

На правах рукописи

Белова Екатерина Андреевна

**ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ ЭКСТРАКТЫ ПЛОДОВ СЕВЕРНЫХ ЯГОД РОДА
VACCINIUM КАК КОРРЕКТОРЫ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Сургут – 2022

Работа выполнена в бюджетном учреждении высшего образования
Ханты-Мансийского автономного округа – Югры «Сургутский государственный
университет»

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **Коваленко Людмила Васильевна**

кандидат медицинских наук, доцент **Кривых Елена Алексеевна**

Официальные оппоненты:

Медведев Олег Стефанович: доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Мазо Владимир Кимович: доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Защита диссертации состоится « 22 » сентября 2022 года в 14.00 часов.

на заседании Диссертационного совета 24.1.180.01 Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП». Диссертация размещена на сайте института ФГБНУ «НИИОПП» www.niioopp.ru

Автореферат разослан « 20 » августа 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Степень разработанности проблемы.

Метаболический синдром (МС) определяется как группа метаболических нарушений, представленных совокупностью нескольких факторов риска развития сердечно-сосудистых патологий и сахарного диабета [Ю.П. Успенский с соавт.,] и характеризующаяся нарастающей распространенностью [Р.Н. Шепель, О.М. Драпкина, 2019; С.Е. Hostinar, et al., 2017; S. Simon, et al., 2020]. Патофизиология метаболического синдрома включает в себя несколько сложных механизмов, которые еще полностью не выяснены. Помимо генетических и эпигенетических факторов [B.F. Dizaji, 2018], факторов образа жизни и окружающей среды, таких как переизбыток и отсутствие физической активности, были определены основные патофизиологические факторы развития МС. Причинная роль может быть отведена высокому потреблению калорий, поскольку было показано, что висцеральное ожирение является важным триггером, который активирует большую часть патофизиологического пути метаболического синдрома [К.В. Котенко, Б.Ю. Котенко, 2014; Е.Н. Кравчук, М.М. Галагудза, 2014]. В отдельных исследованиях констатируется, что метаболический синдром также связан с рядом сопутствующих состояний, включая хронический оксидативный стресс, хроническое воспаление, протромботическое состояние, неалкогольную жировую болезнь печени, холестериновую желчнокаменную болезнь и нарушения репродуктивной функции [P. Drózdź et al., 2017].

Среди предполагаемых механизмов МС выделяют: инсулинорезистентность, хроническое воспаление и нейрогормональную активацию, по-видимому, играющие важную роль в прогрессировании МС и его последующем переходе в сердечно-сосудистые заболевания и сахарный диабет [G. Fahed et al., 2022]. Важное значение в выяснении механизмов развития МС могут иметь его экспериментальные модели. Диетические модели МС воспроизводят нездоровые пищевые привычки и малоподвижный образ жизни человека и позволяют оценить эффект избыточного потребления макронутриентов на метаболизм и энергетический баланс [P. Chandrasekera, J. Pirpin, 2014].

Выделяют три типа диет для моделирования МС: 1) с высоким содержанием углеводов; 2) с высоким содержанием жиров; 3) с высоким содержанием углеводов и высоким содержанием жиров.

Диету с высоким содержанием и углеводов, и жиров называют кафетерийной диетой. Эта диета считается надежной моделью, обеспечивающей ожирение, дислипидемию, гиперинсулинемию, непереносимость глюкозы, гипергликемию и воспаление [F.F. De Melo et al., 2018].

Общим недостатком использования указанных моделей является то, что определения ожирения были установлены для человеческой популяции. Для грызунов нет общепринятого определения ожирения. Кроме того, ограничения диетических вариантов МС включают неспособность полностью воспроизвести патологию человека. Так, как у людей развитие болезни может занять годы, в то время как у грызунов наблюдаемый МС развивается значительно быстрее.

Но, даже наиболее полноценные, имитирующие пищевые привычки современного человека кафетерийные диеты, все-таки не воспроизводят в достаточной степени выраженности сахарный диабет и артериальную гипертензию. Кроме того, модели МС кафетерийного типа воспроизводятся практически только на самцах грызунов, самки реагируют нестандартно [S.Gunawan et al., 2021]. Поэтому, мы сочли целесообразным усовершенствование модели создания МС в эксперименте.

