

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Советова Бақытбека Советұлы
на тему: «Влияние β_1 -адреноблокаторов и метаболитов пуриновых
нуклеотидов на иммунный статус, активность ферментов пуринового цикла
и антиоксидантной системы при симпатической гиперактивации»
на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D110100 – Медицина

Актуальность темы исследования

В настоящее время в кардиологии для разработки адекватных методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний весьма актуальным является установление механизмов нарушения адаптационных процессов наблюдаемых при симпатической гиперактивации. Как показывают многие исследования, ишемия миокарда сопровождается значительным увеличением содержания адреналина в сердце. В зоне ишемии миокарда его концентрация повышается более чем в 1,5-2 раза по сравнению с фоновыми данными; в отдаленных от нее участках сердца – в 1,4-1,6 раза. Одновременно с этим наблюдается прогрессирующее снижение содержания адреналина в надпочечниках. Это свидетельствует в основном о надпочечниковом происхождении адреналина в мышцах сердца [Макарова Н.А., 2013].

Исследования последних десятилетий показывают, что адреналин является мощным активатором перекисного окисления липидов в миокарде [Rahman W, et al., 2016; Чинкин А.С., 2014].

Однако, накопление адреналина в сердце, с одной стороны, потенцирует процесс перекисного окисления липидов, тогда как с другой подавляет активность антиоксидантных ферментов. Известно, что катехоламины способствуют усилению перекисного окисления липидов, приводящее к увеличению расхода АТФ. Последнее приводит к накоплению продуктов его гидролиза – ксантина. В свою очередь, метаболизм ксантина сопровождается образованием активных форм кислорода [Карпищенко А.И., 2013].

Согласно литературным данным, активация симпатoadреналовой системы усугубляет течение ишемической болезни сердца. Повышение уровня катехоламинов служит фактором риска развития повторного инфаркта миокарда и синдрома внезапной смерти. Наиболее частым проявлением симпатической гиперактивации являются синусовая тахикардия, функциональная экстрасистолия, кардиалгии, эпизодические повышения артериального давления, гипергидроз и другие вегетативные расстройства. В кардиологической практике, в целях купирования вышеперечисленных симптомов, предпочитают применение кардиоселективных β -адреноблокаторов, не обладающих внутренней симпатомиметической активностью. Таким требованиям, в первую очередь, отвечает метопролол [Mittal N, et al., 2017].

Метопролол, блокируя в невысоких дозах β_1 -адренорецепторы сердца, уменьшает стимулированное катехоламинами образование циклического аденозинмонофосфата (3'5'АМФ) из аденозинтрифосфата (АТФ), и как

результат снижается внутриклеточный ток ионов Ca^{2+} . В результате, метопролол рекомендован как препарат выбора в лечении ишемической болезни сердца и нарушениях сердечного ритма [Morris J, et al., 2020].

По своей природе, симпатическая гиперактивация сопровождается усиленным образованием продуктов не ферментативного окисления адреналина, которые ускоряют использование клетками АТФ, способствуя увеличению уровня аденозинмонофосфата (АМФ) и аденозина (АД) в организме человека.

Многочисленными исследованиями показана важность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов в формировании механизмов общего адаптационного синдрома и некоторых функций иммунной системы. Установлена взаимосвязь активности ферментов пуриновых нуклеотидов с функцией лимфоцитов, ответственных за клеточный и гуморальный иммунитет, а дисбаланс активности этих ферментов приводит к дисфункции иммунокомпетентных клеток и к последующему развитию иммунодефицита в организме человека [Тапбергенов С.О., и др., 2009].

Эти данные показывают, что контроль метаболизма и физиологической активности всех клеток организма осуществляется с помощью сложно организованного специфического многофункционального ансамбля. Анализ литературных источников позволяет заключить, что для более осмысленного использования аденозина и его аналогов в клинической практике необходимо более детальное сравнительное изучение влияния адреналина, аденозина, АМФ и β 1-адреноблокатора метопролола на систему антиоксидантной защиты, на ферменты метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунный статус.

Цель диссертационного исследования: Изучить влияние метаболитов пуриновых нуклеотидов (АМФ и аденозина) и селективного β 1-адреноблокатора метопролола на иммунный статус и на активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и антиоксидантной системы в плазме крови и в клетках сердца и печени в норме и при симпатической гиперактивации.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние симпатической гиперактивности, вызванной введением адреналина, на систему антиоксидантной защиты, активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунную систему.

2. Определить особенности метаболических эффектов аденозина и АМФ, β 1-адреноблокатора метопролола, на иммунную систему, ферменты обмена пуриновых нуклеотидов и систему антиоксидантной защиты.

3. Дать сравнительную оценку особенностей метаболических эффектов аденозина и АМФ, β 1-адреноблокатора метопролола при симпатической гиперактивности.

4. Изучить возможность применения комплекса аденозина и АМФ для коррекции изменений активности системы антиоксидантной защиты, ферментов пуринового метаболизма и иммунного статуса, наблюдаемых при симпатической гиперактивности.

Методы исследования

Основные методы исследования: Активность глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО) определяли по методу С.Н. Власовой и соавторов. Использовались биохимические методы исследования. Количество белка определяли методом Lowry. Количество фосфорной кислоты рассчитывали по калибровочному графику. Активность аденозинмонофосфатдезаминазы (АМФ-дезаминаза) и аденозиндезаминазы определяли по методу С.О. Тапбергенова. Определение количества МДА проводили по методу Uchiyama M., Mihara M., диеновых конъюгатов по методу В.Б. Гаврилова и соавторов.

Для оценки иммунологического статуса в периферической крови подсчитывали общее количество лейкоцитов и лимфоцитов. Количество клеток CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием FITC конъюгированных моноклональных антител.

Реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) определяли по методу Clausen J.E. НСТ-тест проводили по методу Б.С. Нагоева, М.Г. Шубич.

Объект исследования - 190 белые крысы-самцы в возрасте 3-3,5 месяцев, массой тела 225 (95% ДИ: 203-238) граммов.

Предмет исследования - гомогенаты из печени и сердца экспериментальных животных исследуемых групп. Для оценки иммунологического статуса и биохимических исследований использовали периферическую кровь экспериментальных животных.

Исследование было проведено на 190 белых крысах-самцах в возрасте 3–3,5 месяцев с массой тела 225 (95% СА: 203–238) граммов. Экспериментальные животные находились в одинаковых условиях содержания вивария Центра Научно-Исследовательской Лаборатории Некоммерческого акционерного общества «Медицинский университет Семей», в соответствии основным лечебно-питательным режимом. Проведение эксперимент одобрено этическим комитетом Государственного Медицинского Университета г. Семей в соответствии с Директивой Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях (№ 6.1 протокол 14.02.2020г.).

Эксперимент были разделены на 3 серии: 1 серия – интактные животные 1-ая группа (контроль); интактным животным 2-ой группы вводили 0,1 мг АМФ в течение 10 дней (общая доза 1 мг); интактным животным 3-ей группы вводили 0,1 мг аденозина в течение 10 дней (общая доза 1 мг); интактным животным 4-ой группы вводили адреналин внутривенно в дозе 4 мг / кг за 60 минут до исследования; 2 серия – интактные животные 1-ой группы (контроль); интактным животным 2-ой группы вводили адреналин внутривенно в дозе 4 мг / кг за 60 минут до исследования; 3-ей группе животных вводили АМФ и аденозин в дозе 0,1 мг (общая доза 1 мг), 4-ой группе адреналин вводили в течение 10 дней и на последний день эксперимента внутривенно в дозе 4мг/кг за 60 минут до исследования. 3

серия - интактные животные 1-ой группы (контроль); интактным животным 2-ой группы вводили адреналин внутривенно в дозе 4 мг / кг за 60 минут до исследования; интактным животным 3-ей группы вводили метопролол per os в дозе 25 мг/кг в течение 2 дней, На следующий день вводили внутривенно адреналин в дозе 4 мг/кг за 60 минут до исследования.

Гомогенаты получали из печени и сердца экспериментальных животных исследуемых групп.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Адреналин в дозе 4 мг/кг позволяет изучить влияние у экспериментальных животных симпатической гиперактивации на систему антиоксидантной защиты, активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунную систему.

2. Применение комплекса АМФ и Аденозин, β 1-адреноблокатора (Метопролол) характеризуется снижением процессов пероксидации, снижением активности ферментов антиоксидантной защиты, ухудшением в состоянии иммунного статуса и изменениями в активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов. Эффекты, вызванные введением АМФ и Аденозина в сердце и печени характеризуются направленностью на сохранение системы антиоксидантной защиты и обеспечения равновесия системы окислительного гомеостаза.

3. АМФ и аденозин, как β 1-блокатор метопролол может использоваться для коррекции дисфункции антиоксидантной защиты и ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов, наблюдаемой при гиперadreналиемии и окислительном стрессе различного происхождения.

4. При симпатической гиперактивации и окислительных стрессах различного генеза, использование комплекса АМФ и Аденозин, позволяет обеспечить коррекцию дисфункций антиоксидантной защиты и ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов.

Описание основных результатов исследования

1. Симпатическая гиперактивность, вызванная введением адреналина в дозе 4 мг/кг в течение 60 мин в сердце с активацией АД, АМРД, каталазы, повышением уровня МДА, снижением активности 5'Н и соотношения АД+АМРД/5'Н. Активность фермента /5'Н в сторону усиления дезаминирования аденозина и АМФ характеризуется повышением.

Введение адреналина в печень повышало уровень МДА ($p=0,05$) и ДК ($p=0,05$), активацию каталазы ($p=0,05$) и ферментов пуринового обмена АД, АМФД и 5'Н ($p=0,05$). причины. При симпатической гиперактивности в крови наблюдаются сдвиги, близкие к состоянию окислительного стресса, что обусловлено активацией ГПО ($p=0,05$), каталазы ($p=0,05$) и ферментов обмена пуриновых нуклеотидов АД, АМРД, 5'Н ($p=0,05$), Характеризуется повышением уровня МДА ($p=0,05$) и ПК ($p=0,05$), усиливается функциональная взаимосвязь Т- и В-звеньев иммунитета.

2. Действие АМР и аденозина в дозе 1000 мкг на интактных животных направлено на поддержание системы антиоксидантной защиты и

поддержание баланса системы оксидантного гомеостаза. В частности, в сердце снижается активность ГР ($p=0,05$), ГПО ($p=0,05$), каталазы ($p=0,01$), снижается уровень МДА ($p=0,05$), возрастает активность АД и АМРД ($p=0,05$). Введение АМР и аденозина в печень приводит к снижению активности ГР ($p=0,05$), ГПО ($p=0,05$), ослаблению процесса образования МДА ($p=0,05$), повышению активности АД и АМРД ($p=0,01$). Уровень МДА ($p=0,05$), РТМЛ ($p=0,05$) и CD8+ ($p=0,05$) в крови снижается, отношение активности АД/ АМРД ($p=0,01$) увеличивается, функциональная взаимосвязь Т- и В-иммунитета усиливается.

Особенности метаболических эффектов β_1 -адреноблокатора метопролола определяли на интактных животных. Метопролол, вводимый интактным животным в дозе 25 мг/кг в течение двух суток, повышает уровень активности ферментов пуринового обмена АД ($p=0,05$), АМРД ($p=0,05$) и 5`Н ($p=0,05$) в крови, МДА ($p=0,05$) снижается и соответственно снижается активность ферментов антиоксидантной защиты (ГПО, каталазы) ($p=0,01$). В сердце метопролол снижает уровень ДК ($p=0,05$) и МДА ($p=0,05$) как интегрального показателя склонности к свободнорадикальному окислению и, соответственно, снижает активность ГПО и каталазы ($p=0,05$).

3. Адреналин в дозе 25 мг/кг ослабляет уровень выраженности реакции организма животных на окислительный стресс при введении адреналина. Блокатор β_1 -адренорецепторов метопролол может быть использован для коррекции дисфункции ферментов антиоксидантной защиты и метаболизма пуриновых нуклеотидов, наблюдаемой при гиперadreналиемии и различных оксидативных стрессах.

В частности, в сердце при гиперadreналиемии метопролол активизирует АД ($p=0,01$), АМРД ($p=0,01$) и 5`Н ($p=0,01$), МДА ($p=0,01$) и ДК ($p=0,01$) и впервые доказано, что также снижается активность ГР ($p=0,01$), ГПО и каталазы ($p=0,01$), что вызывает снижение процессов перекисного окисления в сердце.

При гиперadreналиемии в печени метопролол снижает количество МДА и ФХ ($p=0,01$), уменьшает реакцию окислительного стресса, вызванную адреналином, адекватно снижает активность ГПО и каталазы ($p=0,01$). В это время отмечается незначительное увеличение активности АД ($p=0,01$), АМРД ($p=0,01$) и отношения активности ферментов АД+ АМРД/5`Н ($p=0,01$) в сторону катаболизма аденозина.

При гиперadreналиемии снижение соотношения активности ферментов АД+ АМРД/5`Н направлено на поддержание необходимого уровня аденозина, который, как известно, оказывает антиаритмическое, сосудорасширяющее и другие эффекты на кардиомиоциты и гладкую мускулатуру сосудов.

4. Установлено, что аденозин и комплекс АМР могут быть использованы для коррекции изменений в системе антиоксидантной защиты, изменений ферментов пуринового обмена и активности иммунных реакций, наблюдаемых при гиперadreналиемии.

В частности, введение комплекса аденозина и АМФ при симпатической гиперактивности в комбинированной дозе 1000 мкг приводит к активации АД и АМФ ($p=0,01$) в сердце, увеличивается соотношение активностей $AD+AMPD/5'H$. в сторону катаболизма аденозина и АМП, МДА и ДК ($p=0,01$) и впервые установлено, что соответственно снижается активность ГР, ГПО и каталазы ($p=0,01$), что свидетельствует о снижении процессов перекисного окисления в этот орган.

При гипердреналинемии в печени комплекс аденозина и АМФ снижает уровень МДА и ДК ($p=0,01$) и, соответственно, активность ГПО и каталазы ($p=0,01$), снижая тем самым уровень окислительного стресса, вызванного адреналином.

Введение комплекса аденозина и АМФ при гипердреналинемии в крови повышает активность ферментов пуринового обмена АД, АМРD, 5'H и ГР ($p=0,01$), снижает активность ГПО, каталазы и МДА ($p=0,01$).

При симпатической гиперактивности $\beta 1$ -адреноблокатор, как и метопролол, снижает процессы перекисного окисления аденозина и АМФ, адекватно снижает активность ферментов антиоксидантной защиты и изменяет активность ферментов пуринового обмена.

Обоснование научной новизны

1. Впервые изучено влияние симпатической гиперактивности на систему антиоксидантной защиты, активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и иммунную систему: доказано усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета; изменения соответствующие состоянию окислительного стресса, что проявляется активацией ГПО, каталазы и ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов АД, АМРD, 5'H, увеличением уровня МДА и ДК.

2. Впервые проведен сравнительный анализ влияния метаболитов пуриновых нуклеотидов (АМФ и аденозина) и селективного $\beta 1$ -адреноблокатора (Метопролола) на иммунный статус, антиоксидантную систему, активность ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов в плазме крови, в миокардиоцитах и печени при симпатической гиперактивации.

3. Впервые обоснована возможность использования комплекс Аденозин и АМФ для коррекции изменений в системе антиоксидантной защиты, активности ферментов метаболизма пуринов и ответных иммунных реакций, наблюдаемых при гипердреналиемии и окислительном стрессе различного генеза.

Практическое значение полученных результатов

1. Определение в крови активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов АД, АМРD, 5'H и ферментов антиоксидантной защиты ГПО и каталазы может быть рекомендовано для диагностики заболеваний, сопровождающихся гипердреналиемией.

2. Для коррекции дисфункций антиоксидантной защиты организма и нарушений метаболизма пуриновых нуклеотидов, при выраженной симпатической гиперактивности и окислительном стрессе различного генеза,

наряду с β 1-адреноблокаторами рекомендовано использование комплекса аденозин и АМФ.

3. Результаты диссертации внедрены в научно-исследовательских лабораториях, а также в учебно-методический процесс кафедры биохимии и химических дисциплин, кафедры физиологических дисциплин для реализации образовательной программы бакалаврита по специальностям «Общая медицина», «Стоматология», «Фармация». Получено авторское свидетельство (№14613, 22.01.2021г.) на тему «Симпатикалық гиперактивация кезінде байқалған антиоксидантты қорғаныс жүйесінің, пуринді нуклеотидтер алмасуы ферменттерінің белсенділігі мен иммундық статусының өзгеруін түзету үшін аденозин мен АМФ кешенін қолдану мүмкіндігі»

Личный вклад докторанта Автор лично осуществил сбор материалов, статистическую обработку, систематизацию и научный анализ полученных результатов, а также формулировку выводов и основных положений, выносимых на защиту.

Выводы

1. При симпатической гиперактивации, вызванной введением адреналина и при введении АМФ и аденозина имеет место активация ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов и усиление функциональной взаимосвязи Т- и В-звеньев иммунитета.

2. Введение АМР и аденозина здоровым животным, в отличие от адреналина, не вызывает стрессорной реакции. Эффекты АМР и аденозина в сердце и печени направлены на сохранение системы антиоксидантной защиты и обеспечения равновесия системы окислительного гомеостаза.

3. Аденозин и АМФ, как β 1-адреноблокатор метопролол при симпатической гиперактивации, снижают процесс пероксидации и эквивалентно снижают активность ферментов антиоксидантной защиты, вызывают изменения в состоянии иммунного статуса и активности ферментов метаболизма пуриновых нуклеотидов.

4. Аденозин и АМФ могут использоваться для коррекции контролируемой антиоксидантной защиты, функций иммунной системы и метаболизма пуриновых нуклеотидов в случаях, связанных с выраженной симпатической гиперактивностью и окислительным стрессом различного происхождения.

Апробация результатов диссертации

Основные выводы работы обсуждены на XII-й международной научно-практической конференции «Экология. Радиация. Здоровье» имени Б. Атчабарова, посвященной 25-летию закрытия Семейского ядерного полигона (г. Семей, 28-29 августа 2016 г.).

Обсуждалось на VIII Международном конгрессе Физиологического общества Республики Казахстан Казахское физиологическое общество «Институт физиологии человека и животных» (Алматы, 2018 г.), и была опубликована статья в журнале «Физиология».

Публикации

Опубликовано 18 научных работ, в том числе 1 монография, 5 статьи в журнале, входящем в международную базу Scopus, из них 3 статьи в журнале «Биомедицинская химия», 1 статья в журнале «Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences» и 1 статья в журнале «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», 6 статьи в журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки Министерства образования и науки РК; 6 тезиса в материалах международных научно-практических конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация написана компьютерным текстом объемом 126 страниц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами исследования, выводами, практическими рекомендациями и списком использованной литературы. Библиографический список состоит из списка научных работ 142 отечественных и ближних и дальних авторов. Проиллюстрировано 28 таблицами.