УДК 615.272.4.03:616.36-02-02:615.2/.3.015.4

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА, АКТИВНОСТЬ АКОНИТАТГИДРАТАЗЫ И УРОВЕНЬ ЦИТРАТА У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА, ОСЛОЖНЕННЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ, ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЭПИФАМИНА НА ФОНЕ БАЗИСНОГО ЛЕЧЕНИЯ

С.С. Попов[1]*, А.Н. Пашков[1], А.А. Агарков[2], К.К. Шульгин[2]

[1]Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, 394036 Воронеж, ул. Студенческая, д. 10; тел.: 8(473)2530413;
эл. почта: popov-endo@mail.ru
[2]Воронежский государственный университет, 394036 Воронеж

Проведено исследование степени фрагментации ДНК, активностей каспазы-1 и каспазы-3, аконитатгидратазы (АГ) и содержания цитрата в крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа, осложненным стеатогепатитом, а также оценены данные показатели интенсивности апоптотических процессов и развития оксидативного стресса после проведения базисного лечения и комбинированной терапии, включающей эпифамин. При патологии выявлены фрагментация ДНК лейкоцитов крови, снижение активности АГ и возрастание каспазной активности в сыворотке больных. Применение эпифамина на фоне стандартного лечения способствовало более значительному изменению исследуемых показателей в сторону контрольных значений по сравнению с базисной терапией. Эпифамин оказывал также положительный эффект на содержание цитрата в сыворотке крови больных. Включение эпифамина в базисную терапию сопровождалось более значительными изменениями в сторону контроля активностей аминотрансфераз и других клинико-биохимических параметров. По-видимому, это было связано с коррекций уровня мелатонина под влиянием эпифамина и проявлением данным гормоном адаптогенных свойств и антиоксидантного эффекта действия.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, стеатогепатит, свободнорадикальное окисление, апоптоз, каспазы, аконитатгидратаза, цитрат, эпифамин.

DOI: 10.18097/PBMC20156103400

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что накопление липидов в гепатоцитах может быть следствием повышенного поступления свободных жирных кислот (СЖК) в печень [1]. Так, в организме больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2) с ожирением имеет место чрезмерное накопление СЖК, являющихся субстратами пероксидного окисления липидов (ПОЛ) [2]. Продукты ПОЛ стимулируют коллагенообразование, вызывают структурно-функциональные изменения в клеточных мембранах, митохондриях, что сопряжено с усилением продукции активных форм кислорода (АФК) и нарушением метаболизма в клетках печени [3]. Известно, что чрезмерная генерация АФК может быть взаимосвязана с возрастанием активности апоптотических процессов. Ключевые механизмы апоптоза сопряжены с функционированием каспаз – группой эволюционно консервативных цистеиновых протеиназ, которые осуществляют протеолиз белков, играющих важнейшую роль в инициации апоптоза. Активация каспаз является ключевым этапом в промежуточных и терминальных стадиях программируемой клеточной смерти. Каспазы реорганизуют цитоскелет, нарушают структуру, репликацию и репарацию ДНК, прерывают сплайсинг, разрывают ядерные структуры и дезинтегрируют клетки на апоптические тела. Ключевым звеном каскадных апоптотических процессов, как правило, является каспаза-3 [4]. Оценка активности каспазы-3 считается одним из основных методов определения уровня апоптоза [5]. Кроме того, важной характеристикой развития апоптотических процессов может служить также активность каспазы-1, способствующей активации ряда эффекторных каспаз, включая каспазу-3 [4]. При избыточной

* - адресат для переписки

активности свободнорадикального окисления (СО) биомолекул может происходить фрагментация ДНК, что выступает одним из важнейших критериев степени развития апоптоза. Особую роль в повреждении молекул ДНК играет гидроксильный радикал, негативно воздействующий на пуриновые и пиримидиновые основания, а также на остатки рибозы и дезоксирибозы [6]. К веществам-комплексонам, играющим роль хелаторов ионов металлов с переменной валентностью, относится цитрат, который способен элиминировать ионы Fe^{2+}, участвующие в образовании гидроксильного радикала из пероксида водорода в реакции Фентона [7]. Обратимую реакцию превращения цитрата в изоцитрат катализирует фермент – аконитатгидратаза (АГ; КФ 4.2.1.3), молекула которой легко разрушается АФК, что позволяет рассматривать данный фермент как чувствительную мишень действия свободных радикалов [8].

