

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ**

На правах рукописи

УДК: 577.15+616.3+613.2/.3+616-089+617.5+616.15+615.38.

Каримова Нигора Набиевна

**ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ СУЛЬФАПОРИНА**

5А 510113- Клиническая лабораторная диагностика

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

Иноятова Феруза Хидоятовна

Ташкент-2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ И ПУТИ ЕЁ КОРРЕКЦИИ	
1.1. Гиперхолестеринемия и её осложнения	9
1.2. Эндотелиальная дисфункция: причины и её проявления	15
1.3. Производные хитозана в качестве гиполипидемических средств	33
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1. Объект исследования	45
2.2. Методы исследования	46
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	
3.1. Экспериментальное обоснование эффективности применения производных хитозана в лечении гиперхолестеринемий	49
3.2. Результаты исследования острой и хронической токсичности сульфапорина	53
3.3. Результаты аллергологических и сенсibiliзирующих свойств сульфапорина	61
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	65
ВЫВОДЫ	70
УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ	71

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

eNOS	Эндотелиальная синтаза оксида азота
FAD	Флавинадениндинуклеотид
FMN	Флавиномононуклеотид
ICAM-1	Межклеточная молекула-1 адгезии
NADFH	Никотинамидадениндинуклеотид
NF- κ B	Ядерный фактор каппа В
NO	Оксид азота
PGI ₂	Простаглицлин
SHHS	Scottish Heart Health Study
TNF- α	Фактор некроза опухоли-альфа
TxA ₂	Тромбоксан А ₂
VCAM-1	Сосудистая молекула-1 адгезии
АД	Артериальное давление
АДФ	Аденозиндифосфорная кислота
АТ	Атеросклероз
АТФ	Аденозинтрифосфорная кислота
БАД	Биологически активные добавки
ГЛС	Гиполипидемические средства
ГМГ-СоА-редуктаза	ГидроксиметилглутарилКоА-редуктаза
ГМКС	Гладкомышечных клетки сосудов
ГТГ	Гипертриглицеридемия
ГХС	Гиперхолестеринемия

Гц	Гомоцистеин
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС	Ишемическая болезнь сердца
ЛПВП	Липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	Липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	Липопротеиды очень низкой плотности
МДА	Малоновый диальдегид
мЛПНП	Модифицированные липопротеиды низкой плотности
МФ	Макрофаги
ОХС	Общий холестерин
ПОЛ	Перекисное окисление липидов
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РФК	Реактивные формы кислорода
РФК	Ростовые факторы клеток
СГХС	Семейная гиперхолестеринемия
СОД	Супероксиддисмутаза
СРБ	С-реактивный белок
ССЗ	Сердечно-сосудистые заболевания
ТГ	Триглицериды
ФЛ	Фосфолипиды
ХЗ	Хитозан
ХС	Холестерин
ЭС-поли-ЖК	Эссенциальные полиненасыщенные жирные кислоты
ЭТ-1	Эндотелин-1

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. До настоящего времени сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются основной причиной смертности населения большинства развитых стран Европы, составляя до 40% всех случаев смерти. К настоящему времени установлен целый ряд факторов различной природы [24;60], способствующих развитию и прогрессированию ишемической болезни сердца (ИБС) – дислипидемия, артериальная гипертензия, избыточная масса тела, курение, гиподинамия, сахарный диабет. Большое внимание уделяется клеточно-молекулярным основам эндотелиальной дисфункции [68;71.]. Важную роль в дисфункции эндотелия принадлежит оксиду азота [94;51].

Патогенез атеросклероза довольно сложный, однако важную роль в этом принадлежит дислипидемии, что определяет запуск каскадного механизма воспаления. Поэтому важная роль в разработке лечебных мероприятий принадлежит снижению уровня холестерина и других насыщенных жиров [60;51].

Как видно из приведенных данных, патогенез атеросклероза довольно сложный, однако важную роль в этом принадлежит дислипидемии, что определяет запуск каскадного механизма воспаления. Поэтому важная роль в разработке лечебных мероприятий принадлежит снижению уровня холестерина и других насыщенных жиров. В последние годы уделяется большое внимание природным биodeградирующим соединениям, в частности хитозану и его производным. В Институте химии и физики полимеров АН РУз под руководством С.Ш. Рашидовой разрабатываются различные метало- и нанопроизводные хитозана [54].

Хитозан обладает противовоспалительным и антимикробным действием, восстанавливает иммунологическую реактивность организма и пролиферативные процессы в органах иммунитета [66]. Он эффективно восстанавливает баланс в организме, регулируя обменные процессы,

обладает высокими сорбционными свойствами, антикоагулянтной, антитромбогенной, бактерицидной и противоопухолевой активностью. Хитозан абсолютно безопасный природный продукт совместим с тканями человеческого организма, обладая высокими свойствами захвата жировых скоплений в кишечнике, предотвращает попадание в кровь жира и холестерина [10]. Дополнительное его введение в рацион кур-несушек приводило к уменьшению содержания в желтке куриного яйца холестерина в 1,5-2,2 раза, увеличению уровня фосфолипидов в 1,8 раза. По мнению Куприна Е.Э. (2003) производные хитозана используют в качестве сорбентов и включены в состав биологически активных добавок (БАД). Применение их приводит к сорбированию триглицеридов и жирных кислот в кишечнике, что можно считать перспективным липотропным энтеросорбентом. Исследованиями Ф.Х. Иноятовой, Г. Кутликовой, С.С. Рашидовой выявлены гиполипидемические и гипокоагулянтные свойства сульфатированных свойств хитозана.

В настоящее время во всем мире отмечается возрастание интереса к препаратам на основе хитина, его производным (хитозана и сульфата хитозана) и возможностям их использования в различных областях медицины. Особый интерес представляет получение сульфата хитозана из хитозана. Изучением реакции сульфатирования хитозана установлена закономерность данной реакции с позиций высокомолекулярных соединений. Выявлены физико-химические характеристики полученных производных хитозана на молекулярном и надмолекулярном уровнях. Образование сульфата хитозана проанализировано с проведением опытов идентификации с помощью методов ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, поляризационной микроскопии и сорбцией в воде.

Проблема создания отечественных высокоэффективных лекарственных средств весьма актуальна на сегодняшний день. Одними из таких препаратов

является Сульфопарин, который обладает противосклеротическими свойствами. Лекарственное средство Сульфопарин разработано в Институте химии и физики полимеров АН РУз [55].

Химические свойства хитозана связаны с его химической структурой. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана позволяет связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд, поэтому хитозан является прекрасным катионитом. Кроме того, свободные аминогруппы определяют хелатообразующие и комплексообразующие свойства хитозана. Он связывает и прочно удерживает ионы металлов (в частности радиоактивных изотопов и токсичных элементов) за счет разнообразных химических и электростатических взаимодействий.

В литературе имеются единичные сведения о низкой токсичности Сульфопарина и его использование в медицине в эксперименте на лабораторных животных. Однако нет сведений о характере и выраженности повреждающего действия Сульфопарина на организм экспериментальных животных и оценки его безопасности.

Цель настоящей работы: изучение специфических характеристик и доклинических экспериментальных токсикологических исследований препарата Сульфопарин.

Задачи исследования:

1. Оценить гипополипидемическое действие сульфопарина на модели экспериментальной гиперхолестеринемии.
2. Исследование острой и хронической токсичности сульфопарина.
3. Изучение аллергологических и сенсibiliзирующих свойств сульфопарина.

Научная новизна магистерской диссертации. Впервые проведен комплекс доклинических экспериментальных исследований нового лекарственного средства «Сульфопарин». Разработан препарат в Институте химии и физики полимеров АН РУз.

На модели экспериментальной гиперхолестеринемии сульфопарин обладает выраженным гипохолестеринемическим действием. Эти его свойства зависят от концентрации препарата и превосходят гемфибразил. Препарат достоверно снижает высокий уровень холестерина в липопротеидах низкой и очень низкой плотности, повышает низкие его значения в липопротеидах высокой плотности.

Изучением острой внутрижелудочной токсичности препарата на белых мышцах установлено, что по классификации лекарственных средств по токсичности препарат «Сульфопарин» относится к малотоксичным веществам (V класс опасности). Выявлено, что Сульфопарин не обладает резорбтивным и раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз, не вызывает сенсибилизации организма морских свинок. Препарат не обладает кумулятивным эффектом. Установлено, что при хроническом воздействии в течение 3-х месяцев препарат в дозах 500, 100 и 25 мг/кг массы тела не вызывает патологических изменений в организме экспериментальных животных.

Научно-практическая значимость магистерской диссертации. Доклинические токсикологические исследования препарата Сульфопарин позволят представить документы в Фармкомитет РУз для внедрения данного препарата в клиническую практику в качестве гиполипидемического и гипокоагулянтного средства.

ГЛАВА 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ И ПУТИ ЕЁ КОРРЕКЦИИ

1.1. Гиперхолестеринемия и её осложнения

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти, особенно среди населения в промышленно развитых странах мира. По данным рабочей группы ВОЗ, СНГ по смертности от ишемической болезни сердца (ИБС) занимает одно из первых мест в мире [57;49]. Атеросклероз (АС) и гиперхолестеринемия (ГХС) является одной из ведущих причин смертности от кардиоваскулярных заболеваний. Распространенность АС и ГХС неуклонно возрастает, приобретает характер эпидемии. Во многих развитых странах этот процесс непосредственно связывают с реальными достижениями клинической и профилактической медицины, инициирующей существенное увеличение средней продолжительности жизни [5]. Так, АС и ГХС устойчиво регистрируется у 6-10% пациентов старших возрастных групп. Только в США ежегодно осуществляется более 900 тыс. госпитализаций, непосредственно связанных с возникновением и прогрессированием АС и ГХС, примерно 300 тыс. пациентов погибают от этой патологии

Атеросклероз – синдром внутриклеточного дефицита эссенциальных полиеновых жирных кислот (ЭС-полиЖК) [59], которые переносят полиЖК, полиэтерифицированный холестерин (полиЭХС) к клеткам сначала липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) в форме полярных фосфолипидов (ФЛ), а затем липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) в форме неполярных (полиЭХС). Клетки поглощают ЭС-полиЖК в форме полиЭХС путем апоВ-100-рецепторного эндоцитоза; блокада поглощения ЛПНП приводит к дефициту в клетках ω -6 ЭС-полиЖК с четырьмя (арахидоновая), ω -3 ЭС-полиЖК с пятью (эйкозапентаеновая) и с шестью (докозагексаеновая) двойными связями. В результате дефицита ЭС-полиЖК

клетки начинают компенсаторно синтезировать ω -9-дигомо- γ -линоленовую ЖК, которая содержит только три двойные связи. В течение десятков лет высокодифференцированные клетки используют эту нефизиологическую ЖК в качестве предшественника в синтезе ФЛ и построении мембран, в синтезе тромбоксанов, простаглицлинов (простагландинов) и лейкотриенов с измененной биологической активностью [61]. Дефицит в клетках ЭС-полиЖК и компенсаторный синтез эндогенной полиЖК формируют клинические проявления и лабораторные признаки АС [62]:

- ГХС в сочетании с гипертриглицеридемией (ГТГ), высокий уровень в крови апоВ-100 и ХС ЛПНП, низкое содержание ХС ЛПВП;

- гипертонию и толерантность к глюкозе, резистентность к инсулину, компенсаторную гиперинсулинемию и микроальбуминурию;

- гиперагрегацию тромбоцитов, активацию клеточного и гуморального звеньев и иммунной системы;

- повышение в крови уровня вторичных маркеров воспаления (С-реактивного белка – СРБ), аполипопротеина, амилоида А, гиперфибриногемии и гиперкоагуляцию, активацию перекисного окисления (ПОЛ);

- атероматоз и атеротромбоз (деструктивное поражение интимы артерий).

На протяжении многих лет патогенез АС и ГХС подвергается всестороннему изучению в клинике и эксперименте. Установлен ряд фундаментальных фактов (на системном, органном, клеточном, молекулярном уровнях), дающих возможность проникнуть в те глубинные процессы, которые лежат в основе атеросклеротического поражения сосудов. Доказано, что наиболее атерогенными являются ХС-богатые окисленные ЛПНП, активный захват которых макрофагами в сосудистой стенке приводит к избыточному накоплению эфиров ХС в макрофагах и к трансформации их в пенистые клетки – морфологический маркер АС (ГХС) [112;128]. В

последние годы неоднократно подчеркивается также атерогенная роль ГТГ и ТГ-богатых липопротеинов [112;117;118;9].

Однако многие вопросы патогенеза остаются спорными, не до конца ясными, требующими дальнейшего изучения. В связи с этим особый интерес вызвали в своё время исследования, касающиеся роли простаноидов в патогенезе АС и других ССЗ [39;40]. Вскоре после этого большое внимание привлекли к себе два других, тесно связанных между собой открытия, имеющие непосредственное отношение к проблеме атеросклероза: выяснение принципиально новых функций сосудистого эндотелия и биорегуляторной роли эндогенного оксида азота (NO) [89;41].

В последнее время большое значение придается наличию маркеров, указывающих на воспалительные изменения. Классические патофизиологические исследования продемонстрировали присутствие воспалительных клеток, таких как моноциты, макрофаги и Т-лимфоциты, на всех стадиях развития ГХС. В последнее время иммунохимическими методами с использованием моноклональных антител, было показано, что 2/3 пенистых клеток имеют макрофагальное происхождение и лишь 1/3 формируется из гладкомышечных клеток [46;119].

Эти морфологические изменения предшествовали дисфункции эндотелиальных клеток, вызывая адгезию при взаимодействии с воспалительными клетками. В частности: появление маркеров системного воспаления предшествует развитию ССЗ; наиболее атерогены, опасны в плане развития ССЗ и широко распространены дислипидемии ПА, ПБ, ПУ типа; первичные ГХС обусловлены наследственными нарушениями липидного обмена; вторичные дислипидемии обусловлены нарушением питания или возникают в результате таких заболеваний, как гипотиреоз, нефротический синдром, подагра, сахарный диабет, ожирение. Появление маркеров системного воспаления, таких как СРБ, фибриноген и др., предшествует развитию ССЗ [28]. Эти изменения могут выявляться у

больных с нестабильной стенокардией еще до развития очаговых изменений миокарда. Их наличие у больных с высоким уровнем общего ХС и ХС-ЛПНП резко повышает риск возникновения осложнений. В ходе проведенного в 1998 году исследования SHHS (Scottish Heart Health Study) на примере почти 10 тыс. пациентов была доказана тесная взаимосвязь повышенного уровня фибриногена плазмы крови с развитием ИБС и смертности от ССЗ. Возможно, именно эти изменения помогут объяснить случаи развития АС у больных с нормальными показателями общего ХС и ХС-ЛПНП. Для более адекватного анализа нарушений липидного обмена важно оценивать не только уровень ХС-ЛПНП, ХС-ЛПВП, их соотношение, индекс атерогенности, уровень ТГ, а также уровень апо-белков А и В, от которых зависит транспортная функция липопротеинов.

В зависимости от повышения той или иной фракции ХС и/или ТГ выделяют пять типов дислипидемий (по Фридрексону) [63]. Наиболее атерогены, опасны в плане развития ССЗ и широко распространены дислипидемии IIА, IIБ, IV типа. Если невозможно провести развернутый анализ липидограммы, эти типы дислипидемий можно выявить и путем определения только ХС и ТГ. Эта классификация, достаточно простая и понятная для клиницистов, все же имеет ряд недостатков. Так, в неё не вошел ХС-ЛПВП, значения которого для решения вопроса и тактике лечения и прогноза является крайне важным.

Не менее значимым представляется и определение причин возникновения дислипидемии, которые подразделены на первичные и вторичные [69].