Высокая распространённость метаболического синдрома предопределяет интенсивность исследований путей профилактики и коррекции факторов риска при этом состоянии. Имеющиеся к настоящему времени результаты исследований *in vitro* и *in vivo* однозначно демонстрируют потенциал полифенольных биологически активных соединений в регуляции липогенеза, гликемии, дифференцировки адипоцитов, контроле воспалительных процессов и окислительного стресса [В.К. Мазо и соавт., 2016, 2018, 2019; А.В. Кубышкин, 2017; Ю.И. Шрамко и соавт., 2020; M. Rebollo-Hernanz, et al., 2019; G. Chiva-Blanch, et al., 2017]. Среди источников полифенольных соединений, потенциально перспективных для тестирования при метаболическом синдроме, выделяют северные ягоды темно окрашенного цвета, содержащие антоцианы и родственные им флавоноиды – клюква обыкновенная (*Vaccinium oxycoccos* L.), черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) [М.Ж. Амиот, et al., 2016; S. Vendrame, et al., 2019]. При этом следует отметить, что наиболее интенсивно публикуются результаты исследований ягод Северной Америки и существенно меньше – ягод Северной Европы. Имеются многочисленные данные о выраженных антиоксидантных свойствах плодов северных ягод, полученные в экспериментальных и некоторых клинических исследованиях [М. Scuto et al., 2020]. Результаты экспериментальных исследований, демонстрирующие антиоксидативный эффект экстрактов ягод рода *Vaccinium*, позволяют предполагать возможность их влияния на некоторые патофизиологические звенья метаболического синдрома, но конкретные исследования по этой проблеме малочисленны и результаты их противоречивы [М.Ж. Амиот, et al. 2016].

В работах, проведённых с дикорастущими и культивируемыми ягодами рода *Vaccinium*, прослеживаются существенные различия химического состава и свойств экстрактов плодов в зависимости от региона произрастания (вегетации) и способа выращивания в сравнении с их культивируемыми видами [М.Ф. Борисенков, Л.А. Бакутова, А.В. Пещ, 2013, P. Drózdź, et al., 2017]. На этом фоне исследования полифенольных экстрактов плодов северных ягод из региона Сибири единичны или практически отсутствуют. Ввиду значительных колебаний качественного и количественного состава полифенольных соединений рода *Vaccinium* в зависимости от места произрастания ягод объективно актуальными становятся исследования, включающие региональный компонент [Э.Х. Ботиров и М.Н. Лютикова, 2011, 2013]. Особенности химического состава и свойств дикорастущих ягод Северо-Запада Сибири закономерно являются объектом исследования в Сургутском государственном университете [М.Н. Лютикова, 2010, 2011, 2013]. Таким образом, исследования полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium* произрастающих в Западной Сибири, как варианта возможной коррекции проявлений метаболического синдрома, представляются актуальными и недостаточно изученными.

Цель исследования – в условиях эксперимента оценить возможность коррекции основных патофизиологических компонентов метаболического синдрома полифенольными экстрактами плодов ягод рода *Vaccinium*.

Задачи

1. Модифицировать модель экспериментального метаболического синдрома у крыс с дополнительным включением компонентов остеопороза, сахарного диабета и артериальной гипертензии.

2. Исследовать качественный и количественный состав полифенольных экстрактов плодов клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccos* L.), черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea*

L.), произрастающих на территории ХМАО-Югры.

3. Изучить влияние экстрактов плодов клюквы, брусники и черники на изолированные клетки *in vitro* в тестах антиоксидантной, цитопротекторной и противовоспалительной активности.

4. Исследовать влияние экстрактов плодов клюквы, брусники и черники *in vivo* на выраженность основных патофизиологических проявлений метаболического синдрома: ожирение, дислипидемию, инсулинорезистентность, гипергликемию, артериальную гипертензию, остеопороз и стеатогепатоз.

Научная новизна

1. Модифицированная модель метаболического синдрома на овариэктомированных крысах с использованием углеводно-жировой диеты, нагрузки хлоридом натрия и введением стрептозоцина, индуцирует абдоминальное ожирение, триглицеридемию, гиперхолестеринемию, стеатогепатоз, инсулинорезистентность, артериальную гипертензию и остеопороз – процессы, характерные для этого синдрома. Полученная модель максимально приближена к клинике МС, наблюдаемого у человека.

2. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* впервые доказана антиоксидантная активность экстрактов плодов клюквы, черники, брусники, произрастающих в Северо-Западном регионе Сибири.

3. На клеточных культурах (альвеолярные макрофаги кролика и культура НЕК293) впервые доказана цитопротекторная и противовоспалительная активность экстрактов плодов клюквы, черники, брусники, произрастающих в Северо-Западном регионе Сибири.

4. В эксперименте впервые доказана возможность уменьшать с помощью полифенольных экстрактов клюквы, черники, брусники триглицеридемию, гиперхолестеринемию, стеатогепатоз, гипергликемию, артериальную гипертензию и остеопороз, характерные для метаболического синдрома.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Модифицированная модель метаболического синдрома на крысах, включающая такие его проявления, как ожирение, триглицеридемию, гиперхолестеринемию, стеатогепатоз, инсулинорезистентность, артериальную гипертензию и остеопороз, может быть использована в экспериментальной патофизиологии для выявления ключевых мишеней для корректирующего воздействия и фармакологии для проведения доклинических исследований при разработке новых лекарственных средств.

2. Результаты, полученные в настоящей работе, могут быть использованы в качестве основы при планировании клинических исследований экстрактов плодов клюквы, черники, брусники для их применения по новым показаниям при метаболическом синдроме и его проявлениях (триглицеридемия, гиперхолестеринемия, стеатогепатоз, артериальная гипертензия, инсулинорезистентность, диабет, остеопороз).

Положения, выносимые на защиту

1. Модифицированная модель метаболического синдрома на овариэктомированных крысах с использованием углеводно-жировой диеты, избытка хлорида натрия и стрептозоцина позволяет воспроизводить основные симптомы метаболического синдрома человека.

2. Водно-спиртовые полифенольные экстракты плодов клюквы, черники, брусники, собранных в ХМАО – Югре, отличаются высоким содержанием фенольных компонентов, полифенолов и антоцианов, что обуславливает высокий потенциал их антиоксидантной, цитопротекторной и противовоспалительной активности.

3. Водно-спиртовые полифенольные экстракты плодов клюквы, черники,

брусники снижают выраженность триглицеридемии, гиперхолестеринемии, стеатогепатоза, гипергликемии, инсулинорезистентности, артериальной гипертензии и остеопороза при моделировании метаболического синдрома.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены в виде устных докладов и опубликованы в виде тезисов на XXI и XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 8-9 апреля 2015; Санкт-Петербург, 12-13 апреля 2018); на Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере» (Сургут, 29 октября 2016 г.); на первой международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Технологии будущего нефтегазодобывающих регионов» проводимой в рамках Первого международного молодежного научно-практического форума «Нефтяная столица» (Сургут, 8 – 9 февраля 2018 г.); на X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», (Москва, 14-19 мая 2018 г); на Международном симпозиуме «Астана Биотех 2018», Астана, (Казахстан 12-13 июня 2018 г).

Декларация личного участия автора. Личное участие автора состоит в разработке дизайна исследования в соответствии с его целью и задачами, анализе литературы по теме диссертационного исследования, получении исходных экспериментальных данных, интерпретации и систематизации полученных результатов. Все эксперименты выполнены автором лично.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.3.3 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 3,4,5 паспорта.

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций.

Внедрение результатов работы. Результаты научного исследования используются в лекционном курсе и на семинарских занятиях на кафедре патофизиологии и общей патологии медицинского института БУ ВО «Сургутский государственный университет» (628412, г. Сургут, пр. Ленина, 1).

Объем и структура диссертации. Материал диссертации изложен на 174 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения с обсуждением полученных результатов, выводов и практических рекомендаций, списка литературы, списка сокращений. Диссертация иллюстрирована 26 таблицами и 66 рисунками. Библиографический указатель включает 301 источник, из которых 75 опубликованы в отечественной и 226 в зарубежной литературе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена на кафедре патофизиологии и общей патологии (заведующий кафедрой – д.м.н., профессор Л.В. Коваленко) медицинского института БУ ВО «Сургутский государственный университет», в рамках Государственного задания СурГУ «Инновационные технологии извлечения, идентификации полифенолов дикоросов ХМАО-Югры и исследование их геропротекторных свойств при возраст-ассоциированных заболеваниях человека на Севере» (122032500004).

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на 159 половозрелых крысах-самках Wistar массой 180-320 г (возраст 6 – 8 мес.) и на 5 кроликах шиншилла, массой 3,0-3,2 кг. Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утверждёнными ГОСТ Р 53434-2009 г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Исследования проводили согласно Национальным общим этическим принципам экспериментов на животных [Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»; <http://www.roszdravnadzor.ru/drugs/controllslp>]. На выполнение данной работы было получено разрешение локального Биоэтического комитета Медицинского института Сургутского университета (протокол № 17 от 15 января 2015 г.).

Для получения полифенольных водно-спиртовых экстрактов плоды клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccus* L.), черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) были собраны в летне-осенний период 2015-2019 гг. в Сургутском районе Ханты-Мансийского округа Тюменской области Российской Федерации. Приготовление водно-спиртовых экстрактов плодов ягод было произведено в соответствии с Государственной Фармакопеей РФ (Государственная фармакопея XIII online) <http://pharmacopeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/>. ОФС.1.4.1.0021.15 Экстракты. Стандартизацию проводили по общему содержанию полифенолов – 10 мг/мл. Концентрацию полифенолов в образцах исследовали, используя коммерческий набор для определения концентрации полифенолов «Polyphenols folin-ciocalteu» (ENOLOGY line by BioSytems. Spain), в соответствии с инструкцией производителя реагента. Анализ содержания фенольных соединений проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1290 Infinity.

Определение уровня свободных радикалов проводили стандартными методами с использованием DPPH теста и ABTS теста [V.D. Truong, et.al., 2007; R. Re, et al., 1999].

МТТ-тест в соответствии с инструкциями производителя (Sigma) выполняли на альвеолярных макрофагах кролика и культуре клеток HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™) – клетки почки эмбриона человека.

Клеточную линию RAW 264.7 (ATCC TIB-71) использовали для выделения ДНК (TRIzol – Life Technologies). Полученная ДНК была амплифицирована методом количественного ПЦР с использованием SYBR green PCR Master Mix (Life Technologies).

Методика получения метаболического синдрома на крысах апробирована в двух вариантах. Модель метаболического синдрома была получена следующим образом: дефицит эстрогенов осуществляли двусторонней овариэктомией под наркозом (внутрибрюшинно кетамин 8 мг/100 массы) [Я.Д. Киршенблат.,1969]; инсулинорезистентность вызвали введением фруктозы (раствор 10 % фруктозы вместо питьевой воды в течение 16 недель [S.K. Panchal, L. Brown, 2011]; ожирение провоцировали назначением рациона с повышенным содержанием жиров (корм El-Gomhoria Company, Cairo) [J.H. Kim, et al., 2005], артериальную гипертензию провоцировали ведением в течение 10 дней 0,8 % раствора натрия хлорида вместо питьевой воды [N.Tian, et al., 2005]. Крысы контрольной группы находились на стандартной диете вивария и не подвергались каким-либо воздействиям.

Из этой когорты крыс была сформирована группа животных для изучения возможного влияния экстрактов северных ягод на формирование остеопороза у овариэктомизированных крыс. Животные были поделены на 5 исследуемых групп по 6

крыс в каждой: 1 группа – начиная с 5 дня после овариоэктомии, животным вводили экстракт клюквы внутривенно по 0,5 мл 5 раз в неделю; 2 группа – вводили экстракт брусники; 3 группа – вводили экстракт черники; 4 группа – группа контроля (плацебо), внутривенно получали эквивалентное количество (0,5 мл на крысу) физиологического раствора 5 раз в неделю. Общая продолжительность введений – 12 недель (60 введений); 5 группа (5 крыс) – интактные животные. Для оценки остеопротекторных свойств у животных была изучена плотность костной ткани через 3 месяца от момента проведения процедуры овариоэктомии. Плотность костной ткани изучали на приборе Ivis Spectrum CT, PerkinElmer, USA. Кроме того, был проведен морфологический анализ костной ткани, ткани миокарда и ткани печени [М.М. Тусупбекова, 2007].

Остальные крысы через 14 недель пребывания на углеводно-жировой диете были разделены на следующие группы: группа животных, получавших экстракт клюквы, внутрь 0,5 мл – 28; группа животных, получавших экстракт брусники, внутрь 0,5 мл – 29; группа животных, получавших экстракт черники, внутрь 0,5 мл – 29; группа животных, получавших ежедневно внутрь 0,5 мл физиологического раствора (плацебо) – 30 голов. Введение крысам исследуемых экстрактов ягод продолжалось в течение 2 недель.

Для моделирования тяжелой гипергликемии случайным образом выбрали из каждой группы по 6 крыс и ввели им дважды, через 3 дня по 45 мг/кг стрептозоцина в 0,2 М растворе натрия фосфата (рН 4,5) [Р.У. Хабриев, 2005], уровень гликемии оценивали с помощью глюкометра «Gamma Mini».

Толерантность к инсулину исследовали в соответствии с описанной методикой [E. Vonoga, et al., 1989]. Раствор инсулина (30 МЕ/100 г массы тела, LILLY) вводили подкожно. Образцы крови собирали через 30, 60 и 120 мин в пробирки с гепарином и 25-мкл аликвоты были использованы для определения концентрации глюкозы глюкозо-оксидазным методом. С помощью компьютерной программы Bordgia 1.03 рассчитывали AUC (интегральная площадь под фармакокинетической кривой) по методу наименьших квадратов от 0 до 120 минут.

Во всех случаях животные выводились из эксперимента путем эвтаназии с использованием двуокиси углерода.

Морфологическое исследование проводили в варианте световой микроскопии с окраской гистологических препаратов гематоксилином и эозином с последующей морфометрией при помощи сетки Автандилова Г.Г.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». В связи с отсутствием в ряде случаев соответствия числовых совокупностей принципу нормальности распределения (Shapiro-Wilk's W-test) и малым количеством единиц наблюдения в сравниваемых группах ($n < 30$) в работе были также использованы непараметрические методы медико-биологической статистики. Статистическую характеристику числовых совокупностей представляли как Me (Q1 – Q3). Уровень статистической значимости различий средних арифметических (при параметрической обработке) или медиан (для непараметрических критериев) принимался равным 0,05.

Результаты собственных исследований.

Моделирование метаболического синдрома. На первом этапе экспериментов моделирование метаболического синдрома было проведено согласно наиболее распространенной методике с использованием фруктозы. В течение 8 недель крысы получали раствор 20 % фруктозы и находились на стандартной диете вивария. Основные результаты приведены в таблице 1.

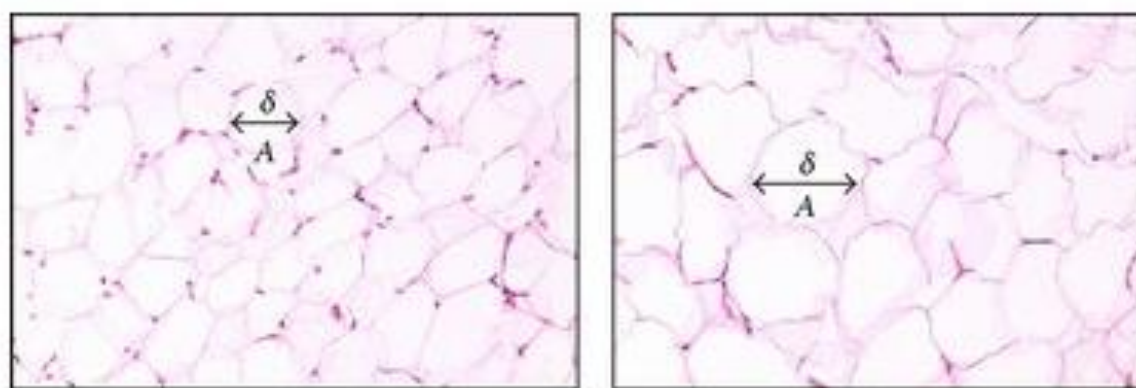
Таблица 1 – Метаболические параметры крыс через 8 недель использования 20 %-ного раствора фруктозы, Me[Q1;Q3]

Показатели	Контроль		Опыт	
	Исходно	Через 8 недель	Исходно	Через 8 недель
Маркеры ожирения				
% набора массы	–	36,12 [35,3;36,9]	–	43,0 [42,3;43,8]*
Индекс массы тела, г/см ²	0,64 [0,63;0,65]	0,66 [0,64;0,68]	0,63 [0,62;0,65]	0,91 [0,89;0,93]*
Окружность живота, см	16,5 [16,2;16,7]	18,3 [18,2;18,4]	16,1 [15,7;16,5]	22,9 [22,6;23,2]*
Брюшной жир, мг/мм	–	196,72 [172,87;219,85]	–	437,97 [410,89;465,05]*
Маркеры липидного обмена				
Триглицериды плазмы, ммоль/л	0,70 [0,61;0,79]	0,65 [0,57;0,73]	0,78 [0,71;0,85]	1,22 [1,08;1,36]*
Общий холестерин плазмы, ммоль/л	1,5 [1,49;1,51]	1,6 [1,5;1,7]	1,5 [1,46;1,54]	1,5 [1,4;1,6]
Систолическое артериальное давление, мм рт.ст.	103,3 [102,2;104,4]	105,0 [103,2;106,8]	101,3 [99,2;103,4]	145,8 [144,3;147,3]*
Глюкоза плазмы, ммоль/л	5,5 [5,1;5,9]	6,0 [5,8;6,2]	5,6 [5,2;6,01]	8,4 [7,8;9,0]*

Примечание: * $p < 0,005$ (метод Mann-Whitney)

(Белова Е.А. и др. // «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере». Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции 27 октября 2020 г. – 2020. – С 27-38)

Гистологическое исследование жировой ткани, как показано на рис. 1, выявило гипертрофию адипоцитов в группе крыс, которых поили 20 % фруктозой. Размер адипоцитов был значительно увеличен в периметре, по диаметру, но количество клеток адипоцитов в обеих группах существенно не различалось.



Контроль

Опыт

Рисунок 1. Гистоморфология адипоцитов в жировой ткани при использовании 20 % фруктозы в течение 8 недель. Гематоксилин/эозин, увеличение $\times 400$. Обозначены диаметр, периметр и площадь

(Белова Е.А. и др. // «Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере». Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции 27 октября 2020 г. – 2020. – С 27-38)

В целом, по результатам эксперимента имитации метаболического синдрома введением 20% фруктозы, можно считать, что этот вариант довольно быстро, в течение 8 недель, приводит к ожирению, которое становится причиной последующих изменений

метаболизма, типичных для метаболического синдрома – гипертриглицеридемии, гипергликемии, артериальной гипертензии. Однако, поскольку в дальнейшем предполагалось тестирование лекарственных соединений на этой модели, мы провели наблюдение (6 крыс) за их состоянием и выявили, что за последующие 4 недели состояние крыс прогрессивно ухудшалось и они пали. Это обстоятельство было расценено нами как избыточная токсичность длительного введения высококонцентрированного раствора фруктозы. Мы посчитали, что такой вариант модели МС трудно использовать для оценки потенциальных терапевтических вмешательств ввиду избыточной тяжести.

Во второй серии экспериментов, воспроизведена модифицированная модель метаболического синдрома. 24 крысы-самки были распределены случайным образом в две группы. Контрольную группу составили 12 intactных крыс, находящихся на стандартной диете вивария, и, не подвергавшихся каким-либо воздействиям. 12 самкам под эфирным наркозом была проведена двусторонняя овариэктомия, через неделю назначена специальная диета. В качестве источника избыточного количества углеводов использовали раствор 10 % фруктозу вместо питьевой воды в течение 8 недель [Panchal S.K., Brown L. 2011]. В качестве диеты с повышенным содержанием жиров использовали коммерческий вариант корма с повышенным содержанием жиров (El-Gomhoria Company, Cairo) [Kim JH, et al., 2005]. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Метаболические параметры крыс через 8 недель на фоне специальной диеты у овариэктомизированных крыс, Ме [Q1;Q3]

Параметры	Контроль n = 13	Опыт n = 11
Маркеры ожирения		
% набора массы	30,5 [28,07;32,93]	72,6[68,4;76,8]*
Индекс массы тела, г/см ²	0,53 [0,49;0,57]	0,90 [0,84;0,96]*
Окружность живота, см	15,8 [15,14;16,46]	28,2[27,39;29,01]*
Брюшной жир, мг/мм	160,42[149,22;171,62]	402,3[381,87;422,73]*
Периренальный жир, г	2,90 [2,58;3,22]	13,27 [13,18;13,36]*
Маркеры липидного обмена		
Триглицериды, мг/дл	74,22 [68,51;79,93]	180,6[174,41;186,79]*
Общий холестерин, мг/дл	94,54 [89,81;99,29]	178,7[169,77;191,63]*
Холестерин ЛПНП, мг/дл	14,04 [12,48;15,6]	39,28 [36,56;42,00]*
Холестерин ЛПВП, мг/дл	60,14 [56,99;63,29]	34,71 [31,91;37,51]*
Индекс атерогенности	0,57	4,14
Маркер углеводного обмена		
Уровень глюкозы плазмы крови, ммоль/л	5,58 [4,60;6,55]	8,02 [6,53;9,51]
Маркеры общетоксического действия		
Билирубин, мкмоль/л	4,28 [4,04;4,50]	7,37 [6,69;7,78]*
АЛТ, ед/л	31 [27; 35]	43 [38; 42]*
ЩФ, ед/л	166 [144;191]	227 [207;328]*
ЛДГ, ед/л	1751 [1398; 2112]	2232 [1751; 2713]*
Мочевина, мм/л	4,0 [4,11;4,43]	4,2 [3,95;4,45]
Креатинин, мкМ/л	30 [27;33]	69 [64;74]*
Общий белок, г/л	76,6 [75,3;81,8]	74,0 [67,1;78,8]
Масса тела, г	257,7 [236,3;279,1]	446,9 [429,3;483,6]

Примечание: * $p < 0,05$ (метод Mann-Whitney); индекс атерогенности = (общий ХС – ЛПВП)/ЛПВП

Как видно, все параметры, характеризующие ожирение в данном варианте моделирования выражены, получена дислипидемия. Увеличение билирубина, АЛТ, ЩФ

свидетельствует о возможном стеатозе печени.

Уровень гликемии достоверно не превышает контрольные значения, но тест толерантности к инсулину ясно подтверждает развитие инсулинорезистентности у крыс (таблица 3).

Таблица 3 – Тест толерантности к инсулину (n = 6), Me[Q1;Q3]

Группы экспериментальных животных	AUC
Контроль	852,5 [772,4;932,6]
Опыт	1362,9 [1301;1423,4]*

Примечание: AUC – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» глюкозы 0–120 мин; * $p < 0,05$.

Поскольку за 8 недель не удалось получить артериальную гипертензию, то использовали перегрузку организма крыс NaCl (0,8%) (таблица 4).

Таблица 4 – Уровень артериального давления у крыс, Me [Q1;Q3]

Показатели АД	Среднее систолическое АД, до приема 0,8 % NaCl (исходное)	Среднее систолическое АД, после 6 дней приема 0,8 % NaCl
Крысы Wistar, самки овариэктомированные	150 [139,7;160,3]	219 [205,4;232,6]*

Примечание: * $p < 0,05$ (метод Mann-Whitney)

Морфологическое исследование выявило гиалиново-капельную дистрофию кардиомиоцитов, белковую и жировой дистрофию в почках, дистрофию клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, стеатогепатоз. Морфометрия жировой ткани определила гипертрофию и гиперплазию адипоцитов.

Таким образом, моделирование метаболического синдрома путем комплексного воздействия – овариэктомия + диета с избытком углеводов (10 %-ный раствор фруктозы) и жиров (диета с повышенным содержанием жиров AIN-76A), с добавлением солевого питья (0,8% NaCl) – дает приемлемый вариант метаболического синдрома (инсулинорезистентность + триглицеридемия + ожирение + гипертензия) с добавочным компонентом в виде гиперхолестеринемии и стеатоза печени.

Следует указать, что крысы, не взятые в основной эксперимент, по истечении 8 недель и оставленные еще на 4 недели, продолжая получать избыток жиров и углеводов, все остались живыми, без внешних признаков ухудшения общего состояния. Таким образом, в отличие от первого варианта модели, модель с использованием меньшей концентрации сахарозы может оказаться приемлемой для скрининга.

Компонентный состав экстрактов клюквы, брусники, черники. Антиоксидантный, цитопротекторный и противовоспалительный потенциал in vitro. Концентрация всех полифенолов, определенная по Фолин-Чокалтеу относительно галловой кислоты составляет в экстракте клюквы 4630 мг/л (4320-5120), несколько больше в экстракте брусники – 8723 мг/л (7950-9220) и максимально в экстракте черники – 17610 мг/л (15990-18250).

Рисунок 2 отражает распределение основных полифенольных компонентов в экстрактах северных ягод.

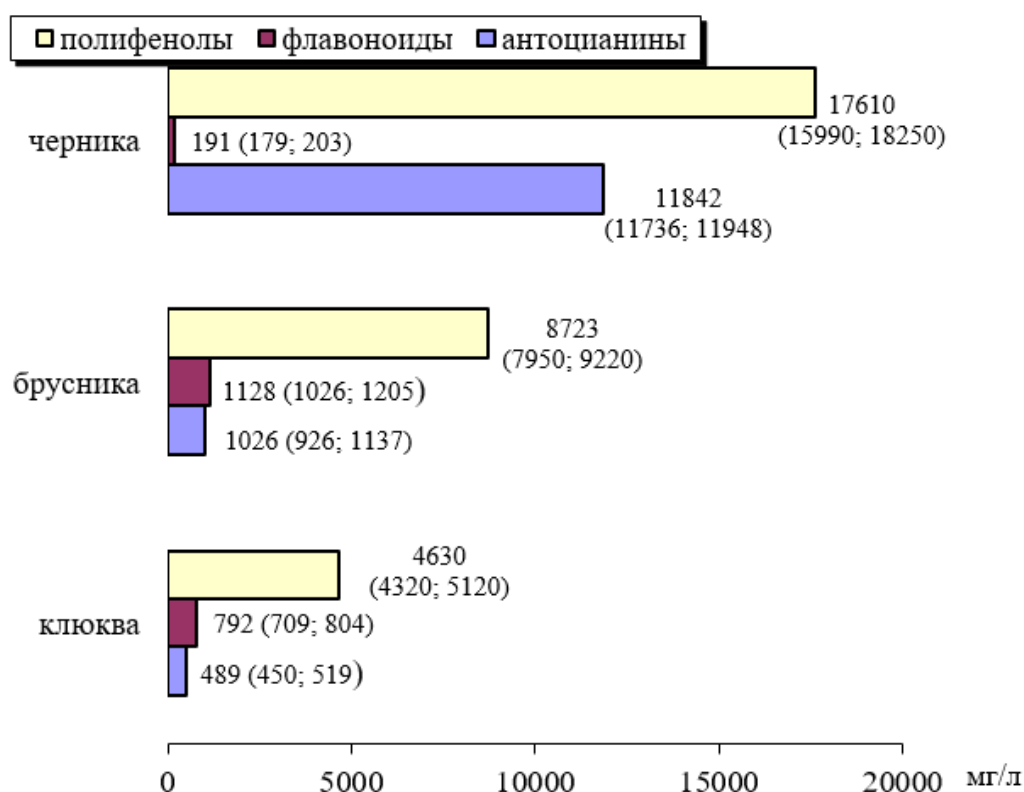


Рисунок 2. Фенольный состав экстрактов клюквы, брусники, черники (Белова Е.А. и др. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2018. – №1. – С. 75-84)

Более детально состав полифенольных компонентов водно-спиртовых экстрактов черники, брусники и клюквы представлен в таблице 5 (приведены средние арифметические значения по трем определениям без стандартной ошибки среднего).

Таблица 5 – Компонентный состав фенольных соединений в экстрактах ягод, мг/л

№	Компонент в соответствии со стандартом	Клюква	Брусника	Черника
Галловая кислота и катехины				
1	Gallic acid	115	104	170
2	(+)-Catechin	128	204	176
3	(-)-Epicatechin	21	73	301
Флавоноиды				
1	Flavonols	680	704	820
2	Flavan-3-ols	810	1160	1005
3	Tyrosol	15	27	11
4	Kaempferol	-	31	-
5	Kaempferol 3-glucoside	5	N	7
6	Myricetin/Myricetin-glycoside	62	10	28
Кверцетин (производные Quercetin-3-)				
1	Glucuronide	71	50	107
2	Galactoside	121	96	307
3	Glucoside	44	66	73
4	Xyloside	11	14	N
5	Arabinopyranoside	68	40	86
6	Arabinofuranoside	27	29	22

№	Компонент в соответствии со стандартом	Клюква	Брусника	Черника
7	Rhamnoside	18	22	5
Процианидины				
1	Procyanidin B 1	22	17	51
2	Procyanidin B 2	38	33	50
3	Procyanidin (integral)	80	79	137
Фенольные кислоты				
1	Protocatechuic	10	11	103
2	4-Hydroxybenzoic	13	8	4
3	3-p-Coumaroylquinic	27	69	87
4	Chlorogenic	418	300	218
5	trans-Caffeic	5	6	9
6	Syringic	-	19	4
7	trans-p-Coumaric	8	40	13
8	trans-Ferulic	8	16	6
9	Hydroxybenzoic	55	16	40
10	Hydroxycinnamic	570	611	300

Примечание: N – нет данных

Для исключения фактора влияния общей концентрации полифенолов на результаты экспериментов по оценке активности концентрации полифