 2-[125I]iodmelatonin by rat splenocytes: characterization and its role of regulation of cyclic AMP production / M. Raffi- El Indrissi [ et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 1995. – Vol.57. – P.171-178.
629. Specific binding of 2-[125I]melatonin by partially purified membranes of rat thymus / M.A. Lopez- Gonzalez [et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 1993. – Vol. 45, N 1-2. – P. 121-126.
630. Srinivasan V. Melatonin, immune function and aging. / V. Srinivasan, G.J.M. Maestroni, D.P. Cardinali // *Immunity & Ageing.* – 2005. – Vol. 2. – P.17.
631. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide/ H. Steller // *Science.* – 1995. – Vol. 267. – P. 1445–1456.
632. Stumpf I. Modulation of the cGMP signaling pathway by melatonin in pancreatic beta-cells / I. Stumpf, I. Bazwinsky, E. Peschke // *Endocrinology.* – 2010. – N 6. – P.44
633. Sun H.D. et al. Proteomic analysis of glutathione S-transferase isoforms in mouse liver mitochondria/ H.D. Sun [et al.] // *World J.Gastroenterol.* – 2012. – N 18. – P.3435-3442.

634. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation / D.C. Salo [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol.265, N 20. – P.11919-11927.
635. Susin S. A. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor / S.A. Susin // *Nature*, 1999. – Vol.397. – P. 441-446.
636. Suzuki Y.J. Free Radical / T.J. Suzuki, H.J. Forman, A. Sevanian // *Biol. Med.* – 1996. – Vol. 22, N 1/2. – P.269-285.
637. Takenaka Y. The effect of  $\alpha$ -tocoferol as an antioxidant on the oxidation of membrane protein hiols induced by free radicfls generated in different sites / Y. Takenaka, M. Miki, H. Yasuda // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1991. – Vol. 285, N 2. – P. 344 – 350.
638. The antioxidant functions ofcytochrome c/ S.S. Korshunov [et al.] // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 462. –P. 192-198.
639. The Brisbane 2000 terminology of the liver anatomy and resection / Belgihiti J. [et al.]//*HPB.* – 2000. – Vol.2. – P.333-339.
640. The chemistry of melatonin’s interaction with reactive species/ M. Allegra[ et al.] // *J. Pineal Res.* – 2003. – Vol. 34. – P.1—10.
641. The effect of exogenous lipids on the functional activity of the liver in experimental hepatitis/ A.I. Bozhkov [et al.] // *Voprosy meditsinskoi khimii*, 1993, vol: 39(1), 41-43.
642. The effects of some substances-protectors on free-radical homeostasis in diseases associated with oxidative stress. In *Handbook of Free Radicals: Formation/ M.A.A. De Carvalho [et al.] Types and Effects.* – 2010. – P. 291-303.
643. The evolution and population genetics of the ALDH2 locus: random genetic drift, selection, and low levels of recombination/ E. Mezey [et al.] // *Ann. Hum. Genet.* – 2004. –Vol. 68. – P. 93-109.
644. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection/H.M. Piper [ et al.] // *Cardiovasc. Res.* 2004. – Vol.61. – P. 365-371.



645. The human myometrium as a target for melatonin/ N. Schlabritz- Loutsevitch [et al.] //J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 882. – P. 908-913.
646. The key role butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5`butyrylcholinesterase –DNA study/ A. Mack [et al.] // Progr. Neurobiol. – 2000. – Vol. 60, N 6. – P. 607-628.
647. The p53 network / M.I. Agarwal [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273. – P. 1-4.
648. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis/ R.M. Kluck [et al.]//Science. – 1997. – Vol.275. – P. 1132-1136.
649. The study of melatonin protective activity on pancreatic beta-cells under the condition of alloxan-induced diabetes during aging/ D. Kasradze [ et al.] //Georgian Med News. – 2010. – Vol. 189. – P. 56—63.
650. The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey / K. Tahaoglu [et al.]// N. Engl. J. Med. 2001. - Vol. 19. -№3. -P.208-210
651. The use of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of cholestatic disorders. A meta-analysis of clinical trials/ M. Frezza [et al.] // Drug Invest – 1992. – Vol.4. – P.101-108.
652. Thombeny N.A. Caspases: enemies within/ N.A. Thombeny, Y. Lazebnik // Science. – 1998. – Vol.281. – P. 1312-1316.
653. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease/ C.B. Thompson //Science. – 1995. – Vol.267. – P. 1456-1462.
654. Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis/ A. Kashiwagi [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 1999. –Vol.26. – P. 1001-1009.
655. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology / S. Toyokuni //Pathol. Int. – 1999. – Vol. 49, N 2 – P. 91-102.

656. Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury / P. Riess [et al.] // *Neurosurgery*. — 2002. — Vol. 51, N 4. — P. 1043-1052.
657. Tsai K. Oxidative stress in acute pancreatitis / K.Tsai, S.S. Wang, T.S. Chen // *Gut*. — 1998. — Vol. 42. — P. 850-855.
658. Two susceptible diabetogenic variants near/in MTNR1B are associated with fasting plasma glucose in a Han Chinese cohort/ M. Y. Kan [ et al.] // *Diabet. Med.* — 2010. — Vol. 27. — P. 598-602.
659. Ursodeoxycholic acid in the treatment of alcoholic liver disease/J.N. Plevris [ et al.] // *Gastroenterol & Hepatol.* — 1991. — Vol. 3. — P. 6536–6541.
660. Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels/ I.Prokopenko [et al.] // *Nat. Genet.* — 2009. — Vol. 41. — P.77-81.
661. Vasquez-Vivar J. Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical. An electron spin resonance investigation / J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, M.C. Kennedy // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P.14064-14069.
662. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology/ D.W. Crabb [et al.] // *Proc. Nutr. Soc.* — 2004. — Vol.63, N 1. — P. 49–63.
663. Villafranca J.J. The mechanism of aconitase action 2. Magnetic resonance studies of the complexes of enzyme, magnesium (2), iron (2), and substrates / J.J. Villafranca, A.S. Mildvan// *J. Biol. Chem.*— 1971. — Vol.246, N 18.— P.5791-5798.
664. Vrij-Standhardt W. G. Effects of alcohol on the metabolism of macronutrients/ W.G. Vrij- Standhardt // *Biomed. and Soc. Aspects of Alcohol Use: A Review of Literature.* — 1991. —P. 62-71.
665. Walden W.E. From bacteria to mitochondria: aconitase yields surprises/ W.E. Walden // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2002. — Vol.99. —P. 4138–4140.
666. Watkins P.B. Role of cytochrome P450 in drug metabolism and hepato-toxicity/ P.B. Watkins // *Semin Liver Dis* — 1990. — Vol. 10. — P.235-250.

667. Weekley L.B. Effects of melatonin on isolated pulmonary artery and vein: role of vascular endothelium/ L.B. Weekley // *Pulm. Pharmacol.* – 1993. – Vol.6. – P.149–154.
668. Wiederkehr A. Minireview: Implication of mitochondria in insulin secretion and action / A. Wiederkehr, C.B. Wollheim // *Endocrinology* – 2009. – Vol.147, N 6. – P.2643–2649.
669. Yakovlev A.G. Activation of ccp32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury/ A.G. Yakovlev, S.M. Knoblach, L. Fan // *J. Neurosci.* – 1997. – Vol.17. – P. 7415-7424.
670. Zamocky M., Furtmüller P.G., Obinger C.. Evolution of catalases from bacteria to humans. // *Antioxid Redox Signal.* – 2008. – V.10. – p.1527-1548.
671. Zamora R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases/ R. Zamora, V. Vodovotz, T.R. Billiar // *Molec. Med.* – 2000. – Vol. 6, N 5. – P. 347-373.
672. Zheng L. Binding of Cytosolic Aconitase to the Iron Responsive Element of Porcine Mitochondrial Aconitase mRNA / L. Zheng, M.C. Kennedy, G.A. Blondin // *Arch. Biochem. Biophys.* –1992. – Vol.299. – P.356-360.