Первичная ГХС обусловлена наследственными нарушениями липидного обмена. Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) – сравнительно редкая причина коронарного АС, тем не менее около 5% пациентов среднего возраста с ИБС страдают СГХС [44]. Вследствие мутации количество нормально функционирующих рецепторов ЛПНП на поверхности

гепатоцитов уменьшается, что ведет к недостаточному захвату ЛПНП и повышению уровня ХС ЛПНП в плазме крови. Описано значительное количество дефектов гена рецептора ЛПНП, что отражает огромную молекулярную гетерогенность этого заболевания [87]. Большая часть таких вариаций во фрагментах гена рецептора ЛПНП, амплифицированных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), могут быть выявлены методом анализа полиморфизма конформации одноцепочечной ДНК (single-strand conformation polymorphism - SSCP). – часто наследственное нарушение метаболизма липопротеинов, вызываемые мутациями гена рецептора ЛПНП [44]. Для этой формы характерны клинические проявления уже в раннем детстве, она сопровождается развитием сосудистых осложнений и образованием сухожильных ксантом и ксантелазмов. При гетерозиготной форме количество рецепторов значительно снижено, но они все-таки имеются, поэтому заболевание развивается медленно и атерогенные осложнения проявляются к 25-30 годам. Это чаще всего ПА тип дислипидемии со значительным повышением уровня ОХС, ХС-ЛПНП и нормальным уровнем ТГ. Также весьма распространена в этой группе семейная комбинированная и полигенная ГХС. Семейная ГХС III типа встречается значительно реже. Случаи семейной гиперальфахолестеринемии обычно не сопровождаются развитием атеросклеротических и гиперхолестеринемических заболеваний и не представляют угрозы для больного.

Вторичные дислипидемии встречаются значительно чаще. Они либо обусловлены нарушением питания, когда имеет место избыточное потребление пищи, богатой ХС, либо возникают в результате таких заболеваний, как гипотиреоз, нефротический синдром, подагра, сахарный диабет, ожирение и др. Нарушение липидного обмена могут возникнуть или усугубиться на фоне лечения других заболеваний такими препаратами, как тиазидовые диуретики, иммуносупрессоры [69].

Многие исследователи большую роль в возникновении и развитии АС и развития атеросклеротического процесса придают модифицированным (окисленным) ЛПНП (мЛПНП) [27;77;79;117;120;131]. мЛПНП захватываются скэвенджер-рецептором макрофагов, при этом наблюдается снижение связывания мЛПНП со специфическими В/Е-рецептором клеток [120]. Скэвенджер-рецептор, в отличие от «классического» апо-В/Е рецептора, не регулируется в зависимости от содержания ХС в клетке [46]. Напротив, показано, что мЛПНП могут индуцировать экспрессию скэвенджер-рецепторы в моноцитах/макрофагах [131]. Таким образом, постоянный эндоцитоз богатых ХС липопротеиновых частиц через скэвенджер-рецепторы макрофагов приводит к избыточному накоплению ХС в них и образованию пенистых клеток [46].

Окислительная модификация ЛПНП является многоступенчатым процессом и включает в себе следующие события [78]: 1) образование липоперекисей; 2) фрагментацию окисленных жирных кислот, в результате которой образуются токсические низкомолекулярные продукты (альдегиды, спирты, кетоны и алканы); 3) образование лизолецитина из лецитина; 4) фрагментацию полипептида апо-В альдегидами, подобными малоновому диальдегиду (МДА) и последующую этого полипептида; 5) окисление ХС до окистерола (7-кето-холестерола, 5,6-эпоксихолестерола, 7-В-оксихолестерола и др.); 6) образование различных цитотоксических липоидов как из жирных кислот, так и из ХС; 7) увеличение ЛПНП в размерах в результате гидролиза неполярного ядра этих частиц, представленного эфирами ХС; 8) снижение содержания ХС и изменение липид-белкового взаимодействия между апо-В и однослойной мембраной частицы ЛПНП; 9) происходит модификация лизиновых остатков полипептидной цепи апо-В альдегидами и кетонами, появляющимися в результате распада гидроперекисей; 10) снижение взаимодействия частиц ЛПНП с В/Е рецептором к ЛПНП в результате модификации апо-В.

В целом эта окислительная модификация зависит, как от наличия двухвалентных ионов Cu^{2+} и Fe^{2+} [79], так и от способности сосудистых клеток эндотелия [119], моноцитов [96;98] и гладкомышечных клеток [46] – окислять ЛПНП. Можно сделать предположение о роли ЛПНП как переносчиков гидроперекисей из периферических тканей в печень. В то же время, в настоящий момент удастся выделить два главных фактора, способствующих клеточно-зависимому окислению ЛПНП. Первый – это наличие в межклеточной среде ионов с переменной валентностью. Действительно, с увеличением концентрации меди в крови происходит повышением ферментативной активности супероксиддисмутазы (СОД) и диаминооксидазы плазмы крови [93]. Имеются сообщения о том, что при повышении концентрации ионов железа в крови растет риск развития атеротромбоза (АТ) и ГХС [46]. Вторым фактором – это взаимодействие частиц ЛПНП с рецепторами к апо-В/Е макрофагов.

Как видно из приведенных данных, одним из факторов развития АС и ГХС является дислипидемия, образование модифицированных ЛПНП, вследствие окислительной модификации, что приводит к секвенджер-зависимому захвату мЛПНП и развитию хронического воспаления.

1.2. Эндотелиальная дисфункция: причины и её проявления

Еще в прошлом веке были постулированы две теории развития атеросклероза – тромбогенная и липидная [115]. У этих теорий есть общая черта, позволяющая объединить их в единую многофакторную теорию, и этой объединяющей их чертой является дисфункция эндотелия [133]. Сегодня можно считать доказанным, что нарушение функционального состояния эндотелия является первой и, возможно, главной ступенью в атерогенезе. При этом выводы о роли дисфункции или повреждения эндотелия как о пусковом механизме атерогенеза основаны на результатах

многочисленных исследований, проведенных у больных ИБС с ангиографическими неизмененными, и с малоизмененными коронарными артериями [68]. В дальнейшем это представление было расширено за счет выявления дисфункции эндотелия у здоровых людей с основными факторами риска развития ИБС [113].

Эндотелиальная дисфункция является ранним этапом развития АС [4] и характеризуется нарушенной эндотелийзависимой релаксацией сосудов (нарушенной способностью расслабляться и обеспечивать увеличение кровотока в ответ на фармакологические и физиологические стимулы) [12]. Известно, что причиной эндотелиальной дисфункции является снижение биологической активности NO – основного медиатора, выделяемого эндотелиальными клетками.

В настоящее время установлено, что эндотелий сосудов играет исключительно важную роль в деятельности ССС. Классические представления о нем как об анатомическом барьере, препятствующем проникновению крови в стенку сосудов, существенно расширились. Оказалось, что эндотелий сосудов – это мощная метаболическая система, поддерживающая сосудистый гемостаз путем осуществления ряда важнейших функций: модулирование тонуса сосудов, регуляция транспорта растворенных веществ в клетки сосудистой стенки, роста этих клеток, формирование внеклеточного матрикса, защита сосудов от возможно неблагоприятного действия циркулирующих с кровью клеток и субстанций, регуляция хемотоксических, пролиферативных, воспалительных и репаративных процессов в ответ на локальное повреждение [97]. Эти функции эндотелий сосудов осуществляется путем синтеза и выделения ряда биологически активных соединений в ответ на механические (давление, ток крови) и гуморальные стимулы. К продуцируемым сосудистым эндотелием вазодилаторным веществам относятся NO, простациклин (ПГ₂), различные гиперполяризующие факторы и С-натрийуретический пептид, к

вазоконстрикторным – эндотелин-1 (ЭТ-1), ангиотензин II, тромбоксан A₂ () и реактивные формы кислорода (РФК). Эндотелиальными модуляторами воспаления являются NO, межклеточная молекула-1 адгезии (ICAM-1), сосудистая молекула-1 адгезии (VCФМ-1), E-селектин, ядерный фактор каппа В (NF-κB). Модулирование же гемостаза эндотелий осуществляется путем выделения таких соединений, как активатор плазминогена, ингибитор тканевого фактора, фактора Виллебранда, NO, ПGI₂, TxA₂, ингибитор-1 активатора плазминогена и фибриноген. Эндотелий принимает также активное участие в регуляции митогенеза, ангиогенеза, проницаемости сосудистой стенки, баланс жидкости [99;97].

Известно, что причиной эндотелиальной дисфункции является снижение биологической активности NO – основного медиатора, выделяемого эндотелиальными клетками. NO модулирует ряд физиологических процессов в организме: ингибирует адгезию и агрегацию тромбоцитов, пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток сосудов, играет ключевую роль во взаимодействии эндотелиальных клеток и циркулирующих в крови лейкоцитов, а также влияет на проницаемость эндотелиальных клеток для липопротеинов и других атерогенных макромолекул [36]. NO синтезируется из L-аргинина под влиянием 3 изоформ NO-синтазы: 2 конститутивных – эндотелиальной (eNOS). Они осуществляют инкорпорирование молекулярного кислорода к атому азота в концевой гуанидиновой группе L-аргинина [121].

eNOS является гомодимером: каждый мономер содержит редуктазный участок, имеющий места связывания для флавиновых кофакторов (FAD и FMN) и для пиримидиновых коферментов (NADPH). Редуктазный участок снабжает электронами оксидазный участок другого мономера, где L-аргинин окисляется. Перенос электронов контролируется кальций-кальмодулином в области между редуктазным и оксидазным участками. Тетрагидробиоптерин

необходимо для гомодимеризации eNOS; кроме того, он регулирует редокс-состояние железа гема и транспорт электронов [121].

eNOS локализована в альвеолах (лакунообразные микроучастки размером 50-1000 нм) эндотелиальных клеток плазматической мембраны, где она ассоциирована с кавеолином. В таком состоянии активность eNOS резко снижена [80]. Под влиянием ряда рецептор-зависимых стимулов (ацетилхолина, брадикинина, тромбина, АДФ, глутамата, вещества P и др.), повышающих концентрацию кальция в эндотелиальных клетках (ЭК), происходит высвобождение eNOS, её активация кальцием-кальмодулином, окисление L-аргинина и синтез небольшого количества (пикомоли) NO. Образование NO повышается также рецептор-независимыми агонистами (Ca^{2+} -ионофоры, Ca^{2+} -АТФ), растяжением стенки сосуда, смещением крови по отношению к ЭК (так называемое напряжение сдвига) и некоторыми другими факторами [121].

Оксида азота – регуляторная молекула кислорода, участвующей в управлении тканевым обменом в норме, и при различных патологических состояниях [110]. Сегодня доказано, что он участвует в регуляции тонуса сосудов [130], тормозит агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках сосудов. Оксид азота играет роль медиатора в развитии физиологических и патологических процессов в организме. У больных инфарктом миокарда была выявлена обратная корреляционная зависимость между уровнем нитритов/нитратов и факторами риска развития левожелудочковой недостаточности и тяжелого клинического течения инфаркта миокарда. Высокий риск летального исхода инфаркта миокарда отмечался в группе больных с уровнем конечных метаболитов NO в моче и плазме ниже 20 и 5 мкМ, соответственно, в первые часы заболевания [15].

Ацетилхолин взаимодействует с рецепторами клеток эндотелия кровеносных сосудов образуются малые молекулы, мигрирующие в мышечный слой и вызывающих его расслабление. Основной причиной этого

считают нарушение синтеза NO эндотелиоцитами – самого мощного эндогенного вазодилатора [18;29;30;31;105;109;114]. NO расслабляет гладкие мышцы сосудистой стенки [19], и его достаточное содержание является важным фактором регуляции тонуса сосудов и предупреждения тромбообразования. Окись азота в результате активизации циклооксигеназы, запускает синтез простагландинов – медиаторов воспаления [126]. NO, синтезирующаяся эндотелием в наномолярных концентрациях, служит для тонкой регуляции сосудов, для обеспечения трофических процессов в тканях, но её синтез активированными макрофагами цитотоксических в микромолярных концентрациях нарушает регуляцию и приводит к патологическому расширению сосудов в очаге воспаления, что, зачастую, является причиной летального исхода при атеросклерозе. Генерацию NO активированными макрофагами установили J.B. Hibbs и соавт. [90] Было доказано, что цитостатический и цитотоксический эффекты макрофаги осуществляют посредством NO. Активированные бактериальными эндотоксинами или Т-лимфоцитами макрофаги усиливают синтез фермента NOS, которая превращает аргинин в NO. NO оказывает ауто- и паракринное действие [123]. Это означает, что её молекулы, несмотря на высокую химическую активность, способны транспортироваться на расстояния, в несколько раз превышающие клеточные размеры [45].

Расслабление гладкомышечных элементов сосудов под действием нитроглицерина объясняют высвобождением NO в процессе метаболизма этого препарата [125]. Антимикробные свойства NO позволяют интерпретировать его повышенный синтез при инфекционных болезнях как защитную реакцию организма, но избыток NO играет важную роль в патогенезе артериальной гипотонии при инфекционно-токсическом шоке [19;26].

Для основных процессов составляют (в наиболее общей форме) патогенез данной болезни: пролиферативно-воспалительная реакция на повреждение сосудистой стенки и отложение в ней липидов.

Как известно, различные клеточные митогены (факторы роста тромбоцитов, макрофагов, эндотелиальные клетки сосудов) могут вызвать резкое усиление пролиферативных процессов в сосудистых стенках. Эндотелиальные клетки в отмеченных последние выделяют вещества, ведущие к новому прилипанию (адгезии) тромбоцитов с высвобождением TxA_2 и серотонина, которые вызывают спазм сосудов, агрегацию тромбоцитов, способствуют тромбообразованию. Тромбоцитарные митогены (факторы роста тромбоцитов) сдвигают гладкомышечные клетки сосудов (ГМКС) медиального слоя к интимае сосудистой стенки и стимулируют их пролиферацию до образования неоинтимы. Кроме того, тромбоцитарные факторы роста стимулируют образование рецепторов к атерогенным липопротеинам – ЛПНП.

Гиперлипидемия также может вызывать пролиферативные альтерации стенки артерий в результате возникающей при этом инвазии моноцитов крови в субэндотелиальное пространство. Моноциты превращаются там в макрофаги, которые начинают накапливать в себе холестерин с целью предохранения сосудистой стенки от повреждающего действия высокой холестеринемии. Однако эта роль макрофагов при определенных условиях (например, при резкой холестеринемии) мало эффективна: они переполняются ХС, превращаясь в так называемые пенистые клетки; последние начинают продуцировать и выделять свои (макрофагальные) факторы роста, также обладающие свойством притягивать ГМКС меди к интимае, индуцируя их пролиферацию. Приходя в соприкосновение с пенистыми клетками, ГМКС поглощают большие количества жиров, сами при этом превращаются в пенистые клетки, освобождающие новые количества факторов роста.

О важной роли пролиферативной реакции в патогенезе атеросклероза свидетельствует то, что в отсутствие этой реакции жировая инфильтрация сосудистой стенки ведет к образованию липидных пятен на стенке сосудов, которые не суживают их просвет и не вызывают резких патологических изменений. Однако в отсутствие гиперхолестеринемии изменения в сосудистой стенке могут подвергаться обратному развитию, а сосудистый эндотелий – регенерации. На фоне же высоких уровней ХС отмеченные выше патологические процессы обычно прогрессируют вплоть до образования атеросклеротических бляшек. Иначе говоря, оба процесса – пролиферативная реакция и липидная инфильтрация сосудистой стенки – взаимно усиливают друг друга, приводя к развитию классической картины гиперхолестеринемии [89;76;94;116].

Одной из причин эндотелиальной дисфункции при гиперхолестеринемии являются окисленные ЛПНП, которые, действуя на эндотелиальную клетку, снижают активность эндотелиальной NO-синтазы, уменьшают количество L-аргинина – субстрата для синтеза NO, а главное, способствуют повышенной продукции активных радикалов кислорода (супероксид-анионов), что в итоге приводит к снижению биологической активности NO [129;95]. Нарушение эндотелийзависимой вазодилатации при гиперхолестеринемии обусловлено, с одной стороны, сниженным синтезом NO, с другой – инактивацией NO свободными радикалами кислорода.

В связи с перечисленным особо следует отметить роль окисленных ЛПНП в развитии дисфункции эндотелия и патогенеза гиперхолестеринемии. Эти соединения вызывают экспрессию ICAM-1 и VCAM-1, а также стимулирующий их пролиферацию и превращение в макрофаги фактор M-CSF [35]; мЛПНП стимулируют и миграцию ГМКС из медик интима сосудов, где они начинают секретировать фактор роста, что ведет к образованию фиброзных бляшек. Вызываемое мЛПНП утолщение интимы сосудов суживает их просвет, нарушает их релаксирующие свойства,

повышает тонус и сократимость артерий; мЛПНП увеличивают образование свободных радикалов кислорода и апоптоз [88;103], прокоагуляционную активность, подавляя фибринолитические свойства эндотелия, стимулируют агрегацию тромбоцитов и образование тромбов [38].

