АВТОРЕФЕРАТ

ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

ДОКТОРА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОНОИДОВ

(фармакодинамика и перспективы клинического изучения)

14.03.06 - ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

На правах рукописи

ДОРКИНА ЕЛЕНА ГРИГОРЬЕВНА

Волгоград 2010

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Пятигорская государственная фармацевтическая академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" и в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Волгоградский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию"

Научный консультант: доктор медицинских наук,

профессор Тюренков Иван Николаевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор Дудченко Галина Петровна

2. Доктор биологических наук, профессор Гарибова Таисия Левоновна

3. Доктор медицинских наук, Макляков Юрий Степанович

Ведущая организация:

ГОУ ВПО "Саратовский государственный медицинский университет Росздрава"

Защита состоится "\_\_"\_\_\_\_\_\_\_\_\_2010 г. в\_\_\_\_ч. на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 ГОУ ВПО "Волгоградский государственный медицинский университет Росздрава" (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов,1)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО "Волгоградский государственный медицинский университет Росздрава"

Автореферат разослан " " 2010 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

профессор А.Р. Бабаева

## Актуальность проблемы

Поражения печени различной этиологии являются достаточно широко распространенной патологией [Дробинский А. и соавт., 2002; Ильченко Л.Ю. и соавт., 2002, Полонский В.М., 2005]. По данным ВОЗ в мире - 2 млрд человек с патологией печени, что в 100 раз превышает распространенность ВИЧ-инфекции [Дроговоз С.М., 2009]. Среди широкого круга препаратов, используемых в комплексной терапии заболеваний печени, выделяют сравнительно небольшую группу "истинных" гепатопротекторов, эффективность которых не всегда оказывается достаточной.

В патогенезе поражений печени (токсической, алкогольной и другой этиологии) большое значение отводится окислительному стрессу [Буеверов А.О., 2002, Скворцов В.В., 2003, Ипатова О.М., 2005, Оковитый С.В., 2007, Fernandes-Checa J. C., 2003, Lieber C. S., 2004, Dey A., Cederbaum A.I., 2006]. При оксидативном стрессе, в первую очередь, наблюдается сдвиг про-антиоксидантного равновесия в сторону усиления прооксидантной составляющей, снижение резервов мобилизации антиоксидантной защиты, что сопряжено с нарушением энергообеспечения клетки, детоксикационных механизмов, активацией апоптоза, провоспалительных цитокинов и др. [Дубинина Е.Е., 1998, Болдырев А.А., 2001, Шаповал Г.С. и др., 2003, Сазонтова Т.Г. и др., 2007, Ланкин В.З. и др., 2009, Han D. Et all., 2006]. Окислительный стресс инициирует нарушения, связанные с кровоснабжением печени (повреждение эндотелия сосудов и синусоидов печени с изменением выработки оксида азота, ухудшение реологических свойств крови, состояния микроциркуляторного русла и пр), что усугубляет течение патологического процесса [Марков Х.М., 2005, Lukivskaya O. et al., 2004, Pầrvu A. E. et al., 2005, Babệl P. et al., 2006].

Многофакторность патогенеза поражений печени требует, чтобы и защита осуществлялась на различных уровнях и структурах, что определяет перспективность поиска новых гепатопротекторов среди флавоноидов, для которых выявлено более 40 видов фармакологической активности [Robak J. et al., 1996]. Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению гепатозащитных свойств флавоноидов, сравнительного изучения эффективности их действия не проводилось. Не выяснены до конца и механизмы их гепатопротекторной активности. Большинство исследователей считают, что основой такового является антиоксидантное действие [Чучалин В.С., 2003, Куркин В.А., 2003, Саратиков А.С. и др., 2005, Middleton E. JR. et al., 1996, 2000, Roback I. et al., 1996, Narayana et al., 2001, Nijveldt R.I. et al., 2001, Havsteen B. H., 2002]. В последние годы все большее внимание уделяется исследованию состояния эндогенных систем антиоксидантной защиты [Puiggros F. et al., 2005, Moskaug et al., 2005, Кравченко Л.В. и др., 2005, Frei B., 2003].

Поэтому сегодня актуальным является не только поиск новых эффективных и безопасных гепатозащитных препаратов, но и сравнительное изучение особенностей и интимных механизмов действия уже известных гепатопротекторов.

Исходя из этого, следует считать важным, как с научной, так и с практической точки зрения, комплексное, сравнительное изучение гепатопротекторного действия флавоноидов, их влияние на про-антиоксидантный баланс, системы антиоксидантной защиты, детоксикации и энергообеспечения, эндотелиальную дисфункцию, продукцию оксида азота и печеночный кровоток, что и явилось предметом настоящей работы.

## Цель и задачи работы

На основании комплексной и сравнительной оценки влияния флавоноидов на основные метаболические и гемодинамические патогенетические процессы при токсических поражениях печени экспериментально обосновать создание новых эффективных отечественных гепатопротекторов.

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

провести изучение в сравнительном аспекте влияния лечебно-профилактического действия гесперидина, диосмина, флавицина, кверцетина, карсила и сухого экстракта (СЭ) из горошка обрубленного (Vicia abbreviate Fish. ex Spreng. (Vicia truncatula Fish. ex. Bieb), содержащего флавицин, на развитие синдромов цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления и гепатодепрессии, гистологическую картину печени, интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), состояние систем антиоксидантной защиты (АОЗ), энергообеспечения и детоксикации при экспериментальном остром поражении печени СС14 и этанолом;

провести сравнительное изучение антиоксидантного действия исследуемых флавоноидов in vitro и их влияния на интенсивность ПОЛ, состояние систем АОЗ, энергообеспечения и детоксикации in vivo при их курсовом введении в условиях нормы;

провести сравнительное изучение влияния флавоноидов на содержание NO у интактных животных и при его избыточной продукции, индуцированной СС14, методом ЭПР;

изучить в сравнительном аспекте влияние флавоноидов на органный кровоток и функцию эндотелия в условиях нормы и моделирования эндотелиальной дисфункции;

провести комплексное изучение энергетического обмена, интенсивности ПОЛ и состояния АОЗ, а также изменения печеночных показателей и гистоморфологической картины данного органа в ходе хронической алкоголизации и при лечебном применении наиболее активного гепатопротектора в сравнении с карсилом;

изучить влияние наиболее активного гепатопротектора на развитие фиброза при хроническом поражении печени СС14, желчеобразовательную функцию печени в норме и при экспериментальном гепатите и отдаленные результаты его лечения.

## Научная новизна полученных результатов

Впервые проведено сравнительное, комплексное изучение механизмов гепатопротекторного действия индивидуальных флавоноидов, флавицина и СЭ из травы горошка обрубленного, их влияние на процессы ПОЛ, системы АОЗ, детоксикации и энергообмена в условиях нормы и патологии печени. Впервые установлена гепатозащитная активность флавицина, выделенного из оригинального растительного сырья (надземная часть V. abbreviata), при токсических поражениях печени СС14 и этанолом. Впервые показано существование тесной корреляционной взаимосвязи между выраженностью гепатозащитного действия и степенью восстановления про-антиоксидантного равновесия за счет не только прямого антиоксидантного действия флавоноидов, но и повышения активности эндогенной системы АОЗ в печени.

Впервые выявлено, что курсовое введение исследуемых флавоноидов оказывает стимулирующее влияние на активность NADP+-редуктазных ферментов, принимающих участие в регенерации восстановленного глутатиона, а применение диосмина, флавицина и кверцетина повышает содержание GSH, участвующего в механизмах повышения неспецифической резистентности организма к экстремальным факторам среды.

Впервые показано, что введение гесперидина и флавицина увеличивает печеночный кровоток в условиях нормы. Впервые проведено сравнительное изучение корригирующего влияния флавоноидов на органный кровоток в условиях эндотелиальной дисфункции, очевидно связанное с активацией eNOS и повышением продукции NO.

Методом ЭПР показано повышение под влиянием флавоноидов содержания NO в норме, и его снижение в условиях индукции окислительного стресса введением СС14, что свидетельствует об их модулирующем влиянии на продукцию NO.

Впервые установлено, что СЭ из Vicia abbreviata, содержащий 5,12 - 5,67% флавицина, обладает более эффективным гепатопротекторным действием, чем препарат сравнения карсил, и изучен механизм действия СЭ при профилактическом и лечебном применении, который связан с преодолением окислительного стресса за счет поддержания функционирования эндогенной системы АОЗ, нормализации энергопродукции и процессов детоксикации, торможением процесса фиброгенеза при хронической патологии, восстановлением желчеобразовательной функции печени.

Впервые показано, что в ходе хронической алкоголизации происходит усиление адаптационно-защитных механизмов в виде повышения активности ферментов NADPH-GSH-зависимой системы, что значительно более выражено при лечебном применении СЭ из Vicia abbreviate.

## Практическая значимость

На основании полученных результатов выявлено в разной степени выраженное влияние флавоноидов на патологические синдромы, патогенетические механизмы поражения гепатоцитов: ПОЛ, систему АОЗ, детоксикации и энергообразования, кровоснабжение печени, эндотелиальную дисфункцию. Такие данные позволяют разработать рекомендации по дифференцированному применению флавоноидов, как гепатопротекторов, при определенном характере течения заболевания печени. Сумма, содержащая арабиноглюкозид - и ксилоглюкозид диосметина, которая условно названа флавицином, может быть рекомендована для дальнейшей разработки в качестве лекарственного средства для лечения поражений печени. СЭ из V. abbreviata, оказывающий выраженное гепатозащитное действие при острых и хронических токсических поражениях печени, превосходящее карсил, а также препятствующий развитию фиброза и стимулирующий секрецию желчи, может быть использован для создания лекарственного препарата.

## Практические рекомендации

Учитывая селективную токсичность ряда лекарств по отношению к эндотелиальным клеткам синусоидов печени и наиболее выраженное положительное действие гесперидина на эндотелиальную функцию и печеночный кровоток, данное соединение может быть рекомендовано для коррекции сосудистых поражений печени. Более эффективное нормализующее влияние диосмина на холестаз может быть основанием для его рекомендации при заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением желчеобразования. Кверцетин может быть рекомендован при поражениях печени, сопровождающихся выраженным цитолизом и мезенхимальным воспалением. Флавицин и СЭ, являющиеся высокоэффективными гепатопротекторами при поражениях печени СС14 и алкоголем, могут быть рекомендованы для разработки на их основе лекарственных средств для лечения и профилактики заболеваний печени при острых и хронических отравлениях гепатотоксическими ядами.

## Уровень внедрения результатов исследования

По данным, полученным автором, подготовлены информационные письма, материалы которых включены в планы НИР кафедр технологии лекарств (акт внедрения от 03.09.2007 г), органической химии (акты внедрения от 07.09.2007г. и от 04.11.2009), фармакогнозии (акт внедрения от 03.11 2009), фармакологии (акт внедрения от 29.08.2007 г) и ботаники (акт внедрения от 10.11.2009) Пятигорской ГФА Росздрава. Материалы, полученные автором, используются в санаторно-курортной практике (санаторий им.М.Ю. Лермонтова, г. Пятигорск, акт внедрения от 20.08.2007). Результаты работы включены в лекционный материал для студентов лечебного, педиатрического, фармацевтического, слушателей факультета усовершенствования врачей и провизоров на кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ ВолГМУ, Курского государственного медицинского университета, Ставропольской государственной медицинской академии, Саратовского государственного медицинского университета. Данные по изучению механизма действия и гепатозащитной активности сухого экстракта из горошка обрубленного вошли в комплект документов, переданных в ООО "Эвалар" для представления в ФК МЗ и СР на получение разрешения к проведению клинических испытаний.

## Связь с планом НИР ГОУ ВПО "Пятигорская ГФА Росздрава"

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ГОУ ВПО "Пятигорская ГФА Росздрава" по проблеме "Изучение биохимических основ защитного действия флавоноидов при экспериментальном поражении печени" (номер государственной регистрации 01.200.11.7645), а также в соответствии с планом научно-исследовательских работ Волгоградского Государственного медицинского университета и соответствует проблеме, номер государственной регистрации 01 200 800 804.

## Апробация полученных результатов

Основные положения диссертационной работы изложены на 55-й - 63-ей научных конференциях "Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции" (Пятигорск, 2000-2008 гг.), на десятой Российской конференции "Гепатология сегодня" (Москва, 2005 г), на международной конференции "Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека" (Смоленск, 2005 г), на IV конференции гастроэнтерологов Южного Федерального округа (Кисловодск, 2005г), на международной научной конференции "Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем" (Минск, 2006 г), на IX Украинском биохимическом съезде (Харьков, 2006 г).

## Положения, выносимые на защиту

1. При острых поражениях печени СС14 и этанолом более выраженной гепатозащитной активностью в сравнении с индивидуальными флавоноидами и карсилом, обладает СЭ из V. abbreviate (truncatula), который практически полностью устраняет развитие синдромов цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления и печеночной недостаточности, белковую и жировую дистрофии, а также в большей степени восстанавливает про-антиоксидантное равновесие, энергетический обмен и активность систем детоксикации при лечебно-профилактическом введении в дозе 300 мг/кг.

2. В условиях развития окислительного стресса при острых токсических поражениях печени СС14 и этанолом выявлено в различной степени выраженное влияние флавоноидов и СЭ на ферментативное звено системы АОЗ и сопряженные механизмы клеточной защиты (энергообмен и детоксикацию).

3. Флавицин in vitro по силе антиоксидантного действия уступает кверцетину, но более мощно активирует АОЗ и превосходит кверцетин по эффективности гепатопротекции и поддержанию равновесия в системе ПОЛ/АОС. Отмечается достаточно тесная корреляционная связь между выраженностью гепатопротекции и коэффициентом окислительного стресса, характеризующим про-антиоксидантный баланс. Отсюда следует, что более важное значение для защиты печени имеет не просто снижение и подавление ПОЛ, а устранение дисбаланса в системе ПОЛ/АОС.

4. СЭ из Vicia abbreviate (truncatula) в дозе 300 мг/кг обладает выраженным лечебным действием при поражении печени, вызванном хронической алкогольной интоксикацией, усиливая адаптационно-приспособительную защитную реакцию, развивающуюся в ходе алкоголизации при введении этанола, превышая по эффективности карсил.

5. В результате курсового введения исследуемых флавоноидов в эффективных гепатопротекторных дозах наблюдается активация ферментов, принимающих участие в регенерации восстановленного глутатиона, и повышается содержание GSH в печени, что увеличивает неспецифическую резистентность органа к действию повреждающих факторов.

6. Исследуемые флавоноиды в норме и при эндотелиальной дисфункции увеличивают продукцию NO, вероятно, путем активации eNOS, и повышают печеночный кровоток, а также ограничивают гиперпродукцию NO iNOS в печени, стимулированную СС14, что в определенной степени обусловливает гепатопротективные свойства флавоноидов.

7. СЭ в дозе 300 мг/кг при лечебном применении на модели хронического СС14-гепатита уменьшает развитие фиброза, а также улучшает желчеобразовательную функцию печени в норме и при патологии печени.

8. Высокая эффективность СЭ, связанная с воздействием на основные звенья патогенеза острых и хронических поражений печени, наличие у него более выраженного лечебного действия, чем у карсила, позволяет рекомендовать СЭ в качестве субстанции для создания нового гепатопротекторного препарата.

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 42 печатных работы из них 9 статей в научных журналах, которые входят в перечень рекомендованных ВАК РФ.

## Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 351 страницах текста компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований (8 глав), заключения, общих выводов, списка литературы, приложений А, Б и В (55 страниц). Работа иллюстрирована 31 таблицей и 89 рисунками. Библиографический список включает 649 источников, из которых 416 публикации иностранных авторов.

## Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили индивидуальные флавоноиды: кверцетин (фирмы Merk), диосмин, гесперидин, выделенные из растительного сырья (Vicia tanuifolia (variabilis) Roth. и кожуры цитрусовых), сумма, содержащая арабиноглюкозид - и ксилоглюкозид диосметина, которая условно названа флавицином и СЭ, полученные из надземной части горошка обрубленного - Vicia abbreviate Fish. ex Spreng. (Vicia truncatula Fich. ex Bieb), сем. бобовых - Fabaceae на кафедре органической химии ГОУ ВПО "Пятигорской ГФА Росздрава" под руководством доктора фармацевтических наук, профессора Э.Т. Оганесяна. С помощью физико-химических методов анализа: температуры плавления, УФ-, ИК - и ПМР - спектроскопии, тонкослойной (ТСХ) и бумажной (БХ) хроматографии, пробы смешения, подтверждено строение выделенных веществ [Хочава М.Р., 2001, Шаренко О.М., 2005]. СЭ представляет собой порошок темно-коричневого цвета с приятным специфическим запахом, содержащий 5,12 - 5,67% флавицина [Шаренко О.М., 2005]. Для стандартизации предложен метод количественного спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в сухом извлечении при 410 нм, ошибка которого находится в пределах 3,09-3,55%. В качестве препарата сравнения использовали карсил.

Опыты проведены на 1050 белых беспородных и линии Wistar половозрелых крысах обоего пола массой 170-240 г. (по 10-12 животных контрольных групп и 6-8 опытных групп) и 80 белых мышах обоего пола массой 25-30 г. (по 10 мышей в группе). Животные содержались в условиях вивария Пят ГФА, Волгоградского государственного медицинского университета и государственного учреждения "Российского кардиологического научно-производственного комплекса Минздрава РФ" г. Москва с естественным световым режимом на стандартной диете [ГОСТ Р 50258-92], с соблюдением "Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях" [2007] и правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ [ГОСТ Р 51000.3-96, ГОСТ Р 51000.4-96]. Забой животных проводился согласно требований "Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных" [2007].

Определение эффективной дозы проведено на модели острого CCl4 -гепатитогепатоза, который воспроизводили путём введения per os с помощью зонда 3 раза через день 50% раствора CCl4 в вазелиновом масле в дозе 0,15 мл/100 г массы тела животного. Гесперидин, диосмин, флавицин, кверцетин исследовали в диапазоне доз 25, 50, 100 и 200 мг/кг, СЭ - 100, 200, 300 и 500 мг/кг при пероральном введении в виде водной суспензии по лечебно-профилактической схеме: в течение 7 дней до CCl4, а затем на фоне воспроизведения модели (5 дней). Исследуемые флавоноиды и СЭ вводили ежедневно в одно и то же время до кормления животных за 1 час до введения гепатотоксина. Установленные эффективные дозы были выбраны для дальнейших исследований и составили для индивидуальных веществ - 100 мг/кг (менее 1/60 от LD50), для СЭ - 300 мг/кг (менее 1/20 от LD50). Карсил изучали в дозе 100мг/кг.

Острое поражение печени этанолом воспроизводили курсовой алкоголизацией крыс-самок путём 2-х кратной внутрибрюшинной инъекции 33% раствора этанола в сутки в дозе 0,75 мл/100г массы тела животного в течение 7 дней [Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., 2002]. Исследуемые флавоноиды, СЭ и карсил животным вводили в эффективных дозах за 5 дней до введения этанола, а затем совместно с ним (7 дней).

Курсовое поение здоровых животных флавоноидами, СЭ и карсилом осуществляли в течение 12 дней в эффективных гепатопротекторных дозах.

Хроническую алкоголизацию проводили путем перорального введения 40% этилового спирта в дозе 14 мл/кг [Мансурова И.Д., 1985] в течение 60 дней. Лечебное действие СЭ изучали в дозе 300 мг/кг в сравнении с карсилом в дозе 100 мг/кг. Через сутки после 60-дневной алкоголизации (исходный контроль), через 7, 14 и 21 день лечебного применения СЭ и карсила проводили забой животных опытных и соответствующих контрольных групп. Контролем служили животные, которые продолжали получать только 40% этанол в дозе 14 мл/кг также 7, 14 и 21 день.

Оценку эффективности гепатозащитного действия проводили по степени нормализации биохимических показателей основных патологических синдромов, наблюдающихся при поражениях печени: цитолиза - активности в сыворотке АлАт, АсАт, КФ, ФЛА2, ГДГ, соотношению АсАт/АлАт; холестаза - активности в сыворотке крови ЩФ, γ-ГТП, содержанию билирубина и его фракций (прямого и непрямого билирубина), мезенхимального воспаления - определение белковых фракций, соотношения альбумины/глобулины и тимоловой пробы в сыворотке крови; печеночно-клеточной недостаточности, характеризуя состояние белково-синтетической и метаболической функций печени по показателям белкового (содержание общего белка, альбуминовой фракции и активности ХЭ, содержанию мочевины в сыворотке крови), углеводного (содержание глюкозы в крови и гликогена в печени) и липидного (содержание холестерина, ТРГ в сыворотке крови, содержание ТРГ и ФЛ в печени) обменов. В качестве маркеров хронизации патологического процесса в печени определяли компоненты соединительной ткани: содержание в печени общего оксипролина (ОП) и содержание гликозаминогликанов (ГАГ) в сыворотке крови. Кроме этого, изучали гистоморфологическую картину органа при окраске препаратов гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону для выявления компонентов соединительной ткани и суданом III для выявления липидов. Микрофотосъемку гистологических препаратов производили на микроскопе MICROS AUSTRIA (Австрия) цифровой фотокамерой "Olympus" (Япония). Об эффективности гепатозащитного действия судили также по гибели животных контрольных групп и животных, получавших гепатопротекторы.

Для сравнения эффективности гепатозащитного действия исследуемых флавоноидов, СЭ и карсила рассчитывали процент гепатопротекции по изученным биохимическим показателям в отдельности и в целом с учетом всех показателей по формуле: х 100%, где Н - коэффициент гепатопротекции, О - значение показателя в опытных группах, получавших совместно СС14 и гепатопротекторы, К - значение показателя у животных, получавших только СС14 (патологический контроль), N - значение показателя у интактных животных (нормальный контроль). Чем больше величина данного критерия приближалась к 100%, тем более эффективным считалось гепатозащитное действие.

Интенсивность ПОЛ изучали по содержанию ТБК-активных продуктов в печени и сыворотке крови, диеновых конъюгатов (ДК) в печени, интенсивности спонтанного и Fe2+-аскорбатиндуцированного ПОЛ в постъядерной фракции печени (ПФП). Оценку антиоксидантной системы (АОС) проводили путём определения активности в ПФП каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-S-трансферазы (Г-S-Т), глутатионредуктазы (ГР), глутатионпероксидазы (ГП): общей, Se-зависимой и Se-независимой, НАДФ+-редуктазы при использовании в качестве субстратов малата (МДГ), глюкозо-6-фосфата (Г-6-ФДГ) и изоцитрата (ИЦДГ), содержанию глутатиона восстановленного (GSH) в печени, по общей антиокислительной активности (АОА) сыворотки крови и резистентности эритроцитов к спонтанному гемолизу. Для количественной оценки дисбаланса в системе ПОЛ/АОС рассчитывали коэффициент окислительного стресса как отношение произведения показателей ПОЛ к произведению показателей АОС, выраженных в относительных единицах к норме [Давыдов Б.В., 1991], принимая, что при сохранении баланса в системе ПОЛ/АОС коэффициент (К) = 1.

Состояние энергообмена изучали по содержанию глюкозы, гликогена, пирувата, лактата, АТФ в печени и активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ), цитохром-с-оксидазы (ЦТО) и Mg 2+ - АТФ-азы в митохондриальной фракции печени. Антитоксическую функцию печени оценивали, измеряя активности ферментов метаболической трансформации ксенобиотиков - НАДН: K3 [Fe (CN) 6] -редуктазы, НАДФН: неотетразолий (НТ) - редуктазы, N-деметилазы, n-гидроксилазы в микросомальной фракции печени.

Изучение антиоксидантного действия гесперидина, диосмина, флавицина и кверцетина in vitro проведено на модели Fe2+‑индуцированного ПОЛ в липосомальной системе, полученной на основе фосфатидилхолина.

Изучение влияния флавоноидов на содержание радикалов NO в печени и в организме в целом проводили методом ЭПР при использовании Fe3+ДЭТК2 и Fe3+МГД2 в качестве ловушек в норме и после индукции ПОЛ CCl4.

Изучение влияния гесперидина и флавицина на печеночный кровоток проведено в норме при их пероральном введении в дозе 100 мг/кг и в условиях стимуляции ацетилхолином (0,01 мг/кг) и блокады нитро-L-аргинином (10 мг/кг) синтеза эндогенного оксида азота при введении анализаторов и флавоноидов (30 мг/кг) в левую бедренную вену.

Эндотелийпротективное действие гесперидина, диосмина, флавицина и кверцетина изучено в условиях моделирования дисфункции эндотелия в результате экстирпации матки с придатками у крыс-самок, вызывающей недостаточность половых гормонов. Исследуемые вещества вводили перорально в течение 4-хнедель после кастрации в дозе 100 мг/кг. Препаратом сравнения служил сулодексид с доказанной эндотелиопротективной активностью в дозе 30 ЕВЛ/кг (единицы высвобождения липопротеидлипазы). О влиянии флавоноидов на эндотелиальную дисфункцию судили по реакции сосудов на введение ацетилхолина (0,01 мг/кг), L-аргинина (100 мг/кг), нитро - L-аргинина (10 мг/кг) и нитроглицерина (0,007 мг/кг), и определяли скорость формирования тромба в сосудах по времени тромбообразования, вызванного аппликацией на стенку общей сонной артерии 50% раствора хлорида железа (III).

Измерение кровотока осуществлялось на предварительно наркотизированных этаминал-натрием (40 мг/кг) крысах с помощью ультразвукового допплерографа, датчика УЗОП-010-01 (рабочая частота 25МГц) и компьютерной программой ММ-Д-КMinimax Doppler v.1.7 (Санкт-Петербург, Россия).

Определение вязкости крови, агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ (5 мкМ) и индекс агрегации эритроцитов проводили с использованием реологических методов с применением регистрирующей аппаратуры: анализатор крови реологический (АРп-01, Россия), двухканальный лазерный анализатор агрегации (НПФ "Биола" LA-230-2, Россия), лазерный коагулометр ("Минилаб-701", Россия).

Антифибротическое действие СЭ исследовали на модели хронического поражения печени СС14 (пероральное введение 50% масляного раствора СС14 9 раз, дважды в неделю в дозе 2,0 мл/кг массы тела) при его лечебном применении в дозе 300 мг/кг в сравнении с карсилом в дозе 100 мг/кг по измерению биохимических маркеров соединительной ткани (ОП и ГАГ) и обнаружению ее элементов на гистологических препаратах печени через 7, 14 и 21 день лечения. Отдаленные результаты лечения были изучены через 2 месяца после 21-дневного курса лечения.

Для оценки желчеобразовательной функции печени СЭ вводили в дозе 300 мг/кг 12 дней здоровым животным, а также на фоне острого поражения печени СС14: 50% масляный раствор СС14 вводили подкожно в дозе 0,4 мл/100 г массы тела, 1 раз в сутки, 4 дня. Определяли объем и состав (содержание желчных кислот - ЖК и холестерина) выделенной желчи с расчетом холато-холестеринового коэффициента.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью параметрического критерия t Стьюдента с определением средней арифметической (М) и ее стандартной ошибки (m), непараметрического критерия Манна-Уитни и коэффициента линейной корреляции.

## Основное содержание работы

**1. Сравнительное изучение эффективности гепатозащитного действия флавоноидов, СЭ из V. abbreviate (truncatula) и их влияния на развитие окислительного стресса в условиях острого поражения печени тетрахлорметаном.**

Тетрахлорметан является наиболее известным гепатотоксином, применяемым для моделирования заболеваний печени. Он подвергается микросомальному окислению при участии цитохрома Р450 с образованием электрофильных алкилирующих интермедиатов и свободных радикалов, способных индуцировать ПОЛ и модифицировать биомолекулы в результате ковалентного связывания с ними. Как установлено в наших исследованиях, в результате введения СС14 наблюдался сдвиг про-антиоксидантного равновесия в сторону усиления ПОЛ (повышение содержания ТБК-продуктов и ДК, интенсивности Fe2+-аскорбатиндуцированного ПОЛ ПФП) с истощением АОЗ (падение активностей СОД, каталазы, ГП, Г-S-Т, НАДФ+-редуктаз, содержания GSH, АОА сыворотки крови), развитие гипоксического состояния с усилением анаэробного гликолиза и нарушением аэробной продукции энергии на уровне митохондрий (повышение соотношения лактат/пируват, снижение содержания глюкозы и гликогена в печени, снижение активности СДГ, ЦТО и повышение Мg2+-АТФазы), угнетение реакций микросомального окисления (снижение активностей N -деметилазы, n-гидроксилазы, НАДФН - НТ-редуктазы). Это сопровождалось развитием тяжелого поражения печени с проявлениями синдромов цитолиза (повышение активности ФЛА2, КФ, АлАт, АсАт и соотношения АсАт/АлАт), холестаза (повышение активности ЩФ, γ-ГТП, содержания общего билирубина, особенно фракции прямого билирубина), мезенхимального воспаления (диспротеинемия с увеличением глобулиновой фракции белков сыворотки крови и повышение тимоловой пробы), жировой дистрофии (увеличение количества ТРГ при снижении ФЛ в печени) и печеночно-клеточной недостаточности (уменьшение общего белка и особенно альбуминов в крови, снижение активности ХЭ, повышение фракции прямого билирубина в крови и содержания мочевины). На гистоморфологической картине также обнаруживались изменения, характерные для поражения печени ССl4: жировая и белковая дистрофия, очаги некроза, локализованные преимущественно в центральной зоне печеночной дольки, признаки воспалительной реакции (инфильтрация мононуклеарами), нарушения кровообращения в микрососудах (агрегация эритроцитов, стазы крови), поражения эндотелия синусоидов. На основании полученных данных можно говорить, что при введении крысам тетрахлорметана в печени развивался острый токсический активный гепатит с очаговой жировой дистрофией гепатоцитов (гепатитогепатоз). Количество погибших животных в этой группе составило 62,5%.

Лечебно-профилактическое применение флавоноидов, СЭ и карсила в эффективных дозах на фоне острого CCl4-гепатитогепатоза в разной степени влияло на восстановление биохимических показателей основных патологических синдромов поражения печени СС14, что отражает таблица 1, в которой знаком "+" обозначена полная нормализация показателя, отнесенного к тому или иному синдрому, "±" - неполная нормализация и "-" - отсутствие эффекта (показатель достоверно не отличается от такового у животных с патологией), а также указаны средние проценты гепатопротекции по синдромам. Видно, что в отношении устранения синдрома цитолиза флавицин, кверцетин и карсил проявили более выраженное действие, чем гесперидин и диосмин. Но флавицин, диосмин и гесперидин превосходили кверцетин и карсил по влиянию на развитие холестаза. Активацию мезенхимы кверцетин и карсил предупреждали более эффективно, чем флавицин, диосмин и гесперидин. Но флавицин и диосмин превышали действие кверцетина, гесперидина и карсила по влиянию на развитие синдрома печеночно-клеточной недостаточности. СЭ практически полностью нормализовал все изученные показатели.

Для количественной сравнительной оценки эффективности гепатозащитного действия флавоноидов, СЭ и карсила в целом были рассчитаны средние значения коэффициентов гепатопротекции с учетом всех биохимических показателей. Исходя из среднего процента гепатозащитной активности, наибольшей эффективностью в условиях СС14-гепатитогепатоза обладают флавицин (92%) и сухой экстракт (95%), что достоверно превышает действие карсила (61%) в 1,5-1, 6 раза и кверцетина (77%) в 1, 2 раза, и подтверждается процентом выживших животных, составившим для флавицина, диосмина и сухого экстракта 100%, кверцетина - 92%, гесперидина и карсила - 83%.

**Таблица 1** Восстановление показателей основных патологических синдромов при лечебно-профилактическом введении биофлавоноидов, СЭ и карсила в условиях острого СС14-гепатитогепатоза у крыс

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| синдромывещества | Цитолиз(АлАт,АсАт,КФ,ФЛА2)  | Холестаз(ЩФ,γ-ГТП,ПБ)  | Мезенхи-мальноевоспаление(глобулины,альбумины/глобулины,ТП) | Печеночно-клеточнаянедостаточность |
| синтети-ческаяфункция(общ. белок,альбуми-ны, ХЭ)  | обезвре-живающаяфункция(моче-вина,НПБ)  | метаболическаяфункция(глюкоза сыв.,гликоген печ.,ТРГ сыв.,ТРГ печ., ФЛ печ)  |
| Гесперидин,100мг/кг |  ± - ± +  | + - +  | ± ± -  | ± ± ± |  - +  |  - ± ± ± + |
| % восстановления | 64,3 | 65,6 | 46 | 61 | 56,8 | 71 |
| Диосмин,100 мг/кг | ± - + +  | + + + | + + ± | + + ±  | + + | ± + ± ±+ |
| % восстановления | 82,9 | 91,2 | 73,8 | 78,6 | 105,3 | 79 |
| Флавицин, 100 мг/кг | + + + + | + + + | + + ± | + + + | + + | + + ± ±+ |
| % восстановления | 89,9 | 98,5 | 75,7 | 83,4 | 107,5 | 101,1 |
| Кверцетин, 100 мг/кг | + + + + |  - ± ±  | + + + | + + ± | + -  | + + ± ± ± |
| % восстановления | 95,3 | 45,4 | 93,1 | 77,7 | 67,6 | 77,2 |
| Сухойэкстракт,300 мг/кг | + + + + | + + + | + + + | + + + | + + | + + + + + |
| % восстановления | 93,5 | 99,6 | 96,7 | 88,3 | 104,6 | 99,2 |
| Карсил,100 мг/кг | + + + + | ± - ± | + + + | + + ± | + -  |  - ± ± + |
| % восстановления | 93,6 | 48,4 | 96,7 | 71 | 65,1 | 36,3 |
| Примечение "+" - полная нормализация показателя; ±" - неполная нормализация; "-" - отсутствие эффекта |

Гистоморфологические исследования также свидетельствуют о более высоком защитном действии флавицина и СЭ, при применении которых отмечались наименьшие патогистологические изменения в печени крыс.

В гистологической картине печени крыс, получавших карсил, имелись признаки более выраженного воспаления, нарушения микроциркуляции и жирового перерождения, а также отмечалось наличие ступенчатых некрозов и нарушение цитоархитектоники печёночных балок. При анализе влияния исследуемых веществ, обладающих различной степенью гепатозащитного действия, на развитие окислительного стресса при остром СС14

|  |
| --- |
| Показатели ПОЛ |
|  |
| Показатели АОС |
|  |
| Примечание: 100% - контроль - CCl4-гепатитогепатоз |
|  - достоверно по отношению к интактным значениям |
|  - достоверно по отношению к патологическому контролю |

**Рисунок 1** - Влияние биофлавоноидов, СЭ и карсила на систему ПОЛ - АОС при остром СС14-гепатитогепатозе у крысгепатитогепатозе, были установлены различные варианты изменения прооксидантной и антиоксидантной составляющей данного процесса (рис.1, таблица 2).

Так, флавицин и СЭ нормализовали все изученные показатели ПОЛ и практически все показатели неферментативного и ферментативного звеньев АОС. Кверцетин так же,

как и флавицин и СЭ, полностью сдерживал интенсификацию ПОЛ, но при этом не влиял на активность ряда важнейших антиоксидантных ферментов (СОД, каталаза, Г-S-Т). Напротив, диосмин, значительно более эффективно, чем кверцетин, нормализовал ферментативное звено АОС (на уровне контроля оставалась только активность Г-6-ФДГ), но в меньшей степени снижал прооксидантный потенциал. Гесперидин и карсил не полностью нормализовали как показатели ПОЛ, так и системы АОЗ, особенно ее ферментативного звена: у крыс, получавших гесперидин и карсил на уровне контроля находились активности ферментов как 1-ой линии защиты (Г-S-Т и СОД, ГП, Г-S-Т соответственно), так и ферментов, поставляющих восстановительные эквиваленты для "работы" ГП и Г-S-Т (Г-6-ФДГ, ИЦДГ и МДГ соответственно), так что при этом и общая НАДФ+-редуктазная активность полностью не восстанавливалась, в отличие от применения остальных гепатопротекторов (рис.1).

Оценка восстановления про-антиоксидантного равновесия с помощью расчета коэффициента окислительного стресса (таблица 2) показала, что его значения стали почти равными единице в результате применения флавицина и СЭ. Наиболее высокие коэффициенты имели животные, получавшие гесперидин (17,4) и карсил (10,7). При этом выявлена тесная корреляция между коэффициентом окислительного стресса и процентом гепатопротекторной активности (r= - 0,85±0,26, Р<0,05). Можно сделать вывод, что выраженность гепатозащитного действия существенным образом связана со степенью восстановления про-антиоксидантного равновесия: чем в большей степени наблюдается восстановление баланса в системе ПОЛ-АОС, тем выше степень защитного действия. Обращает на себя внимание, что прооксидантную составляющую окислительного стресса кверцетин снижал в большей степени (до 0,54), чем флавицин (0,92) и СЭ (1,07) но коэффициент окислительного стресса при его введении был почти в 2 раза выше (3,4) из-за недостаточного восстановления АОС. Это свидетельствуют в пользу того положения, что большее значение для защиты печени имеет не просто снижение и подавление ПОЛ, а восстановление той

**Таблица 2** - Значения коэффициента окислительного стресса и процента гепатопротекции у животных с CCl4-гепатитогепатозом и при введении биофлавоноидов, СЭ из V. truncatula и карсила

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы животных | Прооксиданты(ТБК - акт. продукты печ. x ДК печ),в отн. ед. к норме | Антиоксиданты(СОД x каталаза x ГП x Г-S-Т печ),в отн. ед. к норме | К,про-/антиоксид.  | %гепато-протекции |
| Интактные | 1 | 1 | 1 |  |
| СС14-гепатитогепатоз | 34,8 | 0,091 | 382 |  |
| Введение гесперидина,100 мг/кг | 5,38 | 0,31 | 17,4 | 65 |
| Введение диосмина,100 мг/кг | 2,98 | 0,48 | 6,2 | 84 |
| Введение флавицина,100 мг/кг | 0,92 | 0,78 | 1,2 | 92 |
| Введение кверцетина,100 мг/кг | 0,54 | 0,16 | 3,4 | 77 |
| Введение СЭ,100 мг/кг | 1,07 | 0,56 | 1,9 | 95 |
| Введение карсила,100 мг/кг | 1,75 | 0,16 | 10,7 | 61 |

Регуляции интенсивности свободнорадикального окисления и поддержание того равновесия в системе ПОЛ/АОС, которое существуют в норме. Полученные результаты демонстрируют существенную роль не только собственно антиоксидантного действия флавоноидов, но и усиления эндогенных механизмов АОЗ для поддержания и восстановления про-антиоксидантного равновесия в условиях окислительного стресса.

Исследуемые нами флавоноиды и СЭ при их лечебно-профилактическом применении в условиях острого CCl4-гепатитогепатоза, так же, как и карсил, тормозили анаэробные процессы и улучшали аэробный путь производства энергии. При применении гесперидина, диосмина, флавицина, кверцетина и СЭ достоверно уменьшалось соотношение лактат/пируват на 37%, 66%, 87%, 79% и 85% соответственно, повышались активности митохондриальных ферментов: СДГ на 86%, 113%, 239%, 119% и 119%; ЦТО - на 131%, 379%, 402% и 228% соответственно и содержание АТФ в печени на 41%, 63%, 67%, 112% и 64% соответственно. Видно, что в наименьшей мере снижал процессы анаэробиоза и повышал содержание АТФ в печени гесперидин. Карсил также уступал, по некоторым показателям, изученным флавоноидам и СЭ: снижал соотношение лактат/пируват на 78%, увеличивал активность ЦТО и содержание АТФ на 191% и 22% соответственно и не влиял на активность СДГ.

Преодолению окислительного стресса способствовало также и то, что исследуемые вещества восстанавливали работу микросомальной монооксигеназной и редуктазной электрон-транспортных цепей, что позволяет нормализовать как продукцию свободных радикалов, так и детоксикационную функцию печени. Более полное восстановление активностей N-деметилазы и n-гидроксилазы при применении флавицина и СЭ, возможно, объясняется тем, что при этом в наибольшей степени обеспечивается защита системы цитохромов Р450 от деградации.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что выраженность гепатозащитного действия при остром поражении печени СС14 тесно связана со способностью восстанавливать про-/антиоксидантное равновесие за счет повышения эффективности эндогенной системы АОЗ и сопряженных с ней процессов энергообеспечения и детоксикации, что является существенным в механизме гепатопротекторной активности флавоноидных соединений и СЭ. Флавицин и СЭ в условиях СС14-гепатитогепатоза нормализуют или улучшают практически одни и те же показатели, т.е. их действие сходно как в качественном, так и количественном отношении. В отношение показателей белкового обмена и активации мезенхимы СЭ несколько превышает действие флавицина, что возможно связано с наличием в его составе дополнительных компонентов, например, целого ряда аминокислот, в. т. ч. незаменимых.

**2. Сравнительное изучение эффективности гепатозащитного действия флавоноидов, СЭ из V. abbreviate (truncatula) и их влияния на развитие окислительного стресса при остром алкогольном поражении печени**

Как известно, алкогольное поражение печени в большой степени обусловлено окислительной деградацией этанола, протекающей в этом органе [Буеверов А.О., 2002, Калинин А.В., 2005, French S. W., 2000, Lieber C. S., 2005] при участии алкогольдегидрогеназы и микросомальной монооксигеназной системы. Избыточное поступление этанола приводит к накоплению ацетальдегида и повышению образования свободных радикалов в микросомальных е−-транспортных цепях, что приводит к усилению ПОЛ, истощению антиоксидантных ресурсов и повреждению биомембран свободными радикалами и продуктами ПОЛ, что и определяется понятием окислительного стресса.

Было установлено, что в результате 7-дневной алкоголизации наблюдалось повышение N-деметилазной и НАДФН-НТ-редуктазной активностей на 145% и 57%, вероятно, вследствие индукции изоформы цитохрома Р450 2Е I, участвующей в окислении этанола [Мальцев А.Н. и др., 2001], что происходит в результате систематического злоупотребления алкоголем. Одновременно было выявлено повышение интенсивности индуцированного ПОЛ ПФП на 128% и содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови на 114%, хотя в печени содержание ТБК-активных продуктов и ДК достоверно не изменилось. Это сопровождалось падением эффективности АОЗ на различных уровнях - снижением активности СОД на 41%, каталазы на 50%, общей активности ГП на 51%, Г-S-Т на 38%, содержания GSH на 48%, а также произошло снижение активности основных ферментов, поставляющих восстановительные эквиваленты для глутатионредуктазной реакции: МДГ - на 43%, Г-6-ФДГ - на 75% и ИЦДГ - на 57%. При этом коэффициент окислительного стресса увеличился до 62,5, что указывало на развитие синдрома пероксидации. Наряду с этим, как и при остром CCl4-гепатитогепатозе, происходило формирование тканевой гипоксии, о чём свидетельствовало более чем пятикратное увеличение соотношения лактат/пируват, снижение содержания в печени глюкозы и гликогена, являющееся результатом высокой интенсивности анаэробного гликолиза и гликогенолиза, а также падение активности ферментов митохондрий (СДГ и ЦТО) и интенсивности процесса окислительного фосфорилирования (рост Mg2+-АТФазной активности) и, как следствие, уменьшение содержания АТФ (-59%).

Выявленные изменения биохимических показателей в результате 7-дневного введения 33% этанола крысам-самкам свидетельствовали о развитии поражения печени с проявлением признаков тех же основных патофизиологических синдромов, что и при СС14-гепатитогепатозе: цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления (с вовлечением иммунного компонента) и печеночной недостаточности. Данные изменения были выражены в меньшей степени, чем при воздействии СС14, и во многом совпадали с теми, которые наблюдаются у больных с разными формами алкогольной болезни печени.

При исследовании гистологических препаратов также выявлялись определённые морфологические признаки, характерные для алкогольного поражения печени: перивенулярное поражение гепатоцитов с баллонной дистрофией и некрозом с превалированием признаков "эозинофильной дегенерации", хотя телец Мэллори, явлений жировой дистрофии, а также перицеллюлярного фиброза обнаружено не было, что свидетельствовало о развитии острого токсического поражения печени умеренной степени тяжести.

Исследуемые флавоноиды и СЭ при алкогольном поражении печени также проявили гепатозащитные свойства. Данные таблицы 3 свидетельствуют что, гесперидин уступал всем остальным веществам, а флавицин и СЭ, наоборот, превосходили их по влиянию на восстановление практически всех показателей синдромов цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления, белково-синтетическую и метаболическую функции печени.

Как и при СС14-гепатитогепатозе, кверцетин и карсил превышали действие диосмина на цитолиз и мезенхимальное воспаление и дополнительно на белково-синтетическую функцию печени, но диосмин был более эффективным по воздействию на холестаз и метаболическую функцию печени (углеводный и липидный обмены), чем кверцетин и карсил, что отчетливо видно по средним процентам восстановления показателей соответствующих синдромов.

По коэффициенту гепатопротекции с учетом всех биохимических показателей исследуемые вещества по эффективности гепатопротекторного действия при остром алкогольном поражении печени можно расположить в следующей последовательности: сухой экстракт (97%), флавицин (96%), диосмин (78%), кверцетин (70%), карсил (69%) и гесперидин (38%). Флавицин и СЭ имеют достоверно более высокие коэффициенты гепатопротекции, чем кверцетин (70%) и карсил (69%) в 1,4 раза. Процент выживших животных при применении карсила в ходе 7-дневной алкоголизации был ниже (66,7%), чем при применении диосмина (83,3%), флавицина (100%) сухого экстракта (100%).

**Таблица 3** Восстановление показателей основных патологических синдромов при лечебно-профилактическом введении биофлавоноидов, сухого экстракта и карсила в условиях острого алкогольного поражения печени у крыс

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  синдро -мывещества | Цитолиз(АлАт,АсАт,КФ,ФЛА2)  | Холестаз(ЩФ,γ-ГТП,ПБ)  | Мезенхимальноевоспаление(глобулины,альбумины/глобулины,ТП) | Печеночно-клеточная недостаточность |
| белково-синтетическаяфункция(общ. белок,альбумины, ХЭ, мочевина)  | метаболическая функция(глюкоза сыв.,гликоген печ.,ТРГ сыв.,ТРГ печ., ФЛ печ)  |
| Гесперидин,100мг/кг | + - + + |  - ± | ± -  | ± - ± ± -  |  - + -  |
| % восстановления | 63,4 | 26,1 | 16,3 | 26,5 | 35,7 |
| Диосмин,100 мг/кг | + + + + |  - + + | + ± ± | + ± + ± | ++ + + + |
| % восстановления | 93,4 | 84,4 | 54,9 | 54,5 | 84,3 |
| Флавицин,100 мг/кг | + + + + | + + + | + ± + | + + + ± |  + + + + + |
| % восстановления | 115,6 | 101,9 | 82,9 | 65,6 | 107,6 |
| Кверцетин,100 мг/кг | + + + + |  - ± + | + - ± | + + + ± | + ± + + -  |
| % восстановления | 100,8 | 55,2 | 67,2 | 59 | 75,3 |
| Сухойэкстракт,300 мг/кг | + + + + | + + + | + + + | + + + + | + + + + + |
| % восстановления | 96,3 | 94,8 | 105,1 | 94,6 | 95,0 |
| Карсил,100 мг/кг | + + + + | + - + | + ± ± | + + ± + |  - + + - |
| % восстановления | 108,7 | 65,3 | 84,1 | 56,3 | 29,0 |
| Примечение "+" - полная нормализация показателя; "±" - неполная нормализация; "-" - отсутствие эффекта |

Как и при CCl4-гепатитогепатозе, при алкогольном поражении печени, исследуемые флавоноиды, СЭ и карсил способствовали нормализации интенсивности ПОЛ и активности АОС (рис.2). При этом во всех случаях наблюдалась полная нормализация содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови и

|  |
| --- |
| Показатели ПОЛ |
|  |
| Показатели АОС |
|  |
| Примечание: 100% - контроль - алкогольное поражение печени |
|  - достоверно по отношению к интактным значениям |
|  - достоверно по отношению к контролю |
| Обозначения как на рис.1 |

**Рисунок 2** - Влияние биофлавоноидов, СЭ и карсила на систему ПОЛ - АОС при остром алкогольном поражении у крыс уменьшение накопления МДА при Fe2+аскорбатиндуцированном ПОЛ ПФП, за исключением животных, получавших гесперидин (накопление оставалось выше нормы на 62%).

В отношении восстановления ферментативной АОЗ можно отметить значительное сходство в действии диосмина, флавицина и СЭ. При применении флавицина и СЭ при алкогольной интоксикации на уровне нормальных значений находились практически все показатели АОС: СОД, каталаза, ГП общ., Г-S-Т, GSH, общая НАДФН+-редуктазная активность (малат+глюкозо-6-фосфат+изоцитрат) с выраженной степенью подъема Г-6-ФДГ. Лишь активность ИЦДГ при применение СЭ не достигала интактных значений, но при этом активность Г-S-Т и ГР были достоверно выше нормы и контроля соответственно. Действие диосмина характеризовалось несколько меньшей эффективностью: из перечисленных показателей не полностью восстановились общая НАДФ+-редуктазная активность (в основном из-за ИЦДГ) и активность ГП. То же самое можно отметить и в действии кверцетина, но, кроме этого, не полностью восстанавливалась активность каталазы и оставались на низком уровне активности Г-S-Т, ГР и ИЦДГ. Под влиянием гесперидина и карсила наблюдалась полная нормализация СОД и каталазы, практически в равной мере повышалось содержание GSH. При действии гесперидина отмечалось некоторое увеличение активности ГП, но при введении карсила активность данного фермента не изменилась по сравнению с животными, получавшими только этанол. В то же время, гесперидин не повлиял на активность Г-S-Т, а карсил нормализовал ее. В отношении НАДФ+-редуктазных активностей при применении гесперидина отмечалось увеличение до нормы МДГ при неизмененной активности ИЦДГ. В то же время карсил усиливал активность ИЦДГ, не влияя на МДГ и Г-6ФДГ. В силу этого и общая НАДФ+-редуктазная активность при их введении восстанавливалась не в полной мере.

Коэффициент окислительного стресса в результате применения флавоноидов, СЭ и карсила значительно уменьшился по сравнению с животными, получавшими только алкоголь (таблица 4). При введении флавицина и СЭ он был даже ниже 1. Наиболее высокие показатели коэффициента окислительного стресса, как и в опытах с поражением печени СС14, имели животные, получавшие гесперидин (3,26) и карсил (3,2), для которых установлена и меньшая эффективность гепатозащитного действия при алкогольном поражении печени.

**Таблица 4** - Значения коэффициента окислительного стресса и процента гепатопротекции у животных с алкогольной интоксикацией и при введении биофлавоноидов, СЭ и карсила

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Группы животных | Прооксиданты(ТБК - акт. продукты сыв. x ТБК - акт. продукты печ. xДК печ. x ПОЛ ПФП),в отн. ед. к норме | Антиоксиданты(СОД x каталаза x ГП xГ-S-Т печ),в отн. ед. к норме | К,про-/антиоксид.  | %гепато-протекции |
| Интактные | 1 | 1 | 1 |  |
| Алкогольная интоксикация | 5,6 | 0,0896 | 62,5 |  |
| Введение гесперидина,100 мг/кг | 1,18 | 0,36 | 3,26 | 38 |
| Введение диосмина,100 мг/кг | 1,34 | 0,60 | 2,23 | 78 |
| Введение флавицина,100 мг/кг | 0,79 | 1,13 | 0,70 | 96 |
| Введение кверцетина,100 мг/кг | 0,58 | 0,22 | 2,63 | 70 |
| Введение СЭ,100 мг/кг | 0,91 | 1,44 | 0,63 | 97 |
| Введение карсила,100 мг/кг | 1,28 | 0,40 | 3, 20 | 69 |

Таким образом, вывод о важности поддержания про-антиоксидантного равновесия и значимости усиления собственных механизмов АОЗ при действии повреждающих факторов, нашел свое подтверждение и в опытах с алкогольным поражением печени. Корреляция между коэффициентом окислительного стресса и процентом гепатопротекции составила - 0,81±0,29, Р<0,05, доказывая наличие достаточно существенной связи между эффективностью гепатозащитного действия и степенью восстановления про-антиоксидантного равновесия.

Интенсивность анаэробного пути окисления углеводов при алкогольном поражении печени на фоне применения флавоноидов, СЭ и карсила была значительно снижена, а также наблюдались восстановительные процессы в митохондриях печени и повышалось содержание АТФ. Более выраженное восстановление показателей энергетического обмена наблюдалось у животных под влиянием флавицина и СЭ, применяемых на фоне 7-дневной алкоголизации: соотношение лактат/пируват снизилось на 88% и 91%, содержание АТФ увеличилось на 127% и 106%, активности СДГ - на 135% и 137% и ЦТО - на 63% и 55% соответственно по отношению к контролю, что достоверно не отличалось от соответствующих значений у интактных животных.

В условиях алкогольной интоксикации было выявлено индуцирующее влияние на цитохром-Р450-зависимые реакции: гесперидина и карсила - на N-деметилазную (+22% и +97%) и n-гидроксилазную активности (+289% и +420%); кверцетина - на N-деметилазную активность (+131%); СЭ - на n-гидроксилазную активность (+519%). При применении флавицина и диосмина все те изменения в данных реакциях микросомального окисления, которые были вызваны введением этанола, полностью устранялись: снижалась активность N-деметилазы (-51% и - 42%) и повышалась активность n-гидроксилазы (+153% и +150%) до уровня нормы (указаны проценты изменения по сравнению с контролем, получавшим только этанол).

Таким образом, наибольшая эффективность гепатозащитного действия при алкогольном поражении печени, которая превышает таковую карсила, выявлена у флавицина и СЭ. Сравнительный анализ показывает, что чем в большей степени вещества восстанавливают про-антиоксидантное равновесие и устраняют метаболические сдвиги, развивающиеся вследствие усиления окислительного метаболизма алкоголя, тем более выраженным гепатозащитным действием они обладают. Важным в защите печени от повреждающего воздействия в результате оксидативного стресса является не только собственный антиоксидантный эффект соединений, но и способность поддерживать высокую активность эндогенной антиоксидантной системы, нарушение функционирования которой, приводит к срыву компенсации и развитию синдрома пероксидации.

**3. Изучение антиоксидантного действия флавоноидов, сухого экстракта из V. abbreviate (truncatula) и карсила in vitro и их влияния на системы АОЗ, энергетического обмена и детоксикации in vivo в условиях нормы**

Исследования, проведённые in vitro и на здоровых животных после курсового введения флавоноидов, СЭ и карсила в эффективных гепатопротекторных дозах, позволили установить следующее: I. Гесперидин, диосмин и флавицин подавляют Fe2+-индуцированное ПОЛ в системе липосом и являются менее сильными антиоксидантами прямого действия, чем кверцетин (IC50 равно соответственно 7,0⋅10-2М, 4,9⋅10-2М, 4,9⋅10-3М и 6,3⋅10-5М). II. В результате курсового введения исследуемых флавоноидов в организме животных регистрируется:

1) снижение ТБК-активных продуктов крови; снижение активности антирадикальных и антиперекисных ферментов (СОД и ГП);

2) усиление глутатионовой системы (увеличение содержания GSH, активности ГР и НАДФ-редуктаз в печени);

3) снижение соотношения лактат/пируват и содержания глюкозы в печени;

4) повышение активности Mg2+АТФазы в митохондриях печени без снижения АТФ в этом органе;

5) повышение активности ферментов микросомального окисления.

Многие из выявленных эффектов флавоноидов проистекают, на наш взгляд, из природы химических свойств этих соединений, а именно способности участвовать в обратимых окислительно-восстановительных превращениях, проявляя как водороддонорные, так и водородакцепторные свойства. В силу этого биофлавоноиды могут формировать самостоятельные редокс-системы типа фенол-семихинон-хинон, что дает им возможность снижать количество и/или образование свободных радикалов и интенсивность ПОЛ и, вероятно, позволяет создавать в клетке резерв окисленных никотинамидных коферментов (NAD+; NADР+), которые могут обеспечить усиление метаболических реакций и поддержание пула восстановленного GSH, что повышает мощность эндогенной АОС. Формирование самостоятельных редокс-систем и усиление энергопродукции в ходе гликолиза может определять антигипоксическое действие флавоноидов, что помогает устранить усугубляющее влияние гипоксии и энергодефицита при развитии окислительного стресса.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно заключить, что механизм защитного действия биофлавоноидов против окислительного стресса, развивающегося при токсических поражениях печени, является многоплановым и многообразным. Это и прямое антиоксидантное действие в силу антирадикальных и хелатирующих свойств данных соединений. Это и непрямая защита путём активирования эндогенной системы АОЗ и детоксикации, а также повышение неспецифической устойчивости путём улучшения энергопродукции, защиты митохондрий и SH-групп белков от окислительного повреждения. Такое опосредованное повышение активности естественных защитных систем может иметь немаловажное значение в ускорении адаптации организма к действию повреждающих факторов среды. Следует подчеркнуть, что более значимым является активирование эндогенной защитной системы и оптимизация ее работы, чем собственная АОА соединений, что может достигаться, согласно последним данным литературы [Меньщикова Е.Б. и др., 2006], через активирование флавоноидами антиоксидант-респонсивного элемента (ARE), присутствующего в промоторах многих индуцибельных генов в ответ на окислительный и химический стресс.

**4. Изучение влияния флавоноидов на эндотелиальную дисфункцию, продукцию NO, органный кровоток и гемореологические свойства крови**

Хорошо известно положительное влияние биофлавоноидов на систему кровообращения, недостаточность которой способна усугублять метаболические нарушения, что требует коррекции гемодинамических и гемореологических расстройств при различных патологиях внутренних органов. Возможно, многие сосудистые эффекты флавоноидов связаны с их влиянием на эндотелийзависимые процессы [Benito S., 2002, Kowalczyk E., 2002, Lorenz M., 2004, Leikert J. F., 2002, Wallerath Th., 2005].

Наши исследования на животных с моделированием эндотелиальной дисфункции подтверждают данную точку зрения, демонстрируя эндотелий протективным действие гесперидина, диосмина, флавицина и кверцетина.

При тестировании эндотелиальной функции путем регистрации мозгового кровотока у крыс-самок с недостаточностью половых гормонов, получавших исследуемые флавоноиды в течение месяца в дозе 100 мг/кг, установлено улучшение реакции сосудов на ацетилхолин (стимулятор синтеза эндогенного NO), а также более выраженное снижение кровотока в ответ на введение блокатора NO-синтазы - нитро-L-аргинина по сравнению с экспериментальной патологией. Кроме этого, у животных, получавших флавоноиды, наблюдалось увеличение по сравнению с контролем степени прироста мозгового кровотока (гесперидин>кверцетин>диосмин>флавицин) в ответ на многократное введение ацетилхолина. Это позволяет сделать вывод об увеличении продукции NO эндотелиальными клетками под влиянием флавоноидов. Эндотелий протективное действие флавоноидов проявлялось и в том, что они увеличивали время тромбообразования, которое значительно снижалось у животных с дисфункцией эндотелия, располагаясь по эффективности своего действия в следующем порядке кверцетин>флавицин>диосмин>гесперидин.

Кроме того, флавоноиды на фоне эндотелиальной дисфункции оказывали корреггирующее действие на вязкость крови, уменьшали индекс агрегации эритроцитов и тромбоцитов и увеличивали индекс дезагрегации тромбоцитов, устраняли нарушение механических свойств эритроцитов (таблица 5).

Способность флавоноидов положительно влиять на функционирование сосудистого эндотелия имеет значение для нормализации органного кровотока и микроциркуляции. В опытах на наркотизированных крысах-самцах продемонстрировано улучшение печеночного кровотока при введении гесперидина и флавицина, а также показано, что данная реакция обусловлена их влиянием на эндотелий с активацией выработки NO.

**Таблица 5** - Влияние флавоноидов на агрегацию тромбоцитов крови кастрированных крыс

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группы животных | Индекс агрегации тромбоцитов  | Индекс дезагрегации тромбоцитов | Максимальный наклон |
| Интактные животные | 4,8±1,52 | 63,2±6,09 | 18,9±1,14 |
| Животные с эндотелиальной дисфункцией | 15,6±3,51♣+53% | 54,4±6,9914% | 53,0±0,76♣+180% |
| Гесперидин | 10,4±1,63\*33% | 60,0±7,00+10% | 35,5±1,14\*33% |
| Флавицин | 10,5±0,70\*33% | 64,5±7,24+19% | 42,6±4,91\*20% |
| Кверцетин | 12,8±0,52\*18% | 69,4±3,13\*+28% | 38,3±2,95\*28% |
| Диосмин | 13,6±0,6013% | 61,0±8,22+12% | 44,9±4,82\*15% |
| Сулодексид | 9,8±4,9\*37% | 79,7±7,31\*+47% | 25,6±0,76\*52% |
| Примечания1 ♣ - данные достоверны по отношению к интактным животным (Р<0,05), критерий Манна-Уитни;2 \* - данные достоверны по отношению к животным с эндотелиальной дисфункцией (Р<0,05), критерий Манна-Уитни |

Повышение содержания NO выявлено и методом ЭПР в организме животных, получавших гесперидин (100 мг/кг, 5 дней). О повышении уровня NO свидетельствовало увеличение компонентов сигнала парамагнитного аддукта NO-Fe2+-МГД2 в спектрах ЭПР мочи животных после применения гесперидина по сравнению с таковыми у интактных крыс (рис.3).

**Рисунок 3**- Влияние введения гесперидина на образование аддуктов NO в организме здоровых животных

В результате инъекции CCl4 в печени наблюдался значительный рост интенсивности генерации радикалов NO, регистрируемой методом ЭПР с использованием Fe3+ - ДЭТК2 в качестве ловушки NO, вероятнее всего, вследствие активации iNOS. Усиление экспрессии iNOS под действием СС14, возможно, связано с тем, что тетрахлорметан способен индуцировать ПОЛ и связанную с ним продукцию супероксидного анион-радикала (О2⋅ -), который является активатором синтеза NO индуцибельной NO-синтетазной системой [Коваленко О.А. и др., 1996, Реутов Н.П., 2000, Данилович Ю.В., 2001,Okamoto T., 2000]. Повышение содержания в печени NO под действием СС14 может вносить дополнительный вклад в развитие окислительного стресса и в проявление гепатотоксического действия СС14, поскольку NO может функционировать и как ингибитор токсического действия О2⋅ - , и как источник образования более опасных NOO⋅. радикалов [M. E. de Vera, 1995].

Предварительное введение флавоноидов кверцетина и гесперидина перед инъекцией СС14 значительно снизило амплитуды 3-х компонентов сигнала аддукта NO-Fe2+-ДЭТК2 в образцах печени.

**Примечания** 1 Интактные животные; 2 Введение CCl4; 3 Кверцетин+CCl4; 4 Гесперидин+CCl4

**Рисунок 4**- Спектры ЭПР образцов печени крыс из разных экспериментальных групп при температуре жидкого азота

У животных, которым вводили такие флавоноидные соединения, как диосмин и флавицин на фоне стимуляции продукции оксида азота СС14, выявить их влияние на процесс образования NO в печени крыс не удалось. В ЭПР спектрах образцов печени этих животных доминировал интенсивный синглентный сигнал, не связанный с образованием парамагнитных аддуктов NO-Fe2+-ДЭТК2. Снижение содержания NO в организме животных, которым вводили флавицин и диосмин, удалось установить при использовании в качестве ловушки Fe3+-МГД2 по подавлению соответствующих компонентов сигнала аддукта NO-Fe2+-МГД2 в спектрах ЭПР мочи животных, получавших на фоне CCl4 флавицин и диосмин, по сравнению с контрольными животными (введение только CCl4).

Подавление продукции NO флавоноидными соединениями, скорее всего, связано с их антиоксидантной активностью и способностью тормозить образование свободных радикалов. Кроме того, показано, что флавоноидные соединения уменьшают экспрессию iNOS в макрофагах, индуцированную липополисахаридами [Chen Y. et al., 2000, Cheon B. S. et al., 2000, Chi Y. et al., 2001] через торможение связывания фактора транскрипции NF-κB, который контролирует индукцию экспрессии генов iNOS.

Таким образом, эндотелий протективное действие исследуемых флавоноидов, улучшение гемореологических свойств крови, повышение продукции NO сосудистым эндотелием и увеличение печеночного кровотока, а также снижение гиперпродукции NO в печени индуцибельной NO-синтазой могут быть дополнительными факторами защиты печени от повреждения.

**5. Изучение гепатозащитного действия СЭ из V. abbreviate (truncatula) при хронической экспериментальной патологии печени**

Поскольку в клинической практике препараты чаще используются с лечебной целью на фоне уже сформировавшейся патологии, необходимо продемонстрировать терапевтическую эффективность нового средства, а также важно оценить его влияние на пролиферацию соединительной ткани, наблюдающуюся при хронических заболеваниях печени.

Лечебное действие СЭ при хронической алкоголизации в дозе 300 мг/кг в сравнении с карсилом в дозе 100 мг/кг изучали через 7, 14 и 21 день их применения после 60-дневного введения 40% этанола и затем совместно с ним.

Было установлено, что в результате 60-дневного введения алкоголя наблюдалось падение эффективности системы АОЗ и нарушение про-/антиоксидантного равновесия с преобладанием прооксидантной составляющей, т.е. развитие окислительного стресса. При этом отмечался рост содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови на 135%, в печени на 175% и повышение количества ДК в печени на 332%. Одновременно регистрировалось снижение в печени активности основных антиоксидантных ферментов: СОД - на 55%, каталазы - на 45%, ГП - на 47%, ГР - на 41% и Г-S-ТР - на 48%, а также Г-6-ФДГ - на 88%, участвующей в обеспечении глутатионредуктазной реакции восстановительными эквивалентами. Кроме этого, отмечалось усиление анаэробиоза (повышалось соотношение лактат/пируват на 100%) и падение содержания АТФ (-52%), т.е. развивался энергодефицит, что, как известно, способствует дополнительной стимуляции свободно-радикального окисления и может вызвать необратимые изменения и гибель клетки.

У крыс после 60-дневной алкоголизации регистрировалось достоверное повышение в сыворотке крови активности АлАт (+134%) и ЩФ (+72%), содержания общего билирубина (+53%), показателя ТП - на 104%, увеличивалось содержание ТРГ в сыворотке крови (+132%) и в печени (+70%), снижалась активность ХЭ в сыворотке крови на 48%. Эти изменения свидетельствовали о развитии цитолиза и холестаза гепатоцитов, жировой дистрофии, снижении белково-синтетической функции печени, развитии воспаления в этом органе и активации мезенхимы. Такие показатели, как содержание ГАГ в сыворотке крови и ОП в печени, увеличивались на 15% и 35% соответственно, но достоверных отличий от нормы выявлено не было.

При дальнейшем приеме алкоголя выявлена активация адаптационно-приспособительных механизмов, направленных на защиту против повреждающего фактора (рис.5). Это проявилось, прежде всего, в том, что повышались активности ГП и Г-S-ТР, снижалось содержание GSH в печени и увеличивались активности Г-6-ФД и ГР.

При лечебном применении СЭ наблюдалась более выраженная активация ГП и Г-S-ТР. В то же время у животных, леченных карсилом, отсутствовала активация Г-S-ТР и наблюдалась менее выраженная активация ГП. В результате уже через 14 дней лечения сухим экстрактом наблюдалась полная нормализация содержания продуктов ПОЛ, в то время, как при лечении карсилом нормализация их содержания происходила только к окончанию срока лечения.

У крыс, получавших только этанол, хотя и регистрировались изменения, направленные на восстановление ПОЛ, но все же содержание перекисных продуктов оставалось выше нормы, т.е. несмотря на развитие защитной реакции у этих животных, ее оказалось недостаточно для полного преодоления окислительного стресса.

У крыс, леченных СЭ, наблюдалось более выраженное снижение коэффициента окислительного стресса (1,73), чем у животных, леченных карсилом (7,27), что свидетельствовало о более полном восстановлении про-антиоксидантного равновесия у этих животных.

|  |  |
| --- | --- |
| А**^****\*****^****\*****\*****\*****\*****^****\*****\*****\*****\*****^** 60 +7 4 +21 |  60 +7 +14 +21Б**^****\*****\*****^****\*****\*****\*****^****\*****^****^****^****^** |
| В**^****\*****\*****^****^****^****^****^**60 +7 +14 +21 |  60 +7 +14 +21Г**^****\*****^****\*****^****\*****^****\*****#****#****#****#** |
| Д**\*****\*****^****\*****\*****\*****^****\*****\*****\*****^** 60 +7 +14 +21 | Е**^** 60 +7 +14 +21 |
| ЗЖ**^****\*****^****\*****^****\*****^****\*****\*****^****\*****^****\*** 60 +7 +14 +21 | **^****\*****^****\*****^****^****\*****\*****^****\*** 60 +7 +14 +21 |
|  - контроль экстракт карсил - на оси ординат - уровень интактных животных | \* - достоверно по отношению к исходному контролю;**^** - достоверно по отношению к интактным животным;# - достоверно по отношению к контролю 1 |

**Рисунок 5**-Влияние лечебного применения СЭ на НАДФН-GSH-зависимую систему печени крыс при хронической алкоголизации

На гистоморфологической картине печени контрольных животных выявлялись определенные патологические изменения, наиболее выраженные на 7-ой и 14-ый день дополнительного поения, но на 21 день эти изменения оказывались минимальными. Наличие восстановительных процессов нашло отражение и в изменении биохимических показателей состояния печени (снижение активности АлАт, некоторое снижение содержания ТРГ), но большинство показателей все же оставалось достоверно более высоким, чем в норме и, кроме того, нарастали явления фиброгенеза - увеличивалось содержание в печени ОП (+48%) и в сыворотке крови - ГАГ (+61%.

В отношении восстановления биохимических показателей лечебное действие СЭ оказалось более эффективным, чем карсила. При применении СЭ тормозилось образование элементов соединительной ткани: содержание ОП во все сроки лечения достоверно не отличалось от нормы, а содержание ГАГ в крови достоверно снижалось на 26% по сравнению с соответствующим контролем. Уменьшались и патогистологические изменения в печени: отмечалось уменьшение клеточной инфильтрации, отсутствовало фиброзирование портальных трактов, которое выявлялось в контроле на 14-ые сутки дополнительного введения этанола, а также признаки дистрофических изменений и сохранялось лишь умеренное расширение портальных вен и синусоидов.

Влияние СЭ на процесс фиброгенеза изучено также при хроническом СС14-гепатите, при котором было установлено четкое повышение количества ОП в печени по сравнению с нормальными значениями на 82% и ГАГ в крови - на 63%. На гистоморфологической картине также обнаруживалось замещение поврежденных гепатоцитов соединительнотканными тяжами.

В течение трех недель после воспроизведения модели хронического гепатита у нелеченных животных в печени достоверно повышался уровень ОП по сравнению с исходным контролем на 14 и 21 день на 48% и 63% соответственно, а содержание в сыворотке крови ГАГ на 39% и 44% соответственно, хотя темпы нарастания этих компонентов соединительной ткани несколько снижались.

Лечение хронического гепатита карсилом и СЭ препятствовало накоплению компонентов соединительной ткани на протяжении всего срока наблюдения. Но у животных, получавших карсил, к концу лечения на 21 сутки сохранялось повышенное количество ОП в гомогенате печени (+25%).

Через два месяца после лечения сухим экстрактом сохранялся стойкий лечебный эффект, полученный после окончания терапии - все основные биохимические показатели, характеризующие процессы цитолиза, холестаза, жирового перерождения, находились на уровне нормы, и отсутствовал процесс фиброгенеза. В группе животных, получавших карсил, сохранялись повышенными концентрация конъюгированного билирубина и активность ЩФ в сыворотке крови.

Довольно часто гепатопротекторная активность флавоноидов сочетается с желчегонным эффектом, что вносит определенный вклад в защиту печени. Нами установлено активирующее влияние СЭ на желчеобразовательную функции печени у здоровых животных и животных с поражением печени. В условиях острого СС14-гепатоза СЭ оказал нормализующие, более выраженное, чем у карсила, влияние на процессы образования и выделения желчи: увеличился объем желчи, увеличились содержание в желчи ЖК и холато-холестериновый коэффициент. У животных, леченных карсилом, концентрация ЖК не достигала уровня здоровых животных.

## Общие выводы

1. Исследуемые флавоноиды и СЭ из V. abbreviate (truncatula) оказывают выраженное гепатопротекторное действие при поражении печени СС14 и длительной алкоголизации, уменьшая синдромы цитолиза, холестаза, мезенхимального воспаления, жировой дистрофии и печеночной недостаточности, вызванные развитием окислительного стресса.

2. На модели острого поражения печени СС14 у крыс установлено, что эффективной дозой гесперидина, диосмина, флавицина, кверцетина и карсила является доза 100 мг/кг, а СЭ- 300 мг/кг при испытании их в качестве гепатопротекторов.

3. Исследуемые вещества при лечебно-профилактическом введении в эффективных дозах в разной степени воздействуют на развитие основных патологических синдромов при СС14-гепатитогепатозе. В отношении устранения синдрома цитолиза флавицин, кверцетин и карсил проявляют более эффективное действие, чем гесперидин и диосмин. Но гесперидин, диосмин и флавицин превосходят кверцетин и карсил по влиянию на холестаз. Активацию мезенхимы кверцетин и карсил предупреждают более эффективно, чем флавицин, диосмин и гесперидин. Но флавицин и диосмин превышают действие кверцетина, карсила и гесперидина по влиянию на развитие синдрома печеночно-клеточной недостаточности. СЭ практически полностью нормализует все изученные показатели.

4. На фоне алкогольной интоксикации наибольшая эффективность лечебно-профилактического действия отмечается у флавицина и СЭ, которые практически полностью устраняют признаки поражения печени, а введение гесперидина в наименьшей мере нормализует показатели всех патологических синдромов, наблюдающихся при остром поражении этанолом. Как и при СС14-гепатитогепатозе, кверцетин и карсил превышают действие диосмина на цитолиз и мезенхимальное воспаление и дополнительно на белково-синтетическую функцию печени, но диосмин является более эффективным по воздействию на холестаз и метаболическую функцию печени (углеводный и липидный обмены), чем кверцетин и карсил.

5. При острых СС14 - и алкогольном поражениях печени самые высокие и близкие коэффициенты гепатопротекции имеют СЭ (95% и 97%) и флавицин (92% и 96%), а наименьший - гесперидин (65% и 38%). При СС14-гепатитогепатозе флавицин и СЭ достоверно превышают в 1,5 - 1,6 раза эффективность действия карсила (61%) и в 1, 2 раза - кверцетина (77%). При поражении печени этанолом флавицин и СЭ достоверно превышают эффективность действия и карсила (69%) и кверцетина (70%) в 1,4 раза. Действие флавицина и СЭ сходно как в качественном, так и количественном отношении.

6. Гистоморфологические исследования подтверждают наличие более выраженной гепатозащитной активности флавицина и СЭ по сравнению с карсилом при СС14-гепатитогепатозе и при алкогольном поражении печени, при введении которых признаки воспаления, нарушения микроциркуляции и жировой дистрофии, некрозы и нарушение цитоархитектоники печеночных балок, выражены в меньшей степени, чем у животных, получавших карсил.

7. Гесперидин, диосмин и флавицин обладают антиоксидантным действием in vitro, подавляя интенсивность Fe2+-индуцированного ПОЛ липосом в модельной системе, и по эффективности действия значительно уступают кверцетину: IС50 равно соответственно 7,0⋅10-2М, 4,9⋅10-2М, 4,9⋅10-3М и 6,3⋅10-5М.

8. При лечебно-профилактическом введении in vivo при острых токсических поражениях печени СС14 и этанолом индивидуальные флавоноиды, а также СЭ и карсил отличаются по влиянию на ферментативное звено АОЗ. Флавицин и СЭ способствуют нормализации практически всех показателей АОС, стимулируя активности ферментов, участвующих в регенерации НАДФН2 (ИЦДГ, Г-6-ФДГ, ГР). Диосмин в меньшей степени влияет на восстановление НАДФ+-редуктазной активности при обеих патологиях. Гесперидин, кверцетин и карсил не оказывают влияния не только на определенные звенья регенерации восстановительных эквивалентов (ИЦДГ, или МДГ, или Г-6-ФДГ, или ГР), но и ферменты, обеспечивающие детоксикацию перекисных продуктов (СОД, каталаза, ГП и Г-S-ТР).

9. По восстановлению равновесия в системе ПОЛ-АОС наибольшей эффективностью обладают флавицин и СЭ при обеих патологиях (коэффициент окислительного стресса близок к 1), которые хотя и в меньшей степени, чем кверцетин подавляют ПОЛ, но в большей степени способствуют сохранению активности антиоксидантных ферментов печени.

10. Установлена тесная обратная корреляция между коэффициентом окислительного стресса и процентом гепатопротекции, что указывает на первостепенное значение восстановления равновесия в системе про-антиоксиданты для защиты печени против действия токсических факторов. В его восстановлении важное значение имеет поддержание активности эндогенной ферментативной системы АОЗ.

11. Курсовое введение гесперидина, диосмина, флавицина и карсила здоровым животным в дозе 100 мг/кг приводит к некоторому снижению вторичных продуктов ПОЛ в крови и активности СОД, каталазы, и ГП в печени, но оказывает стимулирующее влияние на глутатионовую систему печени, повышая содержание GSH и активируя ферменты, участвующие в регенерации GSH (ГР и НАДФ+-редуктаза) и выполнении им защитных функций (Г-S-Т).

12. Исследуемые вещества улучшают энергообеспеченность клеток печени, увеличивают содержание АТФ, повышают N-деметилазную и n-гидроксилазную активностей в норме и в условиях острых поражений печени СС14 и этанолом.

13. При помощи метода ЭПР и косвенным путем показано, что гесперидин, диосмин, флавицин и кверцетин увеличивают содержание NO в норме, вероятно, через активирование eNOS и ограничивают гиперпродукцию NO, стимулированную СС14, а также обладают эндотелий протективным действием и повышают образование NO, сниженное в условиях моделирования эндотелиальной дисфункции. Фармакологическая модуляция синтеза NO флавоноидами может иметь существенное значение в проявлении ими гепатозащитных свойств.

14. СЭ из V. abbreviate (truncatula) в дозе 300 мг/кг обладает выраженным лечебным действием при поражении печени СС14 и этанолом, усиливая адаптационно-приспособительную реакцию, восстанавливая про-антиоксидантное равновесие, энергообмен, строение, метаболизм и функции печени, замедляя процесс фиброзирования, усиливая желчеобразовательную функцию печени в норме и в условиях патологии. По своей эффективности СЭ превышает действие карсила.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Влияние флавоноидов растительного происхождения на перекисное окисление липидов // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: Материалы Междунар. съезда (4; 29 июня-1 июля 2000; Великий Новгород). - СПб., 2000. - С.155 - 157. (Соавт. Оганесян Э.Т., Хочава М.Р., Мальцев Ю. А).
2. Исследование защитного действия суммы флавоноидов из кожуры цитрусовых при остром токсическом поражении печени СС14 // Человек и лекарство: Тез. докл.8 Рос. нац. конгресса 2-6 апреля 2001 г. - М., 2001. - С.561. (Соавт. Хочава М.Р., Оганесян Э.Т., Фролова Л.М., Парфентьева Е.П., Москаленко С.В., Саджая Л.А., Репс В.Ф., Скульте И.В., Андреева О.А., Бобылев О. В).
3. Антиоксидантные и гепатозащитные свойства флавоноидов цитрусовых // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: Материалы Рос. конф. молодых ученых России с междунар. участием (2; 24-28 апреля 2001; Москва). - М., 2001. - Т.2. - С.250. (Соавт. Хочава М.Р., Оганесян Э. Т).
4. Сравнительное изучение гепатозащитного действия индивидуальных и суммарных флавоноидов из кожуры цитрусовых // Регион. конф. по фармации, фармакологии и подготовке кадров (56; 2001; Пятигорск): Материалы… - Пятигорск: ПятГФА, 2001. - С.189 - 191. (Соавт. Хочава М.Р., Оганесян Э.Т., Василенко Ю.К., Фролова Л.М., Парфентьева Е.П., Репс В.Ф., Москаленко С.В., Саджая Л.А., Скульте И.В., Андреева О.А., Бобылев О. В).
5. Исследование защитного действия гесперидина и его сочетанного применения с аминокислотами при остром токсическом поражении печени тетрахлорметаном // Регион. конф. по фармации, фармакологии и подготовке кадров (56; 2001; Пятигорск): Материалы… - Пятигорск: ПятГФА, 2001. - С. 192 - 194. (Соавт. Хочава М.Р., Оганесян Э.Т., Василенко Ю.К., Фролова Л.М., Парфентьева Е.П., Репс В.Ф., Москаленко С.В., Саджая Л.А., Скульте И.В., Бобылев О. В).
6. Выделение гесперидина и суммарной флавоноидной фракции из отходов цитрусовых и экспериментальное изучение их использования в качестве гепатозащитных средств // Пятигорск: ПятГФА, 2002. -31с. деп. в ВИНИТИ 11.07.9.2002, № 1308-В2002. Анн.: Библ. указ.: Деп. научные работы. - 2002. - № 9 (367). - с.8 (реф.72). (Соавт. Оганесян Э.Т., Хочава М.Р., Андреева О.А., Василенко Ю.К., Парфентьева Е.П., Скульте И.В., Саджая Л.А., Москаленко С.В., Постникова Н.В., Ващенко Т. Н).
7. Изучение гепатозащитного действия флавоноидных соединений из растений рода Вика Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении: Материалы конгр с междунар. участием (4; апрель 2002; Средиземноморье). - М., 2002. - № 2-3. (информация получена с сайта) (Соавт. Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Шаренко О.М., Терехов А. Ю).
8. Использование квантово-химических методов для обоснования антирадикального (ОН·) действия полигидроксихалконов // Хим. - фармац. журнал. - 2002. - Т.36, № 12. - С.21 - 25. (Соавт. Оганесян Э.Т., Хочава М.Р., Тускаев В.А., Мальцев Ю. А).
9. Сравнительное изучение эффективности гепатозащитного действия флавона диосмина и флавонона гесперидина при отдельном и сочетанном применении у крыс с ССl 4-гепатозом // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск: ГФА. - Пятигорск, 2004. - Вып.59. - С.266-268. (Соавт. Агаджанян З.С., Паукова Е.О., Шаренко О.М., Андреева О.А., Оганесян Э. Т).
10. Изучение влияния гликозидов диосметина и гесперидина на микросомальное окисление в норме и при с ССl4-гепатозе у крыс. гепатозом // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск: ГФА. - Пятигорск, 2004. - Вып.59. - С.270-271. (Соавт. Саджая Л.А., Биляч Я.И. Ващенко Е. С).
11. Изучение влияния растительных флавоноидов на показатели энергетического обмена при остром ССl 4-гепатозе // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы междунар. съезда: "Фитофарм 2004" (8; 21-23 июня 2004; Миккели, Финляндия). СПб.: ВВМ, 2004. - С.173-176. (Соавт. Андреева О.А., Шаренко О.М., Паукова Е.О., Агаджанян З.С., Биляч Я.И., Ващенко Е.С., Агаджанян В. С).
12. Гепатозащитное действие флавоноидов вики изменчивой и вики обрубленной // Фармация. - 2004. - № 4. - С.41 - 42. (Соавт. Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Шаренко О.М., Терехов А. Ю).
13. Гепатозащитное действие цветков бархатцев // Фармация. - 2004. - № 2. - С.33-35. (Соавт. Терехов А.Ю., Оганесян Э.Т., Андреева О.А. и др.).
14. О биологически активных веществах некоторых представителей рода Vicia // Современные наукоёмкие технологии: сб. науч. тр. - М., 2004. - №6. - С.108-109. (Соавт. Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Шаренко О.М. и др.).
15. Изучение гепатозащитного действия природных флавоноидных соединений // Эксперим. и клинич. фармакология. - 2004. - Т.67, №6. - С.41 - 45.
16. Изучение эффективности гепатозащитного действия флавицина и СЭ из вики обрубленной (Vicia truncatula Fish ex Bieb) на модели острого тетрахлорметанового гепатоза у крыс. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск: ГФА. - Пятигорск, 2005. - Вып.60. - С.330-333. (Соавт. Агаджанян З.С., Паукова Е.О., Шаренко О.М., Андреева О.А., Скульте И.В., Биляч Я.И., Ващенко Е.С., Агаджанян В. С).
17. Защитное действие флавоноидных антиоксидантов кверцетина, гесперидина, диосмина и флавицина при тетрахлорметановом индуцированном оксидативном стрессе в печени крыс. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск: ГФА. - Пятигорск, 2005. - Вып.60. -С.333-336. (Соавт. Паукова Е.О., Агаджанян З.С., Парфентьева Е.П., Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Шаренко О. М).
18. Антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие природных флавоноидов при остром экспериментальном тетрахлорметановом гепатозе. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск: ГФА. - Пятигорск, 2005. - Вып.60. - С.336-338. (Соавт. Паукова Е.О., Агаджанян З.С., Саджая Л.А., Павлова Л. М).
19. Влияние антиоксидантов флавоноидной природы на перекисное и митохондриальное окисление и антиоксидантный статус у крыс при остром CCl4-гепатозе // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы Междунар. съезда "Фитофарм 2005" и Конф. молодых ученых Европ. фитохим. общества "Растения и Здоровье" (9; 22-25 июня 2005; Санкт-Петербург). - СПб.: НИИХ СПбГУ, 2005. - С.77-80. (Соавт. Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Шаренко О.М., Паукова Е.О., Андреева О.А., Оганесян Э. Т).
20. Кверцетин и гесперидин подавляют образование радикалов оксида азота в печени и сердце крыс в условиях острого гепатоза // Биофизика. - 2005. - Т.50, №6. - С.1145 - 1149. (Соавт. Тимошин А.А., Паукова Е.О., Ванин А. Ф).
21. Использование растительных экстрактов для устранения синдрома холестаза при экспериментальном поражении печени // Известия высших учебных заведений. Сев. - Кавк. регион. Гастроэнтерология. Естествен. науки. - Спецвыпуск. - 2005. - С.86 - 87. (Соавт. Терехов А.Ю., Паукова Е.О., Шаренко О.М., Андреева О.А., Саджая Л. А).
22. Гепатозащитное действие ангиопротекторов флавоноидной природы // Гепатология сегодня: материалы Десятой Рос. конф.28-30 марта 2005, Москва/ Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2005. - Т.15. - №1. - Приложение №24. - С.100. (Соавт. Паукова Е.О., Шаренко О.М., Андреева О. А).
23. Кверцетин и гесперидин подавляют продукцию NO-радикалов в условиях строго СCl4-гепатоза // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: сб. тр. нац. науч. - практ. конф. с междунар. участием (4; 26-30 сент. 2005; Смоленск). - Смоленск, 2005. - С.172-174. (Соавт. Тимошин.А.А., Паукова Е.О., Ванин А. Ф).
24. Амброзия полыннолистная - источник фармакологически активных соединений. Сообщение 2 // Хим. - фарм. журнал. - 2006. - Т.40, №11ю - С.46 - 51. (Соавт. Пархоменко А.Ю., Оганесян Э.Т., Андреева О.А., Паукова Е.О. и др.).
25. Влияние биофлавоноидов на про-/антиоксидантное равновесие при остром алкогольном отравлении // Гепатология сегодня: материалы Одиннадцатой Рос. конф.27-29 марта 2006, Москва/ Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2006. - Т.16. - №1. - Приложение №27. - С.68. (Соавт. Сергеева Е.О., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Шаренко О. М).
26. Влияние биофлавоноидов на микросомальное и митохондриальное окисление при CCl4 -гепатозе // Человек и лекарство: тез. докл.13 Рос. нац. конгр.3-7 апр. 2006 г. - М., 2006. - С.520-521. (Соавт. Оганесян Э.Т., Сергеева Е.О., Шаренко О.М., Андреева О.А., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Скульте Л. А).
27. Фитохимическое изучение состава надземной части растений вики изменчивой (Vicia variabilis Freyn et Sint) и вики Гроссгейма (Vica Grossheimii Freyn et Sint) // Человек и лекарство: тез. докл.13 Рос. нац. конгр.3-7 апр. 2006 г. - М., 2006. - С.609. (Соавт. Шаренко О.М., Андреева О.А., Крикова А.В., Сергеева Е. О., Самойленко Е. С).
28. Мембраностабилизирующее действие биофлавоноидов при остром алкогольном отравлении у крыс // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. -Вып.61. -Пятигорск: ПятГФА, 2006. - С.382-383. (Соавт. Сергеева Е.О., Саджая Л.А., Павлова Л. М).
29. Изменение некоторых биохимических показателей у крыс при остром алкогольном отравлении и действии биофлавоноидов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. -Вып.61. -Пятигорск: ПятГФА, 2006. - С.347-349. (Соавт. Сергеева Е.О., Оганесян Э.Т., Парфентьева Е.П., Скульте И.В., Ващенко Е.С., Биляч Я. И, Шаренко О.М., Андреева О. А).
30. Влияние гесперидина на уровень оксида азота (NO) в организме крыс в норме и при остром поражении печени тетрахлорметаном // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Седьмой съезд Белорус. общественного объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 21-23 июня 2006 г.: сборник статей. - Мн.: ИООО "Право и экономика", 2006. - Т.2. - С.261-263. (Соавт. Тимошин А.А., Сергеева Е.О., Ванин А.Ф., Оганесян Э. Т).
31. Изучение механизмов гепатозащитного действия биофлавоноидов при остром алкогольном отравлении у крыс // Украiнськ. бiохiм. з′iзд. (9; 24-27 животня 2006; Харькiв): матерiали… - Харькiв, 2006. - Т.2. - С.50. (Соавт. Парфентьева Е.П., Саджая Л. А).
32. Влияние гесперидина и флавицина на печеночный кровоток в норме и в условиях стимуляции и блокады синтеза эндогенного оксида азота // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2006. - Т.5, №. - С.84 - 87. (Соавт. Тюренков И.Н., Воронков А. В).
33. Изучение биохимических основ защитного действия флавоноидов при экспериментальном поражении печени // Отчет НИР. (Соавт. Василенко Ю.К., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Скульте И.В., Мазурина М.В., Паукова Е. О).
34. Коррекция биофлавоноидами биохимических показателей печени при остром алкогольном отравлении у крыс // Гепатология сегодня: материалы Двенадцатой Рос. конф. 19-21 марта 2007, Москва/ Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2007. - Т.17. - №1. - Приложение №29. - С.64. (Соавт. Сергеева Е.О., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Скульте Л.А., Оганесян Э.Т., Шаренко О.М., Андреева О.А., Духанина И. В)
35. Влияние биофлавоноидов на перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы печени крыс при остром алкогольном отравлении // Вестник ВГМУ. - Т.23, №3. - 2007. - С.50-52. (Соавт. Сергеева Е.О., Оганесян Э.Т., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Терехов А.Ю., Скульте И.В., Шаренко О.М., Андреева О.А., Духанина И. В).
36. Влияние флавоноидов на перекисное окисление липидов и антиоксидантные ферменты в печени крыс // Фармация из века в век. Часть V. Синтез биологически активных веществ для создания фармацевтических субстанций. Фармаколог. исследования: Труды научн. - практ. конф. - Снкт-Петербург, 2008. - С.67 - 71. (Соавт. Сергеева Е.О., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Терехов А.Ю., Скульте И. В).
37. Изучение влияния биофлавоноидов на показатели энергетического обмена при курсовой алкоголизации у крыс // Гепатология сегодня: материалы Тринадцатой Рос. конф.17-19 марта 2008, Москва / Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2008. - Т.18. - №1. - Приложение № 31. - С.54. (Соавт. Сергеева Е.О., Терехов А.Ю., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Скульте И. В).
38. Изучение гепатозащитного действия СЭ из вики обрубленной (Vicia truncatula Fish ex Bieb) при остром тетрахлорметановом гепатозе у крыс // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. -Вып.63. -Пятигорск: ПятГФА, 2008. - С.409-412. (Соавт. Сергеева Е.О., Саджая Л.А., Парфентьева Е.П., Терехов А.Ю., Скульте И.В., Андреева О.А., Шаренко О. М)
39. Изучение влияния флавоноидов на систему детоксикации ксенобиотиков в норме и при токсических поражениях печени у крыс // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. - Вып.63. -Пятигорск: ПятГФА, 2008. - С.412-414. (Соавт. Сергеева Е.О., Саджая Л.А., Шаренко О.М., Андреева О. А).
40. Изучение влияния флавоноидов на системы детоксикации ксенобиотиков при курсовой алкоголизации у крыс // Гепатология сегодня: материалы Четырнадцатой Рос. конф.16-18 марта 2009, Москва / Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. - 2009. - Т. 19. - №1. - Приложение № 33. - С.74. (Соавт. Сергеева Е.О., Терехов А.Ю., Парфентьева Е.П., Саджая Л.А., Скульте И. В).
41. Влияние флавицина на механизмы, участвующие в развитии окислительного стресса при курсовом введении здоровым животным // Разработка, исследование и маркетинг новой фармац. продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск. ГФА. -Вып.64. -Пятигорск: ПятГФА, 2009. - С.418-421. (Соавт. Сергеева Е.О., Терехов А.Ю., Саджая Л.А., Парфентьева Е.П., Скульте И.В., Духанина И. В).
42. Изучение влияния гесперидина на эндотелиальную функцию животных с экспериментально вызванным сахарным диабетом // Бюлл. Волгогр. научного центра РАМН. - 2009. - №1. - С. 19-22. (Соавт. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Слиецанс А.А., Доркина Е. Г).