Имеются данные об антиоксидантных свойствах гормона эпифиза и экстрапинеальных тканей – мелатонина [9]. В некоторых работах указывается, что мелатонин обладает противоопухолевым, антистрессовым и антиоксидантным эффектами [10, 11]. В настоящей работе мы использовали на фоне проведения базисной терапии у больных СД 2 типа, осложнённым стеатогепатитом, эпифамин, который является пептидным биорегулятором, тропным к эпиталамо-эпифизарной области и способным обеспечивать коррекцию содержания мелатонина в организме.

В связи с этим, целью настоящей работы явилась оценка фрагментации ДНК лейкоцитов, активностей каспазы-1 и каспазы-3, аконитатгидратазы, концентрации цитрата и клинико-биохимических показателей в сыворотке крови больных со стеатогепатитом, развивающимся на фоне СД 2 типа, при проведении базисного лечения и комбинированной терапии с эпифамином.

МЕТОДИКА

В клиническое исследование был включён 61 человек с неалкогольным гепатитом, развивающимся вследствие СД 2 типа. Из них 20 мужчин (32,8%) и 41 женщина (67,2%). Возраст больных составлял от 45 до 80 лет: средний возраст – 62,5±17,5 года. Средняя продолжительность заболевания составляла 3,3±8,7 лет. Диагноз СД 2 типа, осложнённого неалкогольным стеатогепатитом, был поставлен на основании клинических признаков заболевания, биохимического исследования крови, данных ультразвукового исследования печени. Из сопутствующих заболеваний чаще всего регистрировались следующие: ожирение – 61 больной (100%), гипертоническая болезнь – 53 больных (86,8%), хроническая сердечная недостаточность – 38 больных (62,3%), хронический гастрит – 30 больных (49,2%).

Критериями исключения из исследования явились: вирусные гепатиты, злокачественные новообразования, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения.

Больные были разделены на 2 группы. Первая группа пациентов (33 человека) находилась на базисном лечении: сахароснижающая терапия (таблетированные препараты сульфонилмочевины и бигуаниды), гепатопротекторы: карсил (эквивалент силимарина 35 мг) по 2 таблетки 3 раза в день во время еды, эссливер форте (эссенциальные фосфолипиды 300 мг) по 2 таблетки 3 раза в день в течение 10 дней. Вторая группа пациентов (28 человек) дополнительно к базисной терапии получала эпифамин (ООО "Клиника Института биорегуляции и геронтологии", Санкт-Петербург, Россия; удостоверение качества и безопасности №103, регистрационное удостоверение №004471.Р.643.04.2003, биологически активная добавка) по 1 таблетке (10 мг) 3 раза в день за 10-15 мин до еды в течение 7 дней.

Контрольную группу составили 65 практически здоровых лиц с нормальными показателями общего и биохимического анализов крови.

В ходе клинического исследования использовали сыворотку крови больных, находившихся на лечении в стационаре. Кровь для исследования забирали в пробирки типа "вакутейнер" в утреннее время, натощак, из локтевой вены. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Определение активности каспаз-1 и -3 производили с помощью набора реактивов фирмы "Sigma" (США) "Caspase 1 Assay Kit, Colorimetric" и "Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric" соответственно. В среду измерения добавляли коктейль ингибиторов протеаз (0,08 мМ апротинин, 1,5 мМ пепстатин А, 2 мМ лейпептин) в соотношении 100:1 (все реактивы фирмы "Sigma"). Колориметрический анализ активности каспаз основан на гидролизе пептидного субстрата ацетил-Tyr-Val-Ala-Asp-*p*-нитроанилида (Ac-YVAD-pNA) (в случае каспазы-1) и ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-нитроанилида (Ac-DEVD-pNA) (в случае каспазы-3) с образованием остатка *p*-нитроанилида, имеющего максимум экстинкции при 405 нм (коэффициент молярной экстинкции = 10,5 $М^{-1}см^{-1}$). Активность каспаз выражали в пикомоль продукта, образующегося в 1 мин, в расчёте на мг белка. ДНК выделяли из лейкоцитов крови фенольно-хлороформным методом [12]. Фрагментацию ДНК выявляли с помощью электрофореза в агарозном геле и использованием ТАЕ (трис–ацетат–ЭДТА, pH 7,6) – буфера, содержащего бромистый этидий [13]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор "MassRuler" производства "Fermentas" (Литва), включающий маркеры от 1500 до 10000 нуклеотидных пар.

Активность АГ определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900 при 235 нм в среде, содержащей 0,05 мМ трис-HCl-буфер (pH 7,8), 4 мМ цитрат. За ферментативную единицу (Е) принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоля субстрата в 1 мин при 25°С. Количество цитрата определяли по методу Нательсона [14]. Общий белок определяли унифицированным методом по биуретовой реакции [15].

Активность γ-глутамилтранспептидазы (γ-GTP) оценивали по скорости реакции переноса глутамилового остатка с γ-*L*-(+)-глутамил-4-нитроанилида на глицилглицин (Био–тест, PLIVA – “Lachema Diagnostika”, Чехия). Активности ALT, AST, уровень β-липопротеинов, холестерина определяли наряду со стандартными параметрами биохимического анализа крови на биохимическом анализаторе Klima 15MC (Испания). Уровень глюкозы натощак и постпрандиальный уровень глюкозы оценивали с помощью глюкометра “Сателлит Плюс” (“ЭЛТА”, Россия).

Помимо упомянутых выше реактивов в работе использовали цитрат, трис-ацетат-ЭДТА, бромистый этидий, (“Sigma”), трис-HCl-буфер, ЭДТА (“Reanal”, Венгрия), остальные реактивы отечественного производства марки “хч” или “чда”.

Статистическая обработка материала включала в себя использование стандартных методов вариационной статистики (расчёт средних значений, ошибка средних значений, t-критерия Стьюдента) и непараметрического теста Вилкоксона с использованием прикладных программ “STATISTICA 6.0”. Достоверными считали различия при $p \le 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности каспаз в сыворотке крови пациентов с СД 2 типа, осложнённым стеатогепатитом, выявило их значительное возрастание – в 1,7-1,8 раз (рис. 1). Это свидетельствует об усилении интенсивности апоптотических процессов в организме больных. Следует отметить, что повышение активности каспазы-3 было также обнаружено в печени экспериментальных животных при моделировании токсического гепатита с помощью четырёххлористого углерода [16]. После проведения стандартного лечения активность каспазы-1 снижалась, а активность каспазы-3 в большинстве случаев достоверно не изменялась (рис. 1). При включении эпифамина в схему лечения отмечено уменьшение активности каспазы-1 и каспазы-3 по сравнению с соответствующими значениями у пациентов до лечения (рис. 1). Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о снижении уровня апоптотических процессов в организме пациентов с СД 2 типа, осложнённым стеатогепатитом, при действии эпифамина, что, по-видимому, может быть связано с возрастанием уровня мелатонина.

Данные об изменениях активности каспаз у больных, находящихся на базисном лечении, а также у пациентов, принимающих эпифамин на фоне базисной терапии, согласуются с результатами оценки степени фрагментации ДНК лейкоцитов крови. ДНК, полученная из крови доноров, составивших контрольную группу, была представлена одним фрагментом в начале трека, что характерно для высокомолекулярной ДНК нативных клеток (дорожка 2, рис. 2). При исследовании образцов крови пациентов со стеатогепатитом, развивающемся на фоне СД 2 типа, была выявлена фрагментация ДНК, подтверждающаяся совокупностью полос (“апоптозная лестница”) на электрофореграмме (дорожка 3, рис. 2). Согласно современным представлениям, это свидетельствует о развитии апоптотических процессов, которые приводят к конденсации ядерного хроматина и сморщиванию клетки при сохранности цитоплазматической мембраны [17].

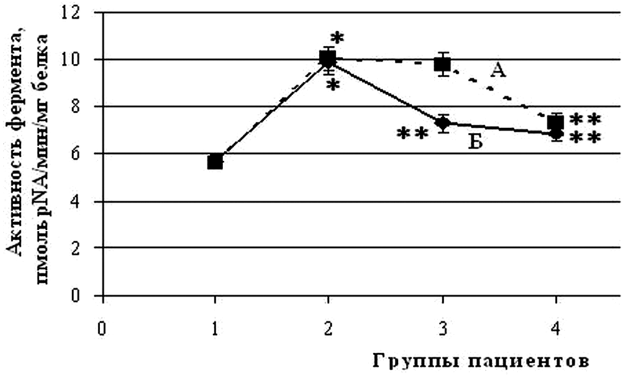

Рисунок 1. Активность каспазы-3 (А) и каспазы-1 (Б) в сыворотке крови пациентов в норме (1), с СД 2-го типа, осложнённым стеатогепатитом (2), при традиционном лечении (3), при комбинированной терапии с эпифамином (4).

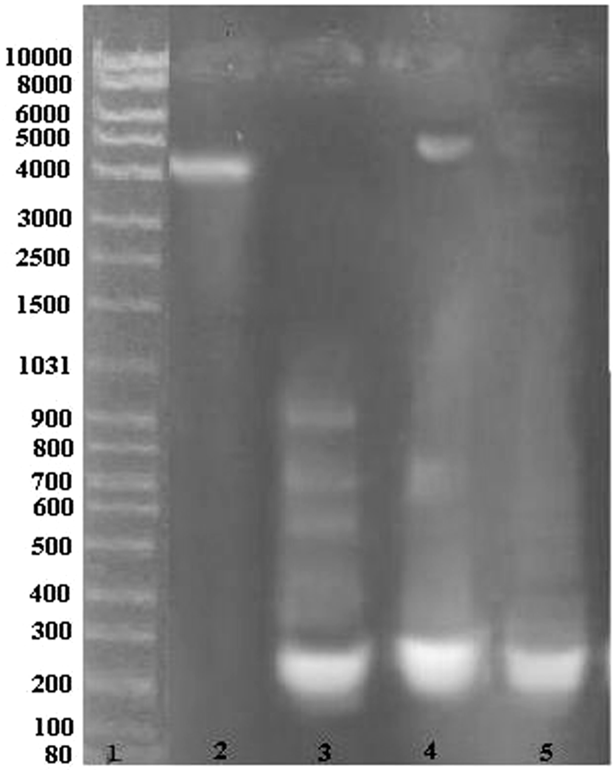

Рисунок 2. Фрагментация ДНК лейкоцитов крови пациентов в норме (2), с СД 2-го типа, осложненного стеатогепатитом (3), при традиционном лечении (4), при комбинированной терапии с эпифамином (5); (1) - маркеры молекулярного веса.

После проведения базисного лечения наблюдалось уменьшение степени фрагментации ДНК, что свидетельствует о снижении скорости апоптотических процессов (дорожка 4, рис. 2). Очевидно, назначение гепатопротекторов, обладающих мембраностабилизирующим действием [18], а также метаболической терапии положительно влияло на свободнорадикальный гомеостаз организма. При исследовании образцов крови больных, принимавших эпифамин на фоне базисной терапии, “апоптозная лестница” в большинстве проб была мало выражена, а в ряде случаев практически не визуализировалась совсем. Вероятно, коррекция уровня мелатонина под действием данного препарата приводила к защите молекулы ДНК от действия АФК, содержание которых повышается при стеатогепатите, развивающемся на фоне СД 2 типа [19].

При СД 2 типа, осложнённым стеатогепатитом, происходило существенное уменьшение удельной активности АГ и активности, выраженной в Е на мл сыворотки крови (рис. 3 А,Б). Существуют две изоформы АГ: цитоплазматическая (цАГ) и митохондриальная (мАГ). Несмотря на различия по физико-химическим и структурным свойствам, оба изофермента АГ имеют железо-серный кластер, связанный с остатками Cys437, Cys503 и Cys506 [8]. Известно, что при окислительном стрессе происходит разрушение железо-серных кластеров АГ, что сопровождается инактивацией фермента [20]. Имеются литературные данные об участии супероксидных анион-радикалов в разрушении железо-серных кластеров АГ, приводящем к инактивации фермента [21]. Известно, что мАГ и цАГ выполняют различные физиологические функции, связанные с их участием в окислительных и биосинтетических процессах соответственно. Реакция, катализируемая мАГ, служит одним из инициирующих этапов цикла Кребса, и данный изофермент весьма чувствителен к АФК, причём в большей степени, чем цитозольная форма [8]. Супероксид, образование которого происходит в электронтранспортной цепи митохондрий, очевидно, может снижать активность мАГ, что сопровождается замедлением цикла трикарбоновых кислот и снижением потока электронов через митохондриальную дыхательную цепь [22]. Функционирование цАГ связано с регуляцией накопления и утилизации цитрата в процессах липогенеза, а также с синтезом глутамата. Предшественником глутамата является 2-кетоглутарат, образующийся под действием цитоплазматической NADP-изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИДГ) из изоцитрата, источником которого служит реакция, катализируемая цАГ [8]. Кроме того, реакция, катализируемая NADP-ИДГ, обеспечивает генерирование NADPH [23].

Полученные нами результаты, свидетельствующие о существенном снижении активности АГ по сравнению со значением в контрольной группе, согласуются с предположениями, что АГ может выступать в качестве чувствительной мишени

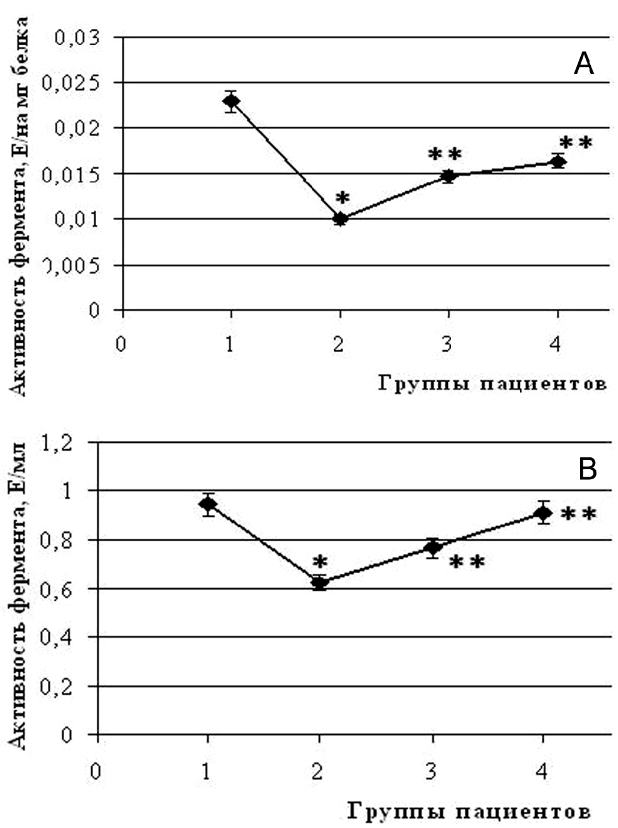

Рисунок 3. Удельная активность аконитатгидратазы (А) и активность фермента, выраженная в виде Е/мл сыворотки крови (Б) у пациентов в норме (1), с СД 2-го типа, осложненного стеатогепатитом (2), при традиционном лечении (3), при комбинированной терапии с эпифамином (4).

действия свободных радикалов. Следует отметить, что существует данные о падении активности АГ в тканях животных при патологических состояниях, сопряженных с оксидативным стрессом [24].

После проведения базисного лечения отмечено увеличение удельной активности АГ (рис. 3). Включение эпифамина в схему лечения приводило к возрастанию активности этого фермента (рис. 3). По-видимому, эпифамин оказывает позитивное влияние на свободнорадикальный гомеостаз организма, что, может быть, связано, в частности, с положительным действием мелатонина на функционирование ферментов АОС [25]. Изменение активности АГ в сторону нормы, очевидно, может рассматриваться как позитивный критерий [8].

Ранее в эксперименте на животных нами было показано, что при патологических состояниях, сопровождающихся развитием оксидативного стресса, торможение активности АГ сопряжено с возрастанием уровня цитрата [26, 27]. Однако в результате проведенных нами исследований такой взаимосвязи между содержанием цитрата и активностью АГ в сыворотке крови пациентов с СД 2 типа, осложненным стетогепатитом, в большинстве случаев выявлено не было.

Это, возможно, связано с метаболическими превращениями цитрата в других процессах, протекающих с участием других ферментов. Так, известно, что у больных с СД 2 типа с ожирением происходит активация липогенеза [28].

Содержание цитрата в сыворотке крови у большинства пациентов (81,3%) уменьшалось в среднем в 1,88 раза по сравнению с контролем (рис. 4, Б). Вместе с тем, у небольшой части больных со стеатогепатитом (18,7%) имело место увеличение содержания цитрата в сыворотке крови в среднем в 1,64 раза по сравнению с нормой (рис. 4, А).

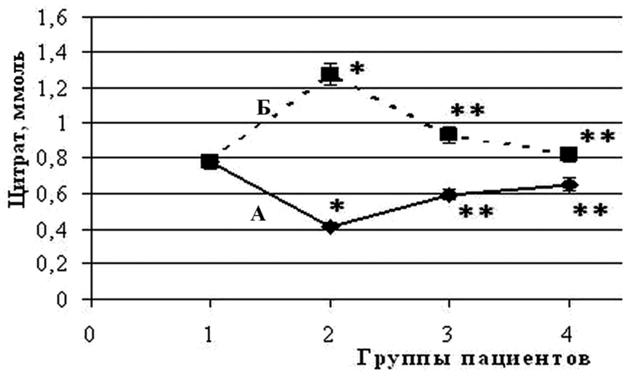

Рисунок 4. Содержание цитрата в сыворотке крови пациентов в норме (1), с СД 2-го типа, осложненным стеатогепатитом (2), при традиционном лечении (3), при комбинированной терапии с эпифамином (4). (А) - в группе больных с пониженным уровнем цитрата (81,3% от общего количества больных), (Б) - в группе больных с повышенным уровнем цитрата (18,7% от общего количества больных).

После проведения стандартного лечения в группе больных с пониженным уровнем цитрата наблюдалось увеличение его содержания у 42% пациентов (рис. 4, Б). Однако у остальных пациентов содержание цитрата оставалось примерно на том же уровне. В группе больных с повышенными показателями содержания цитрата базисное лечение приводило к снижению его концентрации в среднем на 27,1% (рис. 4, А).

Проведение комбинированной терапии с эпифамином сопровождалось увеличением низких значений цитрата у 51% больных в среднем в 1,57 раза по сравнению с данными, полученными до лечения (рис. 4, Б); у остальных пациентов (49%) показатели уровня цитрата существенно не изменялись. В группе больных, у которых были выявлены повышенные значения цитрата, при приеме эпифамина происходило их снижение в среднем на 35,9% (рис. 4, А). Таким образом, при включении эпифамина в терапию имели место более значительные изменения содержания цитрата в сторону контроля по сравнению с базисным лечением, что могло быть связано с адаптагенными свойствами мелатонина при окислительном стрессе.

Положительный эффект комбинированного лечения с эпифамином подтверждался клинико-биохимическими показателями, оцениваемыми при данной патологии. Концентрация уровня глюкозы натощак в крови пациентов после базисного лечения уменьшалась в 1,36 раза ($p<0,05$), а после комбинированной терапии с эпифамином – в 1,67 раза ($p<0,05$) (таблица). Постпрандиальный уровень глюкозы в крови пациентов первой группы после базисного лечения снижался в среднем в 1,40 раза ($p<0,05$). После комбинированной терапии с эпифамином постпрандиальная гипергликемия уменьшалась в 1,51 раза ($p<0,05$) (таблица). По-видимому, это было связано со способностью мелатонина увеличивать пролиферацию и неогенез β-клеток, улучшать чувствительность к инсулину и уменьшать степень выраженности окислительного стресса [29].

В группе пациентов, находящихся на стандартном лечении, происходило уменьшение уровня β-липопротеинов и холестерина в 1,23 и 1,26 ($p<0,05$) раза соответственно (таблица). После комбинированной терапии с эпифамином происходило

Таблица. Влияние комбинированной терапии с эпифамином на биохимические показатели крови у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, осложнённым стеатогепатитом.

Показатели	Единицы измерения	Контрольная группа (n=65)	1-ая группа (базисное лечение; n=33)		2-ая группа (комбинированная терапия с эпифамином; n=28)	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Глюкоза (натощак)	ммоль/л	4,82±0,81	11,7±1,63*	8,6±1,68**	11,2±2,88*	6,9±0,86**
Глюкоза (постпрандиальная)	ммоль/л	5,61±0,92	13,4±2,12*	9,6±2,36**	13,1±2,75*	8,7±1,55**
γ-GTP	мккат/л	0,88±0,03	2,78±0,12*	1,36±0,05**	2,71±0,09*	1,06±0,04**
ALT	нмоль/(с·л)	95,93±13,71	68,2±9,54*	38,9±8,41**	64,4±9,12*	34,1±6,86**
AST	нмоль/(с·л)	52,52±7,34	49,9±9,75	36,7±7,11	46,5±8,66	30,5±8,57
β-липопротеины	ммоль/л	3,11±0,11	12,7± 2,05*	10,3±0,86	9,7±2,49*	6,7± 1,23
Холестерин	ммоль/л	4,13±0,24	6,7±2,08	5,3±1,47	6,6±2,25	4,9±1,21

Примечание: достоверность значений $p\leq0,05$. (*) - по сравнению с нормой, (**) - по сравнению с патологией.

несколько более выраженное снижение содержания β-липопротеинов в 1,45 раза ($p<0,05$) и холестерина в 1,35 раза ($p<0,05$) по сравнению с результатами до лечения (таблица).

Активность аланинаминотрансферазы (ALT) и в меньшей степени аспартатаминотрансферазы (AST) до начала лечения были повышены у пациентов обеих групп (таблица). Данные биохимические показатели подтверждают, что у больных с СД 2 типа, осложненным стеатогепатитом, происходило повреждение мембран гепатоцитов, что сопровождалось выходом в кровь аминотрансфераз. После базисного лечения происходило снижение активности ALT и AST (таблица). После комбинированной терапии с эпифамином имело место более выраженное снижение уровня ALT и AST (таблица).

О нарушении функционирования печени у пациентов свидетельствовала также активность γ-глутамилтранспептидазы (γ-GTP), которая до назначения лечения была в среднем в 3,15 раза выше по сравнению с нормой (таблица). После проведения базисного лечения активность данного фермента снижалась в 2,04 раза, а после комбинированной терапии с эпифамином – в 2,62 раза (таблица).

Таким образом, проведение комбинированной терапии, включающей эпифамин, у больных с СД 2 типа, осложненным стеатогепатитом, оказывало благоприятное влияние на показатели биохимического анализа крови, включая “печеночные пробы”. Вероятно, за счет своей антиоксидантной активности мелатонин, уровень которого корригируется под действием данного препарата, усиливал гепатопротекторное, антиоксидантное, липотропное действие базисного лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют, что при СД 2 типа, осложненным стеатогепатитом, в организме больных происходила активация процессов апоптоза, о чем свидетельствует возрастание активностей каспазы-1 и каспазы-3, а также фрагментация ДНК. Интенсификация СО подтверждается также существенным торможением активности АГ, являющейся чувствительной мишенью действия АФК. Комбинированная терапия с эпифамином приводила к более значительному изменению степени фрагментации ДНК, активностей каспаз и АГ в направлении контрольных показателей по сравнению с базисным лечением. Кроме того, эпифамин оказывал положительное воздействие на содержание цитрата в сыворотке крови больных. Включение эпифамина в базисную терапию сопровождалось более значительными изменениями в сторону нормы клинико-биохимических параметров, традиционно оцениваемых при данной патологии (глюкоза натощак и постпрандиальный уровень глюкозы, ALT, AST, γ-GTP, β-липопротеины, холестерин). Это, по-видимому, сопряжено с коррекцией под действием эпифамина уровня мелатонина, обладающего способностью эффективно связывать АФК, участвовать в регуляции АОС и нормализовать свободнорадикальный гомеостаз организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ивашкин В.Т., Шульпекова Ю.О.* (2000) Российский Медицинский журнал, №2, 41–45.
2. *Подымова С.Д.* (2005) Российский Медицинский журнал, №2, 61-65.
3. *Pinto H.C., Baptista A., Camilo M.E., Valente A., Saragoca A., de Moura M.C.* (1996) Dig. Dis. Sci, **41**, 172-179.
4. *Hengartner M.O.* (2000) Nature, **407**, 770-776.
5. *Woo M., Hakem R., Soengas M.S., Duncan G.S., Shahinian A., Kägi D., Hakem A., McCurrach M., Khoo W., Kaufman S.A., Senaldi G., Howard T., Lowe S.W., Mak T.W.* (1998) Genes. Dev., **12**, 806-819.
6. *Rodriguez H., Drouin R., Holmquist G.P.J.* (1995) Biol. Chem., **270**, 17633-17640.
7. *Skulachev V.P.* (1996) Quant. Rev. Biophys., **29**, 169-203.
8. *Матасова Л.В., Попова Т.Н.* (2008) Биохимия, **73**(9), 1189-1198.
9. *Horstman J.A., Wrona M.Z., Dryhurst G.* (2002) Bioorg. Chem., **30**, 371–382.
10. *Кветная Т.В., Князькин И.В., Кветной И.М.* (2005) Мелатонин – нейроиммуноэндокринный маркер возрастной патологии, ДЕАН, СПб.
11. *Попов С.С., Пашков А.Н., Есауленко И.Э., Шульгин К.К., Агарков А.А.* (2013) Вестник новых медицинских технологий, **20**(2), 134-138.
12. *Галитовский В.Е., Гогвадзе В.Г.* (2001) Радиац. биология. Радиоэкология, **41**(2), 137-140.
13. *Калинина Т.С, Баннова А.В., Дыгало Н.Н.* (2002) Бюлл. экспер. биол. мед., **134**, 641-644.
14. *Медведева Л.В., Попова Т.Н., Артюхов В.Г.* (2002) Бюлл. экспер. биол. мед., **134**(8), 151-156.
15. *Матасова Л.В.* (2006) Лабораторные работы и задачи по биохимии, изд-во ВГУ, Воронеж.
16. *Лемза С.В., Ажунова Т.А., Мондодоев А.Г., Николаев С.М., Разуваева Я.Г., Занданов А.О.* (2010) Бюлл. ВСНЦ СО РАМН, **72**(2), 181–184.
17. *Li G.L., Farooque M., Holtz A., Olsson Y.* (1999) Acta Neuropathol., **98**(5), 473-480.
18. *Fraschini F., Demartini G., Esposti D.* (2002) Pharmacology of silymarin. Clin. Drug Invest., **22**(1), 51-65.
19. *Reiter R.J., Acuña-Castroviejo D., Tan D.X.* (2001) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **939**, 200–215.
20. *Gardner P.R., Nguyen D.M., White C.W.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **91**, 12248–12252.
21. *Koo H.C., Davis J.M., Li Y., Hatzis D., Opsimos H., Pollack S., Strayer M.S., Ballard P.L., Kazzaz J.A.* (2005) Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol., **288**(4), 1718–1726.
22. *Walden W.E.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 4138-4140.
23. *Popova T., Pinheiro de Carvalho M.A.A., Matasova L., Medvedeva L.* (2007) Mol. Cell. Biochem., **294**, 97-105,
24. *Попова Т.Н., Агарков А.А., Веревкин А.Н.* (2013) Acta Naturae, **5**(4(19)), 129-134.
25. *Попов С.С., Шульгин К.К., Пашков А.Н.* (2012) Биомед. химия, **58**, 104-111.
26. *Пашков А.Н., Попов С.С., Семенихина А.В.* (2005) Проблемы эндокринологии, **51**(6), 41-43.

27. *Pinheiro de Carvalho M.A.A., Popov S.S., Safonova O.A., Makeeva A.V., Matasova L.V., Pashkov A.N., Popova T.N.* (2010) In: Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects. – Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 291-303.
28. *Балаболкин М.И., Клебанова Е.М.* (2000) Проблемы эндокринологии, №6, 29-34.
29. *Коненков В.И., Климонтов В.В., Мичурина С.В.* (2013) Сахарный диабет, №2, 11-16.

Поступила: 29. 01. 2014.

INTENSITY OF APOPTOTIC PROCESSES, ACONITATE HYDRATASE ACTIVITY AND CITRATE LEVEL IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS COMPLICATED STEATOHEPATITIS UNDER APPLICATION OF EPIFAMIN AT BASIC THERAPY

***S.S. Popov*[1], *A.N. Pashkov*[1], *A.A. Agarkov*[2], *K.K. Shulgin*[2]**

[1]Burdenko Voronezh State Medical University,
10 Studencheskaya str., Voronezh, 394036 Russia; tel.: 8(473)2530413; e-mail: popov-endo@mail.ru
[2]Voronezh State University, 1 Universitetskaya sq., Voronezh, 394006 Russia

DNA fragmentation, caspase-1 and caspase-3, aconitate hydratase (AH) activities, and citrate content have been investigated in the blood of patients with type 2 diabetes mellitus complicated by steatohepatitis. These indicators of apoptotic processes intensity and oxidative stress development were estimated after basic treatment and a combined therapy including epifamin. Before treatment DNA fragmentation blood leukocytes, decrease of AH activity and increase of caspases activities in the serum of patients were detected. Treatment with epifamin provided more pronounced changes in the investigated parameters towards control values as compared to basis therapy. Epifamin caused a positive effect on the citrate content in the serum of patients. Epifamin inclusion to the basic therapy was accompanied by a more pronounced changes towards the normal values of such biochemical parameters as ALT, AST, β-lipoproteins, cholesterol, fasting glucose and postprandial glucose levels. All these changes may be obviously attributed to epifamin-induced correction of the melatonin level and manifestation of adaptogenic properties and antioxidant effects of the hormone.

Key words: apoptosis, caspases, aconitate hydratase, citrate, free-radical oxidation, type 2 diabetes mellitus, steatohepatitis, epifamin, patients.