Широкий спектр биорегуляторных эффектов сосудистого NO указывает на то, что снижение его уровня в эндотелиальных клетках под влиянием тех или иных факторов должно вызывать существенные изменения их функций и системы кровообращения в целом. Эти нарушения включают: снижение эффектов эндотелийзависимых вазодилататоров и повышение вазоконструкторных влияний, рост АД, нарушения системной и констрикторных влияний, рост АД, нарушение системной и региональной гемодинамики, функций сердца, увеличение экспрессии адгезивных молекул эндотелия, агрегации тромбоцитов; прилипание их и лейкоцитов к сосудистой стенке; пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток с образованием неоинтимы, синтез внеклеточного матрикса и др.

Исследование последних лет убедительно показали, что в различных комбинациях отмеченные нарушения, составляющие дисфункцию эндотелия в целом имеют место при многих сердечно-сосудистых заболеваниях (артериальная гипертония, атеросклероз, ИБС, сердечная недостаточность, нарушение кровообращения в почках, легких, головном мозге, конечностях, кишечнике) [72;101;37;34;41], а также их факторах риска (гиперхолестеринемия, курение табака, сахарный диабет, резистентность к инсулину, ожирение, гипокинезия, старение организма, наследственная отягощенность) [122;32].

Уменьшение продукции NO в эндотелиальных клетках и их дисфункция при различных сердечно-сосудистых заболеваниях могут быть результатом торможения eNOS. Последнее сопровождается существенными изменениями сигнальных функций эндотелиальных клеток [91].

Зависимая от эндотелия вазодилатация при этих заболеваниях обычно не изменяется под влиянием кальциевых ионофоров в такой же степени, как в ответ на рецепторзависимые стимулы [34]. Так как кальциевые ионофоры стимулируют синтез NO путем увеличения входа кальция в эндотелиальных клетках независимо от активации мембранных рецепторов, можно думать о наличии при сердечно-сосудистых заболеваниях дефекта в структуре или функции этих рецепторов, а также в сигнальных механизмах, активируемых этими рецепторами [91].

Особый интерес в этом плане вызывают изменения сопряжения G-белков с рецепторами эндотелиальных клеток. Возникающие при этом нарушения сигнальных функций данных белков связывают с изменениями текучести мембран, что ограничивает взаимодействие G-белков с рецепторами, отвечающими за активацию eNOS [34]. Показано, что в культуре эндотелиальных клеток экспрессия Gai тормозится окисленными ЛПНП [100], подавляющими активность и экспрессию eNOS. Эти же изменения, наступающие по мере старения организма, а также при гипертонии и атеросклерозе, тормозят экспрессию Gai в коронарных артериях [33].

В этом контексте можно отметить и изменения при некоторых патологических состояниях сосудов поступления eNOS в caveолы, а также выхода ее из них [80]. Существенное значение имеет также нарушение процессов фосфорилирования [91] и субклеточных перемещений eNOS [111].

Торможение экспрессии и активности eNOS, сопровождающееся дисфункцией эндотелия, может вызывать ряд факторов: гипоксия, тумор-некротизирующий фактор (TNF- α), интерлейкин 1 β , ЛПНП, реактивные формы кислорода, снижение уровня кофакторов eNOS, эндогенные ингибиторы eNOS, а также снижение синтеза NO в сосудах и их эндотелий-зависимой дилатации у подростков с первичной артериальной гипертензией задолго до начальных проявлений болезни [41].

Одним из важных механизмов снижения уровня NO и дисфункция сосудистого эндотелия, вызываемых ЛПНП, является нарушение ими сопряжения L-аргинина и eNOS, создание условий, препятствующих осуществлению реакции окисления eNOS-синтетазой L-аргинина. Главное здесь - нарушение ЛПНП метаболизма и транспорта L-аргинина, в результате чего его концентрация в эндотелиальных клетках резко падает. В этих условиях экспрессия и активность eNOS не снижаются, но происходят существенные изменения на ее редокс-окислительных участках [127].

Молекулярные основы функционирования и дисфункции сосудистого эндотелия – сложная и не до конца изученная проблема. Однако многочисленные исследования, проведенные в последние годы, убедительно свидетельствуют о ведущей роли в этих процессах системы L-аргинин – NO – NO-синтетаза. Значение указанной системы определяется, с одной стороны, многогранным участие NO в осуществлении эндотелием своих функций, с другой – возможностью коррекции возникающих нарушений путем воздействия на различные звенья этой системы.

Сердечно-сосудистые заболевания и в первую очередь ишемическая болезнь сердца остаются среди ведущих причин потери трудоспособности и смертности населения во всем мире. В последние годы появилось много новых данных, позволивших значительно расширить представление о патогенезе атеросклероза. Установлено, что в патогенезе атеросклероза большую роль играет вялотекущий воспалительный процесс в стенке сосуда, проявляющийся на всех этапах развития и повреждения атеросклеротической бляшки.

Находит подтверждение положение о наличии большого количества различных факторов, способствующих прогрессированию атеросклеротических изменений. Особого внимания заслуживают те факторы, которые поддаются медикаментозной коррекции. Одним из изменяемых факторов риска развития атеросклероза и тромбоза является

гомоцистеин, значение которого в развитии сердечно-сосудистых, нервно-психических заболеваний, осложнений беременности было доказано сравнительно недавно [67].

Повышение концентрации гомоцистеина в плазме крови оказывает повреждающее действие как на стенку сосудов, так и на систему свертывания крови, создавая условия для атеросклеротических изменений в сосудах и повышенного тромбообразования.

Гомоцистеин ускоряет развитие атеросклероза, поскольку:

- оказывает токсическое действие на эндотелий сосудов;
- Усиливает адгезию тромбоцитов;
- неблагоприятно воздействует на факторы свертывания крови.

Гомоцистеин усиливает образование дисульфидных производных белков; в мембранах клеток и межклеточном пространстве накапливаются липопротеины низкой и очень низкой плотности; уменьшается продукция серосодержащих гликозамингликанов, что приводит к снижению эластичности стенки сосудов, активизируются процессы пролиферации гладкомышечных клеток.

Гипергомоцистеинемия вызывает оксидативный стресс - аутоокислительные реакции, приводящие к образованию NO^- , активации нуклеарного фактора $\kappa\text{-B}$ (NF $\kappa\text{-B}$) – провосполительного фактора транскрипции и экспрессии стресс-зависимых генов.

Гомоцистеин нарушает сосудорасширяющую функцию эндотелия за счет того, что перекисные радикалы O_2^- , образовавшиеся при аутоокислении гомоцистеина, могут переводить вазодилататор NO в форму пероксинитритов OONO^- (NO^-), не обладающую вазодилатирующими свойствами.

При повышении уровня гомоцистеина в плазме крови увеличивается риск развития атеросклероза сосудов сердца, головного мозга и периферических сосудов. Повышение концентрации гомоцистеина на 5

мкмоль/л приводит к увеличению риска атеросклеротического поражения сосудов сердца на 80% у женщин и на 60% у мужчин.

Установлена статистически достоверная связь между уровнем гомоцистеина и смертностью у пациентов с ангиографическими подтверждениями заболеваниями коронарных артерий. Среди пациентов с ИБС уровень смертности от сердечной недостаточности выше у больных с гипергомоцистеинемией.

Гипергомоцистеинемия является предиктором развития сердечно-сосудистой патологии, риска возникновения осложнений при этих заболеваниях, а также смертности от развития осложнений [67].

Стандартное определение липидов в сыворотке крови не позволяет установить наличие новых факторов риска, которые могут участвовать в развитии атеросклеротического поражения коронарных артерий. В определенных ситуациях измерение апобелков (апо) В100 и А, подфракций холестерина липопротеидов высокой плотности и низкой плотности, липопротеида (а) (Лп (а)), гомоцистеина (Гц) может уточнить истинный профиль риска пациента. Особенно это важно в случаях семейного анамнеза ишемической болезни сердца и в отсутствие классических факторов роста атеросклероза [102].

Многие клинико-эпидемиологические исследования продемонстрировали независимую связь Лп (а) и Гц с ИБС [74], каждый из которых играет важную роль в развитии атеросклероза, воздействуя на тромболизис, эндотелий, тромбоциты, хотя точные механизмы их патогенности не определены. Предполагается, что Гц способствует связыванию Лп (а) с плазмин-модифицированным фибрином [17], препятствуя тем самым фибринолизу. Уровень Лп (а) в сыворотке крови повышен у трети больных ИБС [107]. В его состав, помимо ЛПНП, входит апобелок (а), обладающий структурным сходством с плазминогеном, что позволяет полагать участие Лп (а), как в атерогенезе, так и в

тромбообразовании [17]. Наличие биохимической связи Лп (а) с Гц может способствовать значимому клиническому взаимодействию этих факторов.

Гомоцистеин – природная серосодержащая аминокислота, являющаяся продуктом метаболизма метионина, одной из восьми незаменимых аминокислот организма. Впервые гомоцистеин был описан еще в 1932 г., однако основные сведения о связи повышенного содержания гомоцистеина в крови – гипергомоцистеинемия с сердечно-сосудистой патологией, нервно-психическими заболеваниями, патологией беременности стали появляться в литературе только в последние десятилетия.

За последние десятилетия представления о факторах риска атеросклероза и связанных с ним заболеваниях сердечно-сосудистой системы значительно расширились. Помимо хорошо известных причин, - артериальной гипертонии, гиперлипидемии (прежде всего повышение содержания в плазме крови фракции липопротеидов низкой плотности), курение, ожирения и сахарного диабета, в настоящее время определенная роль в развитии болезней системы кровообращения и цереброваскулярных заболеваний отводится показателям системы гемостаза (в частности гиперфибриногенемии), маркерам системного воспалительного ответа (С-реактивному белку, СОЭ), инфекционным агентам (некоторым вирусам и хламидиям), а также наследственным факторам (генетически детерминированным нарушениям липидного обмена, полиморфизму генов АПФ и АТ₁-рецепторов). Следует отметить, что истинный вклад большинства так называемых новых факторов риска в генез заболеваний сердечно-сосудистой системы все еще не определен. Доказательствами эффективности предлагаемых мер борьбы с ними являются данные, полученные при проведении проспективных контролируемых исследований.

Сравнительно недавно к потенциальным факторам риска атеросклероза стали относить гипергомоцистеинемию. Связь между повышением концентрации гомоцистеина – аминокислоты, содержащей сульфгидрильную

группу, - в плазме крови и увеличением риска развития болезней сердечно-сосудистой системы доказана. Такая взаимозависимость была достоверно установлена в ходе знаменитого Фремингемского исследования, и с этого времени гипергомоцистеинемия уделяется все больше внимания как в руководствах и учебниках по внутренним болезням, так и в научно-популярных изданиях, рассчитанных на пациентов, и в обучающих программах.

Гомоцистеин – продукт деметилирования метионина. Под действием цистотиоин-β-синтетазы, коферментам которой является витамин В₆, это вещество превращается в цистатион, затем в цистеин, экскретирующийся с мочой. Значительный пул гомоцистеина реметилируется под влиянием метионин синтетазы, кофермент которой – витамин В₁₂ [65].

До настоящего времени патология сердечно-сосудистой системы остается основной причиной заболеваемости, инвалидности и смертности среди населения во всем мире, что связано с бурным ростом распространенности атеросклероза и его осложнений. Воздействие на известные факторы риска развития атеросклероза и КБС позволило добиться существенных успехов в борьбе с этими состояниями, но несмотря на это смертность от сердечно-сосудистых причин остается на первом месте. Согласно статистическим данным и в Республике Узбекистан смертность от сердечно-сосудистых заболеваний занимает первое место (40%) [3].

В связи с этим продолжается поиск новых факторов риска, идентификация которых позволила бы повлиять на уровень смертности от этих заболеваний.

Одной из актуальных проблем современной медицины является выделение группы риска наиболее распространенной патологии, лежащей в основе смертности. Сегодня не вызывает сомнения тот факт, что в патогенезе сосудистых повреждений и атеросклероза важную роль играют циркулирующие в крови факторы воспаления и прокоагулянты.

В последние годы интенсивно разрабатывается концепция дебюта атеросклеротических повреждений сосудов уже с детского возраста. Все большее внимание исследований сосредоточено на поиске структурных вариантов генов, участвующих в метаболизме, дефекты которых лежат в основе развития атеросклеротического процесса. Одним из них является ген метилентетрагидрофалатредуктазы, фермент, обеспечивающий превращение гомоцистеина в метионин.

Также в настоящее время установлено, что одним из ведущих факторов риска рецидивирующего тромбоза и облитерации артерий и вен, инфаркта и ишемии органов, в том числе и ИБС, является гипергомоцистеинемия [92]. Связь эта оказалась настолько важной и частой, что послужила основанием для создания гомоцистеиновой теории атеросклероза и выделению гомоцистеинемии отдельной строкой в классификации [6]. Известно, что гомоцистеин может способствовать окислению липопротеидов низкой плотности, нарушению функции эндотелия, пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, активации тромбоцитов и коагуляционного каскада. В последние годы активно исследуют гомоцистеин крови.

Итак, на основании этих и подобных наблюдений было высказано предположение, что гомоцистеин способствует образованию атеросклероза посредством прямого воздействия на сосудистую стенку. Гипергомоцистеинемия приводит к повреждению и активации эндотелиальных клеток (клеток выстилки кровеносных сосудов), что значительно повышает риск развития тромбозов. Тромбогенное действие гомоцистеина может быть связано с повреждением клеток эндотелия, неспецифическим ингибированием синтеза простациклина, активацией факторов свертывания крови V, VII, XII, торможением активации протеина C, тромбосана, сниженной регуляцией экспрессии тромбомодулина, блокадой связывания тканевого активатора плазминогена эндотелиальными клетками. Кроме того, высокие уровни гомоцистеина усиливают агрегацию

тромбоцитов вследствие снижения синтеза эндотелием релаксирующего фактора NO, индукции тканевого фактора и стимуляции пролиферации гладкомышечных клеток. На сегодняшний день исследования гомоцистеина являются одним из приоритетных направлений в области клинической кардиологии. Специалисты из Великобритании продемонстрировали, что кардиологические пациенты с повышенным содержанием гомоцистеина в крови погибают раньше, чем больные с более низкой его концентрацией. Сейчас на Западе всерьез поставлен вопрос о включении измерения гомоцистеина в крови пациентов с коронарной болезнью сердца в список обязательных анализов [3].

Врожденная ферментная патология, сопровождающаяся повышенным уровнем гомоцистеина в плазме крови, приводит к ускоренному развитию атеросклероза. Все это подтверждает атерогенную роль гомоцистеина. Атерогенное действие гомоцистеина было показано в экспериментах с парентеральной или алиментарной нагрузкой гомоцистеина на кроликах и обезьянах, а также объясняло ускоренное развитие атеросклероза у обезья с искусственным дефицитом витамина B₆ [83;108].

Нарушение структуры протеогликанов и избыточный рост гладкомышечных клеток могут обуславливать развитие атеросклеротических бляшек. Так было показано, что гомоцистеин является повреждающим фактором культуры эндотелиальных клеток. Повреждающее действие гомоцистеина на клетки интимы сосудов связано с оксидативным стрессом, продукцией перекиси водорода и супероксида, инаktivацией оксида азота и ингибированием активности и синтеза глутатионпероксидазы [108].

В последние годы появились многочисленные данные, указывающие на гомоцистеин как независимый модифицируемый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний [84]. Обсуждаются возможные патогенетические механизмы влияния гомоцистеина на сосудистую стенку: нарушение

эндотелийзависимой вазодилатации, окисленный стресс, способствующий перекисному окислению белков и липидов за счет перекисному окислению белков и липидов за счет увеличения продукции супероксиддисмутазы, а также усиление тромбогенеза и коагуляции [73].

Гомоцистеин в плазме подвергается окислению, в процессе которого образуются свободные радикалы, токсичные для клеток эндотелия. Следствием повреждения эндотелиальной выстилки сосудов является пролиферация гладкомышечных клеток, а также стимуляция тромбоцитов и лейкоцитов [3]. Процесс окисления гомоцистеина способствует окислению и липопротеинов низкой плотности, что стимулирует процесс атерогенеза [104]

В присутствии гомоцистеина сосуды теряют свою эластичность, снижается их способность к дилатации, что в значительной степени обусловлено дисфункцией эндотелия. W. FU и соавт. [81] доказали, что гомоцистеин влияет на образование и чувствительность тканей к оксиду азота. В эксперименте инфузия гомоцистеина приводила не только к ингибированию ферментов оксида азота, продуцируемого эндотелием под действием ацетилхолина, но уменьшала также и активность экзогенного оксида азота. По данным A. Tawacol и соавт. [124], острая гипергомоцистеинемия вызвала нарушение делятации коронарных артерий, связанное со снижением биодоступности оксида азота. Этот эффект, вероятно, обусловлен окислительным стрессом, развитию которого способствует гипергомоцистеинемия [3]. Приведенные данные могут объяснить тот факт, что на фоне гипергомоцистеинемии отмечается снижение вазодилатирующего эффекта NO-содержащих препаратов, широко используемых в кардиологии.

В исследованиях на животных было продемонстрировано усиление гиперплазии неоинтимы после повреждения сосуда на фоне высокой гипергомоцистеинемии. По-видимому, гомоцистеин усиливает образование воспалительных цитокинов и факторов роста, а также непосредственно

влияет на миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток [86;82]. Таким образом, гипергомоцистеинемия оказывает неблагоприятное влияние на механизмы, участвующие в регуляции сосудистого тонуса, обмена липидов и коагуляционного каскада. Эти патогенетические изменения, по-видимому, обуславливают большую частоту сердечно-сосудистых заболеваний на фоне высокого уровня гомоцистеина в плазме крови. В настоящее время гипергомоцистеинемия рассматривается в качестве фактора риска кардиальных патологий.

Таким образом, многочисленные клинические и популяционные исследования показали, что гипергомоцистеинемия является мощным независимым фактором риска развития атеросклероза, сравнимым с гиперхолестеринемией, курением и артериальной гипертензией. Это привлекло к возникновению гомоцистеиновой теории атеросклероза, согласно которой атерогенез обусловлен гипергомоцистеинемией, вызванной как правило, сочетанием ряда факторов: недостатком в пище витаминов группы В, фолатов, генетическими дефектами метаболизма гомоцистеина, токсическими воздействиями, связанными с курением, старением, половыми и гормональными особенностями, диабетом, почечной недостаточностью. Холестерин и липопротеины низкой плотности участвуют в атерогенезе, согласно этой теории, как переносчики гомоцистеина в форме ЛПНП-гомоцистеин-агрегантов.

Суммируя вышесказанное, можно выделить следующие вероятные механизмы атерогенного действия гомоцистеина:

- прямое повреждение клеток эндотелия;
- повышение содержания продуктов перикесного окисления липопротеинов;
- повышение тромбоксанзависимой агрегации тромбоцитов;
- ингибирование экспрессии тромбомодулиан и активации С-протеина;
- повышение связывания липопротеинов с фибрином;

- ускорение пролиферации гладкомышечных клеток;
- инактивация оксида азота.

Остается открытым вопрос, является ли гипергомоцистеинемия самостоятельным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний или повышение уровня гомоцистеина является следствием других состояний, предрасполагающих к развитию ССЗ. Необходимо решить вопрос о целесообразности и способах коррекции этого состояния.

Механизм развития атеросклеротического поражения сосудов при гипергомоцистеинемии остается до конца не ясным. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что продукты аутоокисления гомоцистеина, протекающего с образованием активных форм кислорода, индуцируют формирование атеросклеротической бляшки путем повреждения эндотелия, нарушения целостности сосудистой стенки и стимуляции пролиферации гладкомышечных клеток меди [85].

Воздействие гипергомоцистеинемии на формирование атеросклероза, как правило, осуществляется совместно с другими, в том числе и более значимыми, факторами риска (гиперлипидемия, курение, АГ). Имеются сообщения о том, что в ряде случаев назначение антигиперлипидемических препаратов приводит к увеличению концентрации плазменного гомоцистеина. У пациентов с гиперхолестеринемией лечение фенофибратом приводило к повышению концентрации гомоцистеина в плазме крови в среднем на 46% [75].

Таким образом, воздействие, направленные на устранение одних факторов риска, могут приводить к усилению воздействия других.

1.3. Производные хитозана в качестве гиполипидемических средств

Главной особенностью современной фармакотерапии атеросклероза является борьба с факторами риска, дислипидемией и тромбозом [70].

Лечение обычно начинают с назначения гиполипидемических средств (ГЛС), которые по механизму действия делятся на несколько групп:

1) препараты, тормозящие всасывание холестерина в кишечнике: секвестранты желчных кислот, ситостерин, гуарем.

2) препараты, препятствующие образованию атерогенных липопротеидов: производные фибровой кислоты, никотиновая кислота, вастатины (статины), пробукол.

3) физиологические корректоры липидного обмена, содержащие эссенциальные фосфолипиды и ненасыщенные жирные кислоты: эссенциале, липостабил.

Хитозан - природный полисахарид (пищевое волокно), получаемый из панциря красного краба.

Долгое время пищевые волокна считались ненужным балластом, от которого старались освободить продукты питания для повышения их пищевой ценности. Сегодня ученые доказали, что дефицит пищевых волокон является фактором риска возникновения таких заболеваний, как ожирение, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, аппендицит, желчекаменная болезнь, хронические запоры, варикозное расширение вен, тромбоз вен нижних конечностей и раковые заболевания.

Обогащение рациона питания хитозаном восстанавливает биологическое равновесие путем очищения организма и регуляции обменных процессов.

Хитозан снижает уровень холестерина в крови, насыщает сердечную мышцу энергией, укрепляет стенки кровеносных сосудов, снимает неприятные ощущения в области сердца. Хитозан связывает и выводит из организма излишки желчных кислот, соли тяжелых металлов, радионуклиды, токсичные вещества, а также хитозан усиливает внутрикишечный синтез витаминов В₁, В₂, В₃, РР и фолиевой кислоты.

Внутри организма хитин разлагается на шесть низкомолекулярных глюкозоминов, поэтому он может подавлять раковые клетки. Хитозан подавляет токсин раковых клеток, оживляет лимфатические клетки, способные уничтожить раковые клетки. Хитозан препятствует перемещению клеток, пораженных раком.

Механизм действия наиболее активной растворимой части хитозана. При приеме внутрь, в отличие от большинства видов растительной клетчатки, под воздействием пищеварительных ферментов активная часть Хитозана расщепляется и всасывается в виде низкомолекулярных соединений. В организме человека хитозан оказывает следующее действие:

1. В процессе жизнедеятельности раковых клеток вокруг них создается более кислая среда, что препятствует активности клеток иммунной системы по идентификации и уничтожению измененных раковых клеток. Препарат подавляет размножение раковых клеток путем регуляции рН среды тканей организма в сторону слабощелочной - при которой активность Т-лимфоцитов наибольшая.

2. Препятствует метастазированию раковых клеток.

3. Адсорбирует недоокисленные продукты обмена злокачественных клеток, что является одной из составляющих раковой интоксикации.

4. Снижает артериальное давление путем регуляции уровня холестерина предотвращения развития атеросклероза.

5. Снижает уровень сахара в крови у больных с избыточным весом, то есть дейсует как профилактическое средство при риске развития сахарного диабета.

6. Улучшает микроциркуляцию тканей, во-первых, действуя как чистильщик сосудов, во-вторых, снимая спазм в мельчайших капиллярах.

7. Повышает функциональную активность иммунной системы за счет активизации лимфоцитов.

8. Адсорбирует и выводит из организма соли тяжелых металлов, минеральные удобрения, химические красители, радионуклиды, лекарственные метаболиты и прочее.

9. Активизирует дренажные функции на уровне межклеточного пространства и лимфатической системы.

СОСТАВ: хитин – 15%, хитозан – 85%. Имеет высокую степень очистки – 85%. Имеет высокую степень очистки – 85%. В упаковке 100 капсул.

ДЕЙСТВИЕ: по свойствам похож на человеческий фибрин, при приеме внутрь часть вещества всасывается в кровь в виде низкомолекулярных соединений, другая часть превращается в гелеобразную массу, действуя как мощный сорбент. Всосавшаяся часть подавляет раковые клетки, регулируя рН, подавляет раковую интоксикацию, препятствует метастазированию, блокирует так называемые конъюгационные молекулы, с помощью которых происходит метастазирование; соединяется с желчной кислотой (с помощью которой происходит всасывание холестерина), выводит ее и неизменный холестерин с каловыми массами. Будучи положительно заряжен, препятствует усвоению любых жиров, имеющих отрицательный заряд, снижает кровяное давление, соединяясь с ионом хлора из поваренной соли, выводит его препятствуя образованию ангиотензина – вещества, вызывающего резкий спазм сосудов; снижает уровень сахара в моче, улучшает микроциркуляцию тканей, адсорбирует и выводит соли тяжелых металлов. Нормализует артериальное давление.

Уникальные свойства хитина и хитозана привлекают внимание большого числа специалистов самых разных специальностей. Роль полимеров в нашей жизни является общепризнанной, и все области их применения в быту, промышленном производстве, науке, медицине, культуре трудно даже просто перечислить. Если до XX века человеком использовались полимеры природного происхождения – крахмал, целлюлоза (дерево, хлопок,

лен), природные полиамиды (шелк), природные полимерные смолы на основе изопрена – каучук, гуттаперча, то развитие химии органического синтеза в XX веке привело к появлению в различных областях деятельности человека огромного разнообразия полимеров синтетического происхождения – пластмасс, синтетических волокон и т.п. Происшедший технологический прорыв не только кардинально изменил нашу жизнь, но и породил массу проблем, связанных с охраной здоровья человека и защитой окружающей среды.

Поэтому закономерным является большой интерес науки и промышленности к поиску и использованию полимеров природного происхождения, таких как хитин и хитозан. Эти полимеры обладают рядом интереснейших свойств, высокой биологической активностью и совместимостью с тканями человека, животных и растений, не загрязняют окружающую среду, поскольку полностью разрушаются ферментами микроорганизмов, могут широко применяться в проведении природоохранных мероприятий.

В настоящее время известно более 70 направлений использования хитина и хитозана в различных отраслях промышленности, наиболее важными из которых во всем мире признаны: медицина – в качестве средства борьбы с ожирением, связывания и выведения из организма холестерина, профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, производства хирургических нитей, искусственной кожи, лекарственных форм антисклеротического, антикоагулянтного и антиартрозного действия, диагностики и лечения злокачественных опухолей и язвы желудка; пищевая промышленность – в качестве загустителя и структурообразователя для продуктов диетического питания.

История создания и применения хитозана

Полимеры этой группы заинтересовали ученых-химиков почти 200 лет назад. Хитин был открыт в 1811 году (H. Braconnot, A. Odier), а хитозан в

1859 году (С. Rouget), хотя свое нынешнее название получил в 1894 году (F. Hoppe-Seyler). В первой половине XX века к хитину и его производным был проявлен заслуженный интерес, в частности, к нему имели отношение три Нобелевских лауреата: E. Fischer (1903) синтезировал глюкозамин, P. Karrer (1929) провел деградацию хитина с помощью хитиназы и, наконец, W.N. Haworth (1939) установил абсолютную конфигурацию глюкозамина. Биологически активные свойства хитина и его производного – хитозана – начали изучаться в 1940-50 годах. В Советском Союзе эти исследования проводились учреждениями Министерства обороны и имели закрытый характер. Последнее было связано со способностью хитозана эффективно связывать радиоактивные изотопы и тяжелые металлы, поэтому хитозан исследовался прежде всего как эффективный радиопротектор и детоксикант, а также исследовались возможности применения его для дезактивации объектов, подвергавшихся радиоактивному заражению.

Новый всплеск интереса к производным хитина и, в частности, хитозану произошел в 70-е годы, когда результаты исследований этих соединений начали появляться в открытой печати. Проведенные во всем мире исследования показали уникальные сорбционные свойства хитозана. Обнаружилось отсутствие выраженной субстратной специфичности этого вещества, что означает примерно одинаковую способность связывать как гидрофильные, так и гидрофобные соединения. Кроме того, у хитозана были обнаружены ионообменные, хелатообразующие и комплексообразующие свойства. В дальнейших исследованиях была показана антибактериальная, антивирусная и иммуностимулирующая активность. Комплексные формы хитозана также проявляют высокие антиоксидантные свойства, что нашло свое применение в лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, в лечении механической и ожоговой травмы.

О большом интересе к проблемам изучения этих биополимеров, технологии их получения и использования свидетельствуют восемь

международных конференций по хитину и хитозану, проведенных за последние 27 лет: США (1977), Япония (1982), Италия (1985), Норвегия (1988), США (1991), Польша (1994), Франция (1997).

В России за прошедшие годы хитину и хитозану были посвящены семь конференций: Владивосток (1983), Мурманск (1987), Москва (1991, 1995, 1999 и 2001), Санкт-Петербург 2003, из которых две последних имели статус международных. Весной 2000 года было создано Российское Хитиновое Общество, объединившее более 50 региональных отделений. Все это говорит о нарастающем интересе к хитину и хитозану не только химиков, но и специалистов самого разного профиля – медиков, биологов, микробиологов и биотехнологов.

Химическое строение и свойства хитина и хитозана

Хитин является главным компонентом панцирей ракообразных и насекомых. По химической структуре он относится к полисахаридам, мономером хитина является N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин.

При деацетилировании хитина получается хитозан. По химической структуре хитозан является сополимером D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. В зависимости от эффективности реакции деацетилирования получают хитозаны с различной степенью деацетилирования. Степень деацетилирования показывает процентное содержание D-глюкозамина в молекуле хитозана, т.е. если речь идет о хитозане со степенью деацетилирования 85%, то это означает, что в молекуле хитозана в среднем содержится 85% D-глюкозаминовых остатков и 15% N-ацетил-D-глюкозаминовых остатков.

Химические свойства хитозана связаны с его химической структурой. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана определяет его свойство связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд, поэтому хитозан является прекрасным катионитом. Кроме того, свободные аминогруппы определяют хелатообразующие и

комплексообразующие свойства хитозана. Сказанное объясняет способность хитозана связывать и прочно удерживать ионы металлов (в частности радиоактивных изотопов и токсичных элементов) за счет разнообразных химических и электростатических взаимодействий.

Большое количество водородных связей, которые способен образовать хитозан, определяют его способность связывать большое количество органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальные токсины и токсины, образующиеся в толстом кишечнике в процессе пищеварения.

С другой стороны, обилие водородных связей между молекулами хитозана приводит к его плохой растворимости в воде, поскольку связи между молекулами хитозана более прочные, чем между молекулами хитозана и молекулами воды. Вместе с тем, хитозан набухает и растворяется в органических кислотах – уксусной, лимонной, щавелевой, янтарной, причем при набухании он способен прочно удерживать в своей структуре растворитель, а также растворенные и взвешенные в нем вещества. Хитозан также способен связывать предельные углеводороды, жиры и жирорастворимые соединения за счет гидрофобных взаимодействий и сетчатой структуры, что сближает его по сорбционным механизмам с циклодекстринами.

Расщепление хитина и хитозана до N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина происходит под действием микробных ферментов – хитиназ и хитобиаз, поэтому они полностью биологически разрушаемы и не загрязняют окружающую среду.

Таким образом, хитозан является универсальным сорбентом, способным связывать огромный спектр веществ органической и неорганической природы, что определяет широчайшие возможности его применения в жизни человека.

Несмотря на огромную литературу о связи сорбционных свойств хитозана с его химической структурой, нельзя сказать, что исследования в области химии хитина/хитозана близки к завершению. Постоянно открываемые новые свойства этого вещества, в частности, обнаруженная биологическая активность еще не получила должного объяснения с точки зрения химической структуры. Имеющиеся данные, что характер биологической активности хитозана зависит от его молекулярного веса и степени деацетилирования, нуждаются в дальнейшей проверке и изучении. Этот обзор является тем более актуальным, что выяснение связи химического строения и биологической активности позволит создавать вещества, сохраняющие известные свойства хитозана и обладающие новыми полезными качествами.

В отечественной литературе есть информация о синтезе четвертичных аммониевых соединений хитозана с применением органических оснований, и исследования, посвященные свойствам полученных соединений. Для синтеза применялись перегнанные сухие метил- и этилиодид. Йодистоводородную кислоту, образующуюся во время реакции, связывали органическими основаниями: пиридином, 2,4-лутидином, 2,4,6-коллидином и триэтиламином. Полученное соединение выделяли из реакционной смеси фильтрованием, отмывали метанолом, сушили.

Было установлено, что pK_a хитозана 6.30. Был сделан вывод, что повышение степени N-алкилирования будет наблюдаться при использовании оснований с $pK_a > 6.30$. опыты показали, что наиболее глубоко реакция идет в присутствии триэтиламина, pK_a которого гораздо выше, чем у хитозана. Установлено, что N-триметил- и N-триэтилхитозаны являются полиэлектролитами и их основность увеличивается с ростом степени замещения [48].

В настоящее время для коррекции нарушений в иммунной системе при различных патологиях (инфекционные болезни, злокачественные

новообразования, соматические, хирургические и др. заболевания) применяются вещества растительного происхождения или полученные синтетическим путем. Ранее экспериментально на различных моделях вторичных иммунодефицитов (острый и хронический токсический гепатит, опухоленосительство, лучевая болезнь, гемолитическая анемия и др.) были изучены биологические свойства веществ, выделенных из лимфоидных и лимфоидных органов разных видов животных и птиц, таких как овца, черепаха, верблюд, цыплята. Изучено их действие на иммунную и кроветворную систему на органном и клеточном уровнях.

Большой научный и практический интерес представляет изучение полисахаридных соединений, выделенных из хитина различных видов организмов. В настоящее время химически охарактеризован ряд полисахаридов, полученных из хитина куколок тутового шелкопряда [54] вместе с тем в литературе практически отсутствуют сведения, касающиеся изучения действия природных полисахаридов, в частности хитозана и его комплексов с микроэлементами, на иммунную систему при вторичных иммунодефицитных состояниях различной этиологии. Важным аспектом исследований является сравнительное изучение в эксперименте иммуностропных свойств металлосодержащих комплексов хитозана при опухоленосительстве, острых патологиях печени, гемолитической анемии, лучевой болезни. Решение этих вопросов позволит в перспективе разработать новые малотоксичные высокоэффективные иммуномодулирующие лекарственные препараты, как для лечения, так и для профилактики различных иммунодефицитных состояний [66].

Сульфат хитозана (СХ) проявляет выраженную антикоагулянтную активность и может быть использован в качестве, заменителя природного антикоагулянта крови гепарина, дорогостоящего и дефицитного продукта, извлекаемого, главным образом, из слизистых оболочек и других органов животных. Однако широко применяемый антикоагулянт прямого действия,

нефракционированный гепарин обладает рядом побочных нежелательных эффектов, таких как остеопорозы, тромбоцитопении, геморрагические осложнения и т.д. В настоящее время в мировой практике показано, что низкомолекулярные гепарины и гепариноиды имеют ряд преимуществ перед инфракционированным гепарином.

Как отмечалось выше, СХ, обладая антикоагулянтной активностью, имеет перед гепарином преимущество не только в меньшей стоимости, но и в возможности направленного изменения его строения и свойств в процессе синтеза. Принципиально получение низкомолекулярного СХ может быть осуществлено разными путями: использованием в качестве исходного сырья низкомолекулярного хитозана, снижением молекулярной массы препарата в ходе синтеза, деполимеризации и фракционированием получаемого продукта [58].

Современные медикаментозные средства борьбы с таким распространенным заболеванием, как гиперхолестеринемия, вызывающим нарушение деятельности сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем организма человека, предусматривают использование либо лекарственных препаратов, либо энтеросорбентов – биологически активных добавок к пище.

Действие первых, например ингибиторы липаз Ксеникала, основано на нарушении естественного цикла переваривания пищи и усвоения липидов, действие вторых – на сорбции ТГ и (или) отдельных классов липидов ЖКТ человека. Очевидно первый путь наиболее опасен для здоровья человека.

Полисахарид хитин и особенно его дезацетилированная производная – хитозан зарекомендовали себя как наиболее перспективные энтеросорбенты из класса природных пищевых волокон, так как они не только сорбируют липиды, но и реагируют липидный обмен, снижая уровень ХС в крови, выводят из организма ионы тяжелых и переходных металлов и радионуклеидов, повышают иммунитет [52].

На основе хитина и хитозана были созданы целые серии БАД к пище, обладающие липотропным действием.

Хитозан обладает на порядок более высокими сорбционными свойствами в отношении ионов металлов, ТГ и жирных кислот, чем хитин. Однако из-за растворимости хитозана в желудке не исключена опасность проникновения его низкомолекулярной фракции через стенки ЖКТ в кровотоки. Кроме этого, установлено его отрицательное действие на естественную микрофлору кишечника [47] и способность снижать кислотность желудка, что нежелательно для людей с пониженной и нормальной кислотностью.

Многими исследователями показано, что хитин содержащие материалы существенно превосходят по эффективности связывания липидов (5-10 раз) в другие полисахариды, понижают уровень ЛПНП и ТГ и увеличивают концентрацию ЛПВП в крови [25].

Таким образом, хитозан является универсальным сорбентом, способным связывать огромный спектр веществ органической и неорганической природы, что определяет широчайшие возможности его применения в жизни человека. Хитозан, растворимый в кислых растворах, имеет широкие возможности для применения в различных отраслях народного хозяйства и, в частности, в медицине.

В литературе имеются единичные сведения о низкой токсичности Сульфопарина и его использование в медицине в эксперименте на лабораторных животных. Однако нет сведений о характере и выраженности повреждающего действия Сульфопарина на организм экспериментальных животных и оценки его безопасности.

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объект исследований - Сульфопарин препарат, предназначенный для использования в качестве противосклеротического средства. Разработано лекарственное средство Сульфопарин в Институте химии и физики полимеров АНРУз. Для этой цели в работе был использован сульфат хитозана – рабочее название препарата «Сульфопарин», полученный реакцией сульфатирования хитозана в среде хлорсульфоновой кислоты. Образование сульфата хитозана установлено по данным элементного анализа, степень сульфатирования определена методом кондуктометрического титрования. ИК-спектроскопическими исследованиями и рентгеноструктурным анализом установлена структура сульфопарина [8].

Специфическое гиполипидемическое действие двух концентраций сульфата хитозана (препарат 1 – 500 МЕ/кг и препарат 2 – 1000 МЕ/кг) было исследовано на модели экспериментального атеросклероза. Исследования проведены на 46 кроликах породы Шиншилла весом 2,5-3,0 кг. Модель гиперхолестеринемии воспроизведена внутрижелудочным введением холестерина в растительном масле ежедневно в течение 3 месяцев по 200 мг/кг массы тела. Через 3 месяца от начала эксперимента кролики были разделены на 4 группы: 1 группа – контрольная (8 кроликов), которым продолжали вводить холестерин в подсолнечном масле; 2 группа (сравнение) – 8 кроликов, которым после создания гиперхолестеринемии каждый день в течение 2 месяцев вводили по 100 мг/кг гиполипидемический препарат гемфибразил; 3 и 4 группы – по 8 кроликов, которые после создания гиперхолестеринемии получали по 0,25 мл/кг препарат-1 и -2. Липидный спектр сыворотки крови исследовали на 90 и 150 сутки от начала эксперимента.

Токсикологические исследования проведены на различных видах лабораторных животных обоего пола: на 80 белых мышах, 212 белых крысах, и 27 кроликах.

2.2. Методы исследований

Определение общего холестерина, проводили на анализаторе фирмы «Human» (Германия) с использованием специальных наборов и программ. Содержание ХС в ЛПВП определяли в надосадке после осаждения ХС ЛПНП и ЛПОНП гепарином в присутствии ионов Mn^{2+} [9]. Содержание холестерина, входящего в состав ЛПНП и ЛПОНП, рассчитывали по формуле А.И. Климова [10].

Острую внутрижелудочную токсичность препарата изучали на 60 белых мышах обоего пола с массой тела 18-22 г. Животных разделили на 6 групп по 10 особей в группе. Животным 5 опытных групп натошак вводили водный раствор препарата в желудок при помощи шприца с металлическим зондом (игла с тупым концом) в дозах: 1000; 1500; 2000; 2500; 3000 мг/кг массы тела. Большие дозы препарата вводили в два приема с интервалом в 1 час. Животные находились под ежечасным наблюдением в течение первого дня эксперимента в лабораторных условиях и в дальнейшем в динамике в течение 2-3 недель. Учитывали внешний вид и поведение животных, состояние шерстяного покрова и видимых слизистых оболочек, отношение к пище, подвижность, ритм и частоту дыхания. Обращали внимание на время возникновения и характер интоксикации, оценивали её тяжесть, обратимость, определяли срок гибели животных. На основании полученных данных при помощи статистической обработки методом В.Б. Прозоровского вычисляли величины LD_{50} [1,2,3,7]

При оценке токсичности препарата учитывалась максимально-переносимая и абсолютно-смертельная дозы. Расчет ошибки LD_{50} проведен по одному из наиболее распространенных методов, предложенных Миллером

и Тейтнером, определением ЛД₄, ЛД₈ и ЛД₁₆. Разность между этими дозами равна величине двух средних квадратичных ошибок.

Шестая группа животных служила контролем. Все экспериментальные животные содержались в одинаковых условиях вивария на сбалансированном рационе питания по содержанию белков, жиров и углеводов со свободным доступом к воде и пище.

Изучение **кожно-резорбтивного действия** препарата «Сульфопарин» проводили на 6 белых крысах с массой тела 140-160 грамм, которых фиксировали в специальных станках, хвосты животных погружали в пробирки с исследуемым препаратом на 2/3 длины хвоста. Пробирки помещали в водяную баню с температурой 28-30° С. Время экспозиции 4 часа. После окончания эксперимента кожу хвостов обмывали теплой водой с мылом. За животными проводили наблюдение в течении 3-х недель.

Исследования **однократного местно-раздражающего действия** препарата «Сульфопарин» проводилось на 6 белых крысах с массой тела 130-145 грамм, которым на выстриженный участок кожи размером 2x2 см наносили препарат в виде раствора. Животных фиксировали в течение 4-х часов. Реакция кожи регистрировалась по окончании экспозиции через 1 и 16 часов после аппликации.

Исследования **многократного местно-раздражающего действия** препарата «Сульфопарин» на кожу проводились на 10 белых крысах с массой тела 130-140 грамм, которым на выстриженный участок кожи размером 2x2 см наносили препарат в виде раствора ежедневно 1 раз в сутки в течении 20 дней. Животных фиксировали в течение 4-х часов. Реакция кожи регистрировалась по окончании экспозиции через 1 и 16 часов после аппликации. ^ Другие 20 белых крыс служили контролем. Критериями токсичности служили: поведение животных, выживаемость, время наступления смертельных исходов, появление симптомов интоксикации, местные изменения на коже Эмбриотоксичность и терратогенность

Сульфопарина была изучена на 300 белых беспородных крысах самках. Исследование влияния Сульфопарина на репродуктивную функцию крыс проведено на 30 самцах и 60 самках массой 160-180 г

Полученные результаты исследований подвергали статистической обработке. Использовались методы вариационной статистики с расчетом средней арифметической изучаемого показателя (M), среднего квадратического отклонения, стандартной ошибки среднего (t), относительных величин (%); статистическая значимость, полученных измерений, при сравнении средних величин определяли по критерию Стьюдента (T) с вычислением вероятности ошибки (P) при проверке нормальности распределения (по критерию эксцесса) и равенства генеральных дисперсий (P - критерий Фишера). За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $P < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Экспериментальное обоснование эффективности применения производных хитозана в лечении гиперхолестеринемий

Проведенные эксперименты показали, что 3-х месячное экзогенное введение подопытным животным холестерина сопровождалось серьезными сдвигами в изучаемых показателях липидного обмена (табл. 3.1). Так, содержание общего ХС в сыворотке крови достоверно увеличивалось в 1,55 раза. Поскольку одним из ведущих факторов риска развития атеросклероза является не только повышение уровня холестерина, а прежде всего, атерогенный сдвиг в липопротеидном спектре крови, поэтому в эксперименте исследовались изменения содержания ХС в ЛПНП, ЛПОНП и ЛПВП. Экзогенное введение холестерина кроликам в течение 90 дней привело к увеличению содержания холестерина в ЛПОНП в 2,06 раза ($P < 0,001$), в ЛПНП – в 2,09 ($P < 0,001$) раза, в то время как ХС в ЛПВП снизился в 1,85 ($P < 0,01$) раза. Полученные результаты показывают, что экспериментальная гиперхолестеринемия характеризуется изменением содержания ОХС и нарушением содержания холестерина в липопротеиновом спектре крови.

В настоящее время есть все основания считать ЛПВП антиатерогенной. Уменьшение количества ЛПВП является фактором, способствующим развитию атеросклероза. Наряду с этим увеличение содержания ХС в ЛПНП способствует развитию атеросклероза. Единой теории, объясняющей антиатерогенное действие ЛПВП или их предшественников, нет. Однако твердо установлено, что низкое содержание ЛПВП отражает состояние, способствующее развитию атеросклероза, и наоборот, высокий их уровень – состояние, препятствующее развитию атеросклероза и ИБС. Наиболее опасна для организма ситуация, когда высокий уровень ЛПНП или ЛПОНП сочетается с низким содержанием ЛПВП [9]. Ключевым в атеросклеротическом воспалении считается снижение рецепторного

Таблица

Влияние гиполипидемических препаратов на некоторые показатели липидного спектра сыворотки крови кроликов с экспериментальной гиперхолестеринемией ($M \pm m$)

Группы	Общий холестерин, ммоль/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ХС ЛПНП, ммоль/л	ХС ЛПОНП, ммоль/л
Интактная	4,82±0,07	1,68±0,06	2,71±0,16	0,33±0,02
Контрольная	7,49±0,25 ^а	0,91±0,09 ^а	5,67±0,17 ^а	0,68±0,05 ^а
Гемфибразил	5,53±0,17 ^{а,б}	1,57±0,12 ^б	4,16±0,13 ^{а,б}	0,47±0,02 ^{а,б}
Сульфаторин-500	4,28±0,11 ^{а,б,в}	1,36±0,11 ^{б,в}	3,44±0,22 ^{а,б,в}	0,32±0,01 ^{б,в}
Сульфаторин-1000	3,27±0,21 ^{а,б,в,г}	1,75±0,04 ^{б,г}	2,59±0,13 ^{б,в,г}	0,27±0,02 ^{б,в}

Примечание: а – различия от интактной группы, б – от контрольной,

в – от группы гемфибразила,

г – от сульфаторина-500 достоверны, $P < 0,05$.

поглощения клетками ЛПНП из-за блокады, уменьшения числа рецепторов и других причин. Его прямые следствия – накопление в крови и тканях, прежде всего в стенке артериальных сосудов ЛПНП с дефицитом в клетках эссенциальных полиненасыщенных жирных кислот. Многочисленные клинические и популяционные исследования подтвердили, что, активируя синтез ХС в клетках, повышается уровень ХС в липопротеинах крови и интерстициальной среде.

Коррекция экспериментальной гиперхолестеринемии в течение 2 месяцев гиполипидемическими препаратами оказала позитивное влияние на показатели липидного обмена. Содержание общего ХС достоверно снижается в 1,35 ($P<0,05$); 1,75 ($P<0,01$) и 2,29 раза ($P<0,001$), соответственно в группах, получавших гемфибразил, сульфаторин-500 и сульфаторин-1000, по сравнению с контрольной группой. При этом уровень ХС ЛПНП снизился в 1,36 ($P<0,05$); 1,65 ($P<0,05$) и 2,19 ($P<0,01$) раза, соответственно группам. Содержание ХС в ЛПОНП также снизилось в 1,45 ($P<0,05$); в 2,13 ($P<0,01$) и 2,52 раза ($P<0,001$), а ХС в ЛПВП возрос в 1,72 раза ($P<0,05$), а при введении сульфаторина-500 и сульфаторина-1000 это повышение составило в 1,49 ($P<0,05$) и 1,92 раза ($P<0,01$), соответственно, по сравнению с животными контрольной группы.

Однако гемфибразил оказывал более слабое позитивное влияние на липопротеидный спектр сыворотки крови. Полученные нами данные перекликаются с литературными, в которых показано, что механизм действия фибратов связан увеличением активности рецепторов, захватывающих ЛПНП, однако оно проявляется слабо. С другой стороны, фибраты снижают активность ГМГ-СоА-редуктазы и тем самым тормозят синтез ХС в печени лишь при длительном применении. Препарат эффективен при низком ХС ЛПВП, повышенном ХС ЛПНП и гипертриглицеридемии (III, IV, V типы дислипидемии) без признаков коронарной болезни. Из побочных

действий наиболее выраженным является поражение мышечной системы, образование холестериновых камней.

При введении сульфаторина в различных концентрациях по сравнению с гемфибрилом статистически достоверно снизился уровень ХС в ЛПОНП и ЛПНП, соответственно повысился уровень ХС в ЛПВП, приближаясь к нормативным величинам, что свидетельствует о более высоком гипохолестеринемическом действии препарата. Хитозан обладает биосовместимостью с живыми тканями (не вызывает аллергических реакций и отторжения); биodeградируемостью (разлагается под действием ферментов); биоинертностью (не токсичен, легко выводится из организма); бактериостатичностью (тормозит рост и размножение бактерий) [11]. Благодаря своей уникальной поликатионитной фибриллярной структуре, хитозан обладает хорошей адгезией; способностью поглощать холестериновый комплекс низкой плотности. В настоящее время накоплен обширный материал по исследованию хитина, хитозана и их производных, в частности, особый интерес представляет водорастворимое производное хитозана – сульфат хитозана, который может использоваться для получения биологически активных соединений, обладающих антикоагулянтным, антисклеротическим и противовирусным действием, а также повышенной способностью специфично связывать ЛПНП из крови.

Таким образом, на основании полученных данных можно сказать, что в отличие от гемфибрила, сульфаторин обладает выраженным гипохолестеринемическим действием на модели гиперхолестеринемии. Его гипохолестеринемические свойства зависят от концентрации и превосходят фибратов. Сульфаторин достоверно снижает высокий уровень холестерина в липопротеидах низкой и очень низкой плотности, повышает низкие его значения в липопротеидах высокой плотности у кроликов с гиперхолестеринемией.

3.2. Результаты исследования острой и хронической токсичности сульфопарина

Проведенный эксперимент показал, что у животных 1-ой группы после введения водной раствор препарата в дозе 1000 мг/кг массы тела животных изменений в поведении и функциональном состоянии не наблюдалось. Однако, с увеличением дозы животные становились вялыми, малоподвижными, живо реагировали на внешние раздражители: громкий звук, стук по столу, раздражение хвоста. Аппетит у животных нарушался, некоторые из них отказывались от пищи, вид животных становился неопрятный, шерсть взъерошенной. Гибель животных наступала от остановки дыхания. На таблице 3.2 представлена зависимость сроков гибели животных от вводимой дозы препарата «Сульфопарина».

Таблица 3.2

Зависимость сроков гибели белых мышей от вводимой дозы препарата Сульфопарина

Доза препарата, в мг/кг м.т.	Количество животных в группе	Сроки гибели			Всего Погибло	Процент гибели
		В течение 1-х суток	В течение 3-х суток	В последующие дни		
1000	10	0	0	0	0	0
1500	10	0	1	1	2	20
2000	10	0	3	1	4	40
2500	10	1	4	1	6	60
3000	10	2	7	1	10	100

Определены максимально-переносимая доза препарата на уровне 1000 мг/кг м.т. и абсолютно-смертельная доза - на уровне 3000 мг/кг. Параметры острой токсичности препарата «Сульфопарин» при однократном внутрижелудочном введении белым мышам представлены в таблице 5.3.

Таблица 5.3

Параметры острой токсичности препарата «Сульфопарин» при однократном внутрижелудочном введении белым мышам, мг/кг.

Наименование вида животных	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
Белые мыши	1450	2150(2425,4-1874,6)	2800

Средне-смертельная доза (ЛД₅₀) препарата «Сульфопарин» - 2150 (2425,4-1874,6) мг/кг. Следовательно, по классификации лекарственных средств по токсичности препарат «Сульфопарин» относится к малотоксичным веществам (IV класс) [1,2,3].

Оценивая токсичность лекарственных соединений нельзя полностью полагаться на данные острых опытов, так как установлено, что вещества малотоксичные при разовом введении могут оказаться высоко опасными при повторном воздействии на организм. Хроническое отравление возможно в случае материальной или функциональной кумуляции веществ в организме [1,2]. Изучение кумулятивных свойств Сульфопарина было проведено по Лиму, позволяющее оценить не только кумуляцию, но и привыкание. Опыты были проведены на 10 мышах обоего пола массой тела - 18-20г. Продолжительность эксперимента 28 дней.

Препарат вводили внутрижелудочно по следующей схеме (табл.3.4).

Таблица 3.4.

Схема введения препарата «Сульфопарин»

Дни введения	Число животных	Доля от ЛД ₅₀	ЛД ₅₀ = 2150мг/кг
1-4	0/10	0,1	215,0
5-8	0/10	0,15	322,5
9-12	0/10	0,22	473,0
13-16	0/10	0,34	731,0
17-20	0/10	0,50	1075,0
21-24	1/10	0,75	1612,5
25-28	3/10	1,15	2472

$K_k = \text{ЛД}_{50п} / \text{ЛД}_{501}$ где K_k - коэффициент кумуляции, $\text{ЛД}_{50п}$ - средняя смертельная доза при п - кратном введении, ЛД_{50} - средняя смертельная доза при однократном введении. Установлено, что $K_k > 1$ - привыкание; $K_k < 1$ - кумуляция. Следовательно, Сульфопарин не обладает кумулятивным действием.

Параметры хронической токсикометрии Сульфопарина ранее не были изучены, что и послужило основанием для проведения исследований. Токсикологические исследования Сульфопарина проводили на 80 белых крысах с массой тела 110-120 грамм, которые внутрижелудочно ежедневно в течение 3-х месяцев получали водные растворы препарата. Животные были разбиты на 4 группы по 20 животных в группе.

1-ая группа животных получала Сульфопарин в дозе 500 мг/кг; 2-ая группа получала Сульфопарин в дозе 100,0 мг/кг; 3-ья группа получала Сульфопарина в дозе 25 мг/кг; 4-ая группа служила контролем.

Показателями токсичности служили: поведение животных, выживаемость, время наступления смертельных исходов, появление симптомов интоксикации, динамика массы тела, содержание гемоглобина,

эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови, активность щелочной фосфатазы, АСТ и АЛТ, каталазы. Исследования показателей проводили после завершения эксперимента.

Содержание гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови исследовали классическим, общепринятым; активность ферментов щелочной фосфатазы, АСТ, АЛТ в сыворотке крови - биотестами фирмы Лахема (Чехия).

Исследования физиологических и биохимических показателей проводили после завершения эксперимента.

За время эксперимента общее состояние опытных животных не нарушалось, симптомов интоксикации не выявлено, гибели животных не было. На коже местных изменений не обнаруживалось, мест очагового облысения и язв не отмечалось. Животные были опрятны, шерстяной покров гладкий, блестящий, корм охотно поедали, активны, адекватно реагировали на внешние раздражители.

Таблица 5.5

Динамика массы тела белых крыс при внутрижелудочном многократном введении в течение 3 -х месяцев Сульфопарина в различных дозах, г.

Наименование групп животных	Стат. показатели	Время исследований (месяцы)				
		Фон	1	2	3	Восст. период
Контроль	M±m	140±4,1	148±4,3	157±4,2	165±7,6	173±7,9
Сульфопарин, Доза 500 мг/кг	M±mP	142±6,6 >0,05	151±Ю,1 >0,05	159±7,8 >0,05	164±6,1 >0,05	171±6,5 >0,05
Сульфопарин, Доза 100 мг/кг	M±mP	141±9,9 >0,05	149±12,2 >0,05	155±4,8 >0,05	167±5,8 >0,05	170±7,2 >0,05
Сульфопарин, доза 25,0 мг/кг	M±mP	143±7,9 >0,05	147±5,6 >0,05	158±7,2 >0,05	163±4,9 >0,05	174±7,4 >0,05

Как видно из данных, представленных в таблице 5.5, статистически достоверных отставаний прироста массы тела у всех опытных животных по сравнению с контрольными животными - не установлено.

Изучена динамика содержания гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови, которая не выявила статистически значимых различий у животных опытной группы по сравнению с контрольными данными (табл. 5.6).

Таблица 5.6.

Содержание гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3-х месяцев

Сульфопарина

Наименование групп Животных	Статист, показатели	Гематологические показатели		
		Содержание гемоглобина, г/л	Содержание эритроцитов, Г/л	Содержание лейкоцитов, Т/л
Контроль	M±m	127,0 ±5,8	4,90±0,19	8,09±0,3
Сульфопарин, доза 500 мг/кг	M±mP	130,0 ±5,5 >0,05	4,87 ± 0,25 >0,05	8,16±0,31 >0,05
Сульфопарин, доза 100 мг/кг	M±mP	129,0 ±3,6 >0,05	4,85 ± 0,44 >0,05	8,17±0,17 >0,05
Сульфопарин, Доза 25,0 мг/кг	M±mP	131,0±9,1 >0,05	4,82 ± 0,4 >0,05	8,14±0,32 >0,05

Данные изучения биохимических показателей сыворотки крови опытных и контрольных животных представлены в таблице 5.7.

Таблица 5.7

Биохимические показатели сыворотки крови белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3 -х месяцев Сульфопарина

Наименование групп животных	Стат. показатели	Биохимические показатели			
		Активность щелочной	Активность АСТ, ммоль/л.ч	Активность АЛТ, ммоль/л.ч	Активность каталазы, Мкат/л
		фосфатазы, моль/л.ч			
Контроль	М±м	0,37±0,01	0,31±0,02	0,23±0,025	23,01±2,14
Сульфопарин, доза 500 мг/кг	М±мР	0,34±0,01 >0,05	0,33±0,04 >0,05	0,21±0,019 >0,05	20,05±1,36 >0,05
Сульфопарин, доза 1 00 мг/кг	М±мР	0,35±0,01 >0,05	0,35±0,06 >0,05	0,19±0,017 >0,05	22,04±1,49 >0,05
Сульфопарин, доза 25,0 мг/кг	М±мР	0,38±0,02 >0,05	0,30±0,04 >0,05	0,22±0,013 >0,05	21,04±1,16 >0,05

Полученные данные, у опытных животных по изучению активности ферментов щелочной фосфатазы, АСТ, АЛТ и каталазы в крови не отличались от контрольных значений. Из данных, представленных в таблице 5.7, видно, что статистически достоверные различия в активности изученных ферментов в крови опытных крыс по сравнению с контрольными результатами, не установлены.

Анализ функционального состояния почек крыс через 3 месяца после в/ж введения Сульфопарина в дозах 500,0 мг/кг массы тела, 100,0 мг/кг массы тела и 25,0 мг/кг массы тела показал, что диурез опытных крыс не отличался статистически от контрольных крыс. Состояние азотистого обмена, критерием которого служит содержание мочевины в крови, не имело отклонений от контроля. Сахар и белок в моче как в опытной, так и контрольной группы отсутствовали в течении всего эксперимента.

Кислотность мочи во всех изученных группах не изменилась в течении всего опыта и её кислотность (рН) составила 7,0 (табл. 5.8).

Таблица 5.8

Некоторые показатели функции почек у подопытных и контрольных крыс, через 3 месяца после в/ж введения Сульфопарина в дозах 500,0 мг/кг, 100,0 мг/кг и 25,0 мг/кг массы тела

Группы животных	Доза препарата мг/кг	Диурез через 4 часа, %	Мочевина крови, ммоль/л
1. Контроль	0	91±1,6	4,6±0,13
2. Сульфопарин	500,0	90±1,3 P>0,05	4,7±0,12 P>0,05
3. Сульфопарин	100,0	89±1,88 P>0,05	4,8±0,13 P>0,05
4. Сульфопарин	25,0	89±1,45 P>0,05	4,5±0,31 P>0,05

Примечание: P>0,05 по отношению к контролю

Патологических изменений в содержании осадков мочи не обнаружено. Получаемые результаты позволяют сделать вывод и том, что препарат не оказывает токсического действия на функции почек.

Таким образом, установлено, что Сульфпарин не обладает токсическим эффектом во всех изученных дозах.

Общий осмотр тел животных белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3-х месяцев Сульфопарина показал отсутствие макроскопически распознаваемых отклонений по сравнению с животными контрольной группы. Все животные имели правильное телосложение, опрятный вид, блестящий шерстяной покров, очагов облысения или язв не обнаружено. Видимые слизистые оболочки влажные, бледно-розового цвета, блестящие и гладкие на вид. Масса внутренних органов белых крыс при макроскопическом патологоанатомическом исследовании при вскрытии

животных после окончания эксперимента показало, что изменений у опытных животных не выявлено (табл. 5.9).

Таблица 5.9

Масса внутренних органов белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3 -х месяцев Сульфопарина, г.

Наименование групп животных	Печень	Почки	Селезенка	Сердце	Головной мозг	Легкие
Контроль	46,78	7,50	4,81	4,35	10,02	12,1
Сульфопарин, доза 500 мг/кг	46,75	7,44	4,90	4,31	10,23	12,3
Сульфопарин, доза 100 мг/кг	46,70	7,48	4,94	4,32	10,20	12,4
Сульфопарин, доза 25,0 мг/кг	46,79	7,46	4,92	4,36	10,21	12,6

Таким образом, проведенный комплекс токсикологических, физиологических и биохимических исследований позволяет сделать вывод о том, что хроническое внутрижелудочное воздействие Сульфопарина в дозах 500,0 мг/кг, 100,0 мг/кг и 25,0 мг/кг массы тела не вызывают интоксикации и не оказывают негативного воздействия на организм экспериментальных животных.

3.3. Результаты аллергологических и сенсibiliзирующих свойств сульфопарина

При нанесении на кожу препарата «Сульфопарин» преследовалась цель выяснить, обладает ли вещество кожно-резорбтивным, местно-раздражающим действием при однократном и многократном воздействии.

Оценка кожно-резорбтивного действия препарата «Сульфопарин»
Результаты проведенных исследований на белых крысах показали, что за время наблюдения в течении 3-х недель симптомов интоксикации у опытных животных и их гибели не выявлено. Животные оставались активными, охотно поедали корм, адекватно реагировали на внешние раздражители. Следовательно, препарат «Сульфопарин» токсичным кожно-резорбтивным действием не обладает.

Оценка однократного и многократного местно-раздражающего действия препарата «Сульфопарин» на кожу. При однократном и многократном нанесении на кожу белых крыс на выстриженный участок препарата «Сульфопарин» установлено, что вещество не вызывает раздражения кожных покровов, симптомов интоксикации и гибели животных не отмечено.

Таким образом, определено, что препарат «Сульфопарин» местно-раздражающим действием не обладает.

Оценка однократного местно-раздражающего действия препарата «Сульфопарин» на слизистые оболочки глаз. В конъюнктивный мешок левого глаза 3-х кроликов однократно вносили 2 капли раствора препарата «Сульфопарин». Правый глаз служил контролем. При внесении оттягивали внутренний угол конъюнктивного мешка глаза, закапывали препарат, а затем в течение 1 минуты прижимали слезноносовый канал. Наблюдение проводили в течении 7 дней. За весь период наблюдения раздражения не выявлено. Состояние век, склеры, роговицы и ширина зрачка опытного левого глаза не отличались от правого контрольного.

Следовательно, препарат не обладает раздражающим действием на слизистые оболочки глаз.

Исследование сенсibiliзирующих свойств препарата Сульфопарина. Конъюнктивальная проба является очень чувствительным тестом и в ряде случаев даже позволяет выявить реакцию животных на аллерген при слабой алергизации и отрицательных кожных тестах.

Опыт был поставлен на 10 кроликах, массой 2,5-3,0 кг, которым в левый глаз закапывали 0,01 и 0,1% раствор препарата, во второй глаз (контрольный) вводили 1 каплю физиологического раствора. Реакцию учитывали через 15 минут (быстрая реакция) и через 24-48 часов (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивали по следующей шкале (в баллах) [4]:

- 1 – легкое покраснение слезного протока;
- 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;
- 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

Кроме того, учитывали степень гиперемии, отечность, лакримацию. Результаты наблюдений показали, что Сульфопарин ни через 15 минут, ни через 24 и 48 часов не вызывает даже легкого покраснения.

На основании этого можно сделать заключение, что препарат Сульфопарин в 0,1% и 0,01% концентрациях не обладает раздражающим действием.

Анафилактический шок. В опыт было взято 30 морских свинок массой 220 ± 20 г. По 6 в каждой группе (5 групп). Морским свинкам вводили препарат Сульфопарин внутримышечно в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг.

Сенсибилизацию проводили по следующей схеме: первая инъекция подкожно; две последующие – внутримышечно, через день в область бедра. Разрешающая инъекция – внутривенно на 21 день после сенсибилизирующей инъекции (2 мг/кг и 20 мкг/кг).

После разрешающей инъекции наблюдение вели на протяжении 30 минут. Его тяжесть оценивали в индексах по шкале W.O.Weigl.

Выраженность анафилаксии после внутривенного введения препарата Сульфопарин соотносилась с результатами, зафиксированными в группе морских свинок, подготовленных к шоку (3 группа). 100%-я гибель животных в данной группе наступила в результате подкожного введения 0,1 мл лошадиной сыворотки за 3 недели до разрешающей дозы 0,3 мл (положительный контроль, 3-я группа).

Одновременно разрешающую дозу испытуемого вещества вводили животным, которым вместо сенсibilизирующих инъекций препарата был введен соответствующий объем физиологического раствора – отрицательный контроль (4-я и 5-я группа).

В течении периода эксперимента и после введения разрешающей дозы в опытных группах и группах «отрицательного» контроля изменений в весе, температуре, а также поведении не обнаружено. Препарат Сульфопарин в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг не вызывает анафилактического шока.

Реакция гиперчувствительности замедленного типа – ГЗТ. В опыт было взято 24 морских свинок массой 220 ± 10 г, по 6 в каждой группе (4-я группа). Животных опытных групп сенсibilизировали однократно введение в подушечки 4-х лапок препарата в смеси с полным адьювантом Фрейда (ПФА) в объеме 0,5 мл в соотношении 1:1. Препарат вводили в дозах 1 и 10 мкг/кг (1 и 2 группа). Контрольным животным аналогичным способом вводили ПФА (3 и 4 группы). На 21-й день опыта животным на выстриженной участок кожи спины внутрикожно вводили разрешающую дозу препарата (2 и 20 мкг/кг) в объеме 0,05 мл. Через 1, 6, 24 и 48 часов определяли реакции кожи. Реакцию кожи визуально оценивали в баллах по следующей схеме:

0 - видимой реакции нет

1 - бледно-розовая эритема по всему участку или его периферии

- 2 - ярко - розовая эритема по всему участку или его периферии
- 3 - красная эритема по всему участку
- 4 - инфильтрация и отек кожи
- 5 - эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления.

Сульфопарин в дозах 1 и 10 мг/кг не вызывал каких-либо реакции на выстриженном участке поверхности кожи морских свинок, что позволит сделать вывод о том, что Сульфопарин не вызывает гиперчувствительности замедленного типа.

Метод накожных аппликаций. Опыт был проведен на 10 морских свинках массой 220 ± 10 г, по 5 в каждой группе. На выстриженный участок кожи боковой поверхности ближе к середине туловища, наносили по 3 капли 0,1% (1 группа) и 1% (2 группа) раствор препарата, приготовленного на физиологическом растворе. Препарат наносили на протяжении 4-х недель по 5 раз в неделю.

Реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале кожных проб, приведенных выше. Этот эксперимент позволяет выявить опасность развития не аллергического контактного дерматита в зависимости от дозы препарата. Исследование сенсibilизирующего действия Сульфопарина проводили путем 20 повторных аппликаций. Первое тестирование проводили через 10 аппликаций и при отрицательном результате число аппликаций доводили до 20.

Препарат Сульфопарин в 0,1% и 1% концентрациях не вызывал каких-либо реакций на выстриженном участке поверхности кожи морских свинок на протяжении всего эксперимента (20 аппликаций). Таким образом, можно заключить, что вещество не обладает способностью вызывать неаллергический контактный дерматит.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время во всем мире отмечается возрастание интереса к препаратам на основе хитина, его производным (хитозана и сульфата хитозана) и возможностям их использования в различных областях медицины. Особый интерес представляет получение сульфата хитозана из хитозана. Изучением реакции сульфатирования хитозана установлена закономерность данной реакции с позиций высокомолекулярных соединений. Выявлены физико-химические характеристики полученных производных хитозана на молекулярном и надмолекулярном уровнях. Образование сульфата хитозана проанализировано с проведением опытов идентификации с помощью методов ИК- и ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, поляризационной микроскопии и сорбцией в воде [8].

Проблема создания отечественных высокоэффективных лекарственных средств весьма актуальна на сегодняшний день. Одними из таких препаратов является Сульфопарин, который обладает противосклеротическими свойствами. Лекарственное средство Сульфопарин разработано в Институте химии и физики полимеров АН РУз [8].

Сульфопарин – комплекс хитозана с сульфогруппами. Хорошо известна исключительная роль сульфогрупп в процессах жизнедеятельности живого организма. Последнее открывает новые возможности для коррекции различных патологических состояний организма.

Хитозан – продукт деацетилирования хитина. По химической структуре является сополимером N-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. В зависимости от эффективности реакции получают хитозаны с различной степенью деацетилирования, которая показывает процентное содержание - глюкозамина в молекуле хитозана, например, если речь идет о хитозане со степенью деацетилирования то это означает, что в молекуле хитозана в

среднем содержится 85% N-глюкозаминовых остатков и 15% N-ацетил-D-глюкозаминовых остатков.

Химические свойства хитозана связаны с его химической структурой. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана позволяет связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд, поэтому хитозан является прекрасным катионитом. Кроме того, свободные аминогруппы определяют хелатообразующие и комплексообразующие свойства хитозана. Он связывает и прочно удерживает ионы металлов (в частности радиоактивных изотопов и токсичных элементов) за счет разнообразных химических и электростатических взаимодействий.

Образуя множество водородных связей, хитозан связывает большое количество органических водорастворимых веществ, в том числе бактериальные токсины и токсины, образующиеся в толстом кишечнике в процессе пищеварения. Вследствие этих же водородных связей хитозан плохо растворяется в воде, поскольку связи между его молекулами более прочные, чем между молекулами хитозана и воды. Вместе с тем, хитозан набухает и растворяется в органических кислотах - уксусной, лимонной, щавелевой, янтарной. Причем при набухании он способен прочно удерживать в своей структуре растворитель, а также растворенные и взвешенные в нем вещества. Хитозан также связывает предельные углеводороды, жиры и жирорастворимые соединения за счет гидрофобных взаимодействий и сетчатой структуры, что сближает его по сорбционным механизмам с циклодекстринами. Расщепление хитина и хитозана до D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина происходит под действием микробных ферментов - хитиназ и хитобиаз, поэтому они полностью биологически разрушимы и не загрязняют окружающую среду.

Таким образом, хитозан является универсальным сорбентом, способным связывать огромный спектр веществ органической и

неорганической природы, что определяет широчайшие возможности его применения в жизни человека. Хитозан, растворимый в кислых растворах, имеет широкие возможности для применения в различных отраслях народного хозяйства и, в частности, в медицине.

В литературе имеются единичные сведения о низкой токсичности Сульфопарина и его использование в медицине в эксперименте на лабораторных животных. Однако нет сведений о характере и выраженности повреждающего действия Сульфопарина на организм экспериментальных животных и оценки его безопасности.

Коррекция экспериментальной гиперхолестеринемии в течение 2 месяцев гиполипидемическими препаратами оказала позитивное влияние на показатели липидного обмена. Содержание общего ХС достоверно снижается в 1,35; 1,75 и 2,29 раза, соответственно в группах, получавших гемфибразил, сульфаторин-500 и сульфаторин-1000, по сравнению с контрольной группой. При этом уровень ХС ЛПНП снизился в 1,36; 1,65 и 2,19 раза, соответственно группам. Содержание ХС в ЛПОНП также снизилось в 1,45; в 2,13 и 2,52 раза, а ХС в ЛПВП возрос в 1,72 раза, а при введении сульфаторина-500 и сульфаторина-1000 это повышение составило в 1,49 и 1,92 раза, соответственно, по сравнению с животными контрольной группы.

Однако гемфибразил оказывал более слабое позитивное влияние на липопротеидный спектр сыворотки крови. Полученные нами данные перекликаются с литературными, в которых показано, что механизм действия фибратов связан увеличением активности рецепторов, захватывающих ЛПНП, однако оно проявляется слабо. С другой стороны, фибраты снижают активность ГМГ-СоА-редуктазы и тем самым тормозят синтез ХС в печени лишь при длительном применении. Препарат эффективен при низком ХС ЛПВП, повышенном ХС ЛПНП и гипертриглицеридемии (IIВ, IV, V типы дислипидемии) без признаков коронарной болезни. Из побочных

действий наиболее выраженным является поражение мышечной системы, образование холестериновых камней.

При введении сульфаторина в различных концентрациях по сравнению с гемфибрилом статистически достоверно снизился уровень ХС в ЛПОНП и ЛПНП, соответственно повысился уровень ХС в ЛПВП, приближаясь к нормативным величинам, что свидетельствует о более высоком гипохолестеринемическом действии препарата. Хитозан обладает биосовместимостью с живыми тканями (не вызывает аллергических реакций и отторжения); биodeградируемостью (разлагается под действием ферментов); биоинертностью (не токсичен, легко выводится из организма); бактериостатичностью (тормозит рост и размножение бактерий) [11]. Благодаря своей уникальной поликатионитной фибриллярной структуре, хитозан обладает хорошей адгезией; способностью поглощать холестериновый комплекс низкой плотности. В настоящее время накоплен обширный материал по исследованию хитина, хитозана и их производных, в частности, особый интерес представляет водорастворимое производное хитозана – сульфат хитозана, который может использоваться для получения биологически активных соединений, обладающих антикоагулянтным, антисклеротическим и противовирусным действием, а также повышенной способностью специфично связывать ЛПНП из крови.

Таким образом, на основании полученных данных можно сказать, что в отличие от гемфибрила, сульфаторин обладает выраженным гипохолестеринемическим действием на модели гиперхолестеринемии. Его гипохолестеринемические свойства зависят от концентрации и превосходят фибратов. Сульфаторин достоверно снижает высокий уровень холестерина в липопротеидах низкой и очень низкой плотности, повышает низкие его значения в липопротеидах высокой плотности у кроликов с гиперхолестеринемией.

Изучением острой внутрижелудочной токсичности препарата на белых мышцах установлено, что по классификации лекарственных средств по токсичности препарат «Сульфопарин» относится к малотоксичным веществам (V класс опасности). Выявлено, что Сульфопарин не обладает резорбтивным и раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки глаз, не вызывает сенсibilизации организма животных. Препарат не обладает кумулятивным эффектом. Установлено, что при хроническом воздействии в течение 3-х месяцев препарат в дозах 500, 100 и 25 мг/кг массы тела не вызывает патологических изменений в организме экспериментальных животных. Морфологическими исследованиями установлено, что достоверных отличий в структуре внутренних органов между опытными и контрольными группами не обнаружено, т.е. Сульфопарин не вызывает дистрофических, некробиотических и воспалительных изменений у животных.

На экспериментальной модели на белых крысах установлено, что Сульфопарин не обладает сенсibilизирующим действием, не оказывает отрицательного эмбриотоксического и тератогенного эффекта, не влияет на репродуктивную функцию экспериментальных животных.

ВЫВОДЫ

1. В отличие от гемфибразила, сульфопарин обладает выраженным гипохолестеринемическим действием на модели гиперхолестеринемии. Его гипохолестеринемические свойства зависят от концентрации и превосходят фибратов.
2. Сульфопарин достоверно снижает высокий уровень холестерина в липопротеидах низкой и очень низкой плотности, повышает низкие его значения в липопротеидах высокой плотности у кроликов с гиперхолестеринемией.
3. Препарат Сульфопарин при однократном внутрижелудочном введении относится к препаратам малотоксичным, не обладает кумулятивным действием.
4. Препарат Сульфопарин не обладает кожно-резорбтивным действием и местно-раздражающим эффектом.
5. При длительном хроническом внутрижелудочном введении Сульфопарин не оказывает влияния на поведение и динамику массы тела животных.
6. Препарат не оказывает токсического действия на гематологические показатели, функцию почек и печени, а также отрицательного действия на морфологию органов и тканей.
7. Препарат Сульфопарин не обладает аллергенным действием.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуллаходжаева Д.Г. Патогенетические аспекты медикаментозной терапии облитерирующего атеросклероза гиполипидемическими препаратами: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Ташкент: ТМА, 2003. – 35 с
2. Аронов Д.М. Лечение и профилактика атеросклероза. – М.: Триада-Х, 2000. – С. 411
3. Байрамукова А.А., Павленко М.А., Набиев М.П., Миррахимов Э.М. Гомоцистеинемия и риск развития атеросклероза. // Центральный азиатский медицинский журнал. – 2006. - №2/3. – С.137-144
4. Балаханов Т.В., Погорелова О.А., Сусеков А.В. и др. Влияние аторвастатина на функциональное состояние эндотелия у больных с наследственной гиперхолестеринемией. // Кардиология. – 2002. - №1. – С. 15-21
5. Березин А.Е. Новый класс лекарственных средств – ингибиторы мейаллопротеаз – в лечении сердечной недостаточности. // Клиническая медицина. – 2004. - №5. – С. 7-10
6. Баргакан З.С., Цывкина Л.П., Костюченко Г.И. и др. Бюлл. СОРАМН 2002; 2(104): 51-55.
7. Братусь В.В., Шумаков В.А., Талаева Т.В. Атеросклероз, ишемическая болезнь сердца. Острый коронарный синдром: патогенез, диагностика, клиника, лечение // Четверта хвиля: Киев. - 2004. – С. 576
8. Вихорева Т.Л. Синтез сульфатов полисахаридов и исследование их биологической активности //Cellblöse Chem. Technol.- 1981.- Vol.15.- P.487-504
9. Воевода М.И., Рагино Ю.И., Самаева Е.В. и соавт. Липидный спектр крови и резистентность к окислению липопротеинов сыворотки крови у больных коронарным атеросклерозом в Западной Сибири. // Бюллетень СО РАМН, 2003, №3, С. 47-51

10. Вржинская О.В. и соавт., 2005
11. Гамзазаде А.И.; Насибов С.М. «Способ получения сульфатированного хитозана» Патент РФ № 2048475 С08В37/08, 20.11.1995
12. Грацианский Н.А. Предупреждение обострений коронарной болезни сердца. Вмешательства с недоказанным клиническим эффектом: ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента и антиоксиданты. // Кардиология. – 1998. - №6. – С.4-18
13. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных веществ. Москва, 2008. - С.27-30.
14. Доклиническое исследование лекарственных средств (Методические рекомендации). - Киев.-2002 г
15. Драпкина О. М., Задорожная О. О., Ивашкин В. Т., Манухина Е. Б., Малышев И. Ю. Особенности синтеза оксида азота у больных инфарктом миокарда // Клиническая медицина. - 2000. - №3. - С. 12-23
16. Дыбан А.П. и др. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияние их на репродуктивную функцию. - М. - 1986.- с 62.
17. Ежов М.В., Трухачева Е.П., Афанасьева О.И. и др. Связь липопротеида (а) и гомоцистеина с коронарным атеросклерозом у мужчин молодого и среднего возрастов. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. - №7(5). – С. 11-15
18. Ивашкин В. Т., Горбатенкова С. В., Драпкина О. М. Особенности синтеза оксида азота у больных с хронической сердечной недостаточностью // Клиническая медицина. - 2004. - №2. - С. 20-23
19. Ивашкин В. Т., Драпкина О. М. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2000. - №4. – С. 16-21
20. Иноятова Ф.Х., Кутликова Г., Рашидова С.С.

21. Инструкция по доклиническому испытанию безопасности фармакологических средств. - Ташкент - 2000 г.
22. Киличева Г.Х. Влияние суммарных флаваноидных препаратов из *Pseudosophora alopecuroides* и *Thermopsis alterniphloa* на иммуногенез в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ташкент: ТМА, 2008. – 18 с
23. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. - Санкт-Петербург: Питер, 1999. – 237 с
24. Климов А.Н., Шляхто Е.В., 2006;
25. Куприна Е.Э., Тимофеева К.Г., Козлова И.Ю. и дрр. Электрохимический способ получения сорбентов из хитинсодержащих материалов с усиленными антимикробными свойствами // Материалы 7-ой Всероссийской конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», С-Петербург – Репино, 15-18 сентября, 2003 г. М.: ВНИРО, 2003. С. 19-21
26. Курмуков А. Г., Камилова У. К., Айзиков М. И., Газиева У. Антиатеросклеротическое и гиполипидемическое действие глирофама и олигвона // Медицинский журнал Узбекистана. – Ташкент, 1997. - №5. – С. 45-47
27. Ланкин В.З., Вихерт А.М., Тихадзе А.К., Согоян С.М., Бондарь Т.П. Роль перикесного окисления липидов в этиологии и патогенезе атеросклероза. // Вопросы медицинской химии. – 1999. №3. С. 18-24;
28. Либов И.А., Иткин Д.А., Черкесова С.В. Нарушение липидного обмена и атеросклероз: актуальность проблемы и диагностика. // Лечащий врач. – март. – 2001. - №3. - С. 72-76
29. Малышев И. Ю. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 1997. - №1. – С. 49-55

30. Малышев И. Ю., Манухина Е. Б. Стресс-лимитирующая система оксида азота // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. - 2000. - № 10. - С. 1283-1292,
31. Манухина Е. Б., Малышев И. Ю., Архипенко Ю. В. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите // Вестн. РАМН. – 2000. - №4. - С. 16-21
32. Марков Х.М., Надирашвили С.А. Возрастные особенности коронарных эффектов оксида азота // Успехи физиологических наук. – 2004. – №4. – С. 13-15
33. Марков Х.М. L-аргинин – оксид азота в терапии болезней сердца и сосудов. // Кардиология – 2005. - №6. – С. 87-95;
34. Марков Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции эндотелия. // Кардиология. – 2005. - №12. – С.62-68
35. Марков Х.М. Оксид азота и атеросклероз. Оксид азота, дисфункция эндотелия и патогенез атеросклероза. // Кардиология. - №11. – 2009. – С. 64-74
36. Марков Х.М. Оксид азота и атеросклероз. Оксид азота, дисфункция эндотелия и патогенез атеросклероза. // Кардиология. - №11. – 2009. – С. 64-74
37. Марков Х.М. Оксид азота и сердечно-сосудистая система. // Успехи физиологических наук. – 2001. – 32. - №3. – С. 49-65;
38. Марков Х.М. Оксид азота и сосудистые эффекты липопротеинов: клеточные и молекулярные механизмы. // Патологическая физиология экспериментальной терапии. – 2006. - №3. – С. 2-9
39. Марков Х.М. Простаноиды и атеросклероз // Патологическая физиология. Экспериментальная терапия. - 2004. - №1. – С. 2-8;
40. Марков Х.М. Простаноиды и сердечно-сосудистая система. М.: Династия. – 2006. – с. 196

41. Марков Х.М. Роль оксида азота в патогенезе болезней детского возраста. Российский вестник перинатологов и педиатров. – 2000. - №4. – С. 43-47
42. Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика //Справочник для врачей под редакцией проф. В.А. Яковлева. - 2006. – 231 с.
43. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств.-Москва.-1988
44. Мешков А.Н., Стамбольский Д.В., Крапивнер С.Р. и др., Мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с клиническим диагнозом семейной гиперхолестеринемии.// Кардиология. – 3(. – 2004. – С. 58-61
45. Недоспаев А. А. Биогенный NO в конкурентных отношениях // Биохимия. – 1998. – Т. 63, Вып. 7. – С. 881-904
46. Никитин Ю.П., Рагино Ю.И. Повышенная чувствительность липопротеинов низкой плотности к окислению как фактор риска атеросклероза. // Российский кардиологический журнал. – 2002. – №1. – С. 61-70;
47. Никонов Б.А., Вербицкая Н.Б. и др. Совместимость хитозана с микрофлорой кишечника и культурами клеток// Материалы 6-ой Всероссийской конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва – Щелково 22 октября 2001 г. М.: ВНИРО, 2001. С. 342
48. Нудьга Л. А., Плиско Е. А., Данилов С. Н. N-алкилирование хитозана // Журнал общей химии 1993, том XLIII, с. 2756-2760
49. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Проблемы профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в России. // Кардиология СНГ. – 2003. - №1, - С. 12-15
50. Перова Н.В., Метельская В. А. Растительные стерины и станола в роли пищевых факторов, снижающих гиперхолестеринемия путем

- ингибирования всасывания холестерина в кишечнике //Кардиология.- 2008.- №5.- С.62-67
- 51.Петрищев Н.Н., 2003
- 52.Петров В.А., Тарасенко Г.А., Бережнова А.В. Ограничение использования хитозана в лечебно-профилактических целях. // Материалы 6-ой Всероссийской конференции «Новые достижения в исследовании хитина и хитозана», Москва – Щелково 22 октября 2001 г. М.: ВНИРО, 2001. С. 346
- 53.Рахманова В.Н., Нудьга Л.А., Милушева Р.Ю. и др. Определение степени сульфатирования хитозана *Вотбух топі* методом кондуктометрического титрования //Журнал прикладной химии.- 2009.- Т.82, №12.- С.2048-2052
- 54.Рашидова С.Ш. и соавт., 2003, 2006а, 2006б
- 55.Рашидова С.Ш., Милушева Р.Ю. Хитин и хитозан. *Вотбух топ*. Синтез, свойства и применение. - Ташкент .- 2009.- С. 193-242
- 56.Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, методы фармакологического доклинического исследования (под редакцией Р.У. Хабриева).- Москва.- 2005. С. 699-709.
- 57.Сироткина О.В., Шварц Е.И. // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. – 2003. – Приложение №2. – С. 89-91
- 58.Столбушкина П.П., Вихорева Г.А. и др. Сульфатирование низкомолекулярного хитозана. // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы 7-ой международной конференции. С-Петербург – Репино, 15-18 сентября, 2003 г. М.: ВНИРО, 2003. С. 50
- 59.Титов В.Н. // Кардиология. – 1998. – Т. 38, №1. – С.43-49
- 60.Титов В.Н., 2002;
- 61.Титов В.Н., Кухарчук В.В. // Международный медицинский журнал. – 2001. – Т. 7. №2. – С. 19-28

62. Титов В.Н., Лисицын Д.М., Творогова М.Г., Амелюшкина В.А. // Вопрос питания. – 2000. - №4. – С. 16-24
63. Томпсон Г.Р. Руководство по гиперлипидемии. MSD, 1990
64. Трескунов К.А., Погорельская Л.В., Комаров Б.А., Албулов А.И. Биологически активные добавки к пище на основе хитозана и сухих экстрактов сборов лекарственных растений // Практик. фитотерапия.- 2000.- №3.- С.58-59
65. Фомин В. Гомоцистеин – новый фактор риска заболеваний сердечно-сосудистой системы. // Врач. – 2001. - №7. – С. 35-38
66. Хабибуллаев Б.Б. Коррекция вторичных иммунодефицитов хитозаном и его металлокомплексами в эксперименте. // Автореф. дисс...к.м.н.- Ташкент, 2005.- 20с.
67. Шевченко О.П. Гомоцистеин – новый фактор риска атеросклероза и тромбоза // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. - №4. – С.25-37
68. Шляхто Е.В., Беркович О.А., Маисеева О.М. Клеточные и молекулярно-генетические аспекты эндотелиальной дисфункции. // Вестник РАМН. – 2004. – Мою – С. 50-52
69. Шпектор А.В., Васильева Е.Ю., Кардиология: ключи к диагнозу. Видар, 2006, с. 295
70. Юдина Т. П., Цыбулько Е. И., Черевач Е. И. и др. Гиполипидемическое действие водного экстракта колючилистника // Вопросы питания. – 2005. - №4. – С. 31-32
71. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M., 2008
72. Cooke J.P., Flow, NO and atherogenesis. Proc Natl Acad Sci 2003; 100: 768-770;
73. Coppola A., Davi G., De Stefano V et al. Homocysteine, coagulation, platelet function, and thrombosis. Semin Thromb Hemost 2000; 26: 243-54

74. Danesh J., Collins R., Petro R. Lipoprotein (a) and coronary heart disease: meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000; 102: 1082-5
75. De Lageril M., Salen O., Paillard F., Lacan G. Lipid-lowering drugs and homocysteine. *Lancet* 1999; 353: 209
76. Endemann D.H., Schiffrin E.L. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1983-1992;
77. Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G. et al. Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein // *Chem. Res. Toxicol.* 2000. V. 3. P. 77-92;
78. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jargens G. The role lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL // *Free Rad. Biol. Med.* 2002. V. 13. P. 341-390
79. Esterbauer H., Wag G., Puhl H. Lipid peroxidation and its atherosclerosis // *Br. Med. Bul.* 1993. V. 49. P. 566-576;
80. Frank P.G., Woodman S.E., Park D.S., Lisanti M.R. Cavelin, caveolae and endothelium cell function. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1161-1168
81. Fu W., Dudman N., Perry M., Wang X. Homocysteinemia attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. *Atherosclerosis* 2002; 161 (1): 169-76
82. Genser D. Homocysteine, vitamins, and restenosis after percutaneous coronary intervention. *Cardiovasc Rev Rep* 2003; 24 (5): 253-8
83. Goldsmith DJA, Covic A. Coronary artery disease in uremia; etiology, diagnosis and therapy. *Kidney Int* 2001; 60(6): 247-253;
84. Graham M., Daly L., Refsum H et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European concerted action project. *JAMA* 1998; 277(22): 1775-81
85. Hankey G.J., Eikelboom J.W. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-413

86. Hansrani M., Gillespie J., Stransby G. Homocysteine in myointimal hyperplasia. *Eur J Vase Endovasc Surg* 2002; 23: 3-10;
87. Heath K.E., Gahan M., Whittal R.A., Humphries S.E. Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolaemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis* 2001; 154: 243-246
88. Heermeier K., Leicht W., Palmetwofer A. et al. Oxidized LDL suppresses NK-kappa-B and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 112: 456-463;
89. Herman A.G., Moncada S. Therapeutic potential of nitric oxide donors in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Eur Heart J* 2005. - №26. – P. 1945-1955;
90. Hibbs J. B., Taintor R. R., Vaurin Z. Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule // *Biochem. And biophys. Res. Commun.* - 1988. - Vol. 157. – P. 87-94
91. Ignarro L.I., Cirino J., Casino A. et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 879-886
92. Jacobsen D.W. *Clin. Chem.* 1998; 44.8 (2): 1833-1843
93. Jones A.A., Disilvestro R.A., Coleman M., Wagner T.L. Copper supplementathion of adult men: effect on blood copper enzyme activities and indicators of cardiovascular disease risk // *Metabolism- Clinical and Experimental.* 1997. V. 46. P. 1380-1383
94. Kawashima S., Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric synthase and atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 998-1015;
95. Laiudef L., Sariano F.G., Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000; 28: Suppl: 37-52
96. Lamb D.J., Willins G.M., Leake D.S. The oxidative modification of LDL by human lymphocytes // *Atherosclerosis.* 2002. V. 92. P. 87-91

97. Landmesser U., Hornig B., Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis. *Circulation* 2004;;109 (Suppl.1): 1129-1133
98. Leake D.S., Rankin S.H. The oxidative modification of LDL by macrofages // *Biochem. J.* 2000. V. 270. P. 741-748
99. Liao J.K. Endothelium and acute coronary syndrome. *Clin Chem* 1998; 44; 1799-1808;
100. Liao J.K., Clark S.L. Regulathion of G protein alpha (i2) subunit expression by oxidized low density lipoproteins. *J Clin Invest* 1995; 95: 1457-1463
101. Lin K.Y., Ito A., et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulathion* 2002; 106: 987-992;
102. Linde R., Linde B. Lipids and risk assessment. *Cardiol Rev* 2001; 9: 348-58
103. Loidl A., Sevecsek G. et al. . Oxidized phospholipids in LDL induce apoptic signaling via activaithion of acid sphingomyelinase in arterial smoth muscler cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 32921-32928
104. Loscalo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 1996; 98 (1): 5-7
105. Luscher T. F. Endothelisl disfunction as therspeutic target // *Eur. Heart J.* – 2000. - №2. – P. 20-25
106. Mallika V., 2007
107. Marcovina S.M., Koschinsky M.L., Albers J.J., Skarlatos S. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Lipoprotein (a) and Cardiovascular Disease: Recept Advances and Future Directions *Clinical Chemistry* 2003; 49: 1785-96
108. McCully KS. Homocysteine, folate, vitamin B₆ and cardiovascular disease. *JAMA* 1998; 279(5): 392-393
109. Negaro C., Hamilton M., Fonarow C. Imparied endothelium-mediated vasodilatation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure // *Am. J. Phisiol.* – 2000. – P. 278

110. Noda I. et al. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system // *Biochem Mol Biol Int.* – 1997. – Vol. 42, №1. – P. 35-44.
111. Nuszowski A., Grabner R., Marshe G. et al. Hypochlorite-modified low density lipoprotein inhibits nitric oxide synthesis endothelial cells via an intracellular dislocalization of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2001; 276: 14212-14221
112. Osterud B. And Bjorclid E. Role monocytes in atherosclerosis. // *Physiol. Rev.*, 2003, V. 83, P. 1069-1113;
113. Reddy K.G., Nair R.N., Sheehan H.M., Hodgson J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 1994. - Vol. 23. – P. 833-843
114. Remme W. J. Heart failure management: why evidence clinical practice // *Eur. Heart J.* – 2000. №2. – P. 115-121
115. Ross R. // *Atherosclerosis.* – 1997. – Vol. 131, Suppl. – P. S3-S4
116. Schachinger V., Zeither A.M. Atherogenesis – recent insights into basic mechanisms and their clinical impact. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2055-2064
117. Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. // *Nature Medicine*, 2002, V. 8, P. 1211-1218;
118. Steinberg D. LDL oxidation and atherogenesis // *Atherosclerosis IX*, R and L Creativ Commun. Ltd., Tel Aviv, Israel – 2002. P. 41-46;
119. Steinbrecher U.P. et al., Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 3883-3887
120. Steinbrecher U.P. Oxidatively modified lipoproteins // *Curr. Opin. Lipidol.* 1990. V.1. P. 411-415;

121. Struehr D.J. Mamalian nitric oxide syntheses. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1411: 217-230
122. Struhinger M.C., Oka R.K., et al. Endotelial disfunctioninduced byhyperhomocysteinemiya: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulathion* 2003; 108: 933-938;
123. Tapiero H., Mathe G., Tew K. D. I. Arginini *Biomed and Pharmacother.* – 2002. – Vol. 56. – P. 439-445
124. Tawacol A., Forgione M., Struehlinger M et al. Homocysteine impairs coronary microvascular dilator function in humans. *JACC* 2002; 40 (6): 1051-8
125. Titheradge M. A. Nitric oxide in septic shock// *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1411. – P. 437-455
126. Vedernikov Y. P., Mordvintcev P. I., Vanin A. F. Nitric oxide from L-arginine: a Bioregulatory System / Eds S. Moncada, E.A. Higgs. – Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. – P. 373-377
127. Vergnami L., Natric S., Ricci F. Et al. Effect of native and oxidized low-density lipoproteins in endothelial nitric-oxide production. Key role of L-arginine availability. *Circulathion* 2000; 101: 1261-1266
128. Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. // *Source Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1997, V. 27, P. 1-10].
129. Wever R., Stores E., Rabelink T.J. Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidathion and reduction? *Atherosclerosis.* – 1998; 137: Suppl: S51-S60;
130. Woods A., Brull Di., Humphries S. E. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6 // *Eur Heart J.* - 2000. – Vol. 21. – P. 1574-1583
131. Yla-Herttuala S. Biochemistry of the arterial wall in developing atherosclerosis // *Ann. NY Acad. Sci.* 2001. V. 623. P. 40-59

132. Yla-Herttuala S. Macrophages and oxidized low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. // *Ann. Med.* 2001. V.23. P. 561-567
133. Zaman A.G., Helft G., Worthley S.G., Badimon J.J. // *Atherosclerosis.* – 2000. - Vol. 149. – P. 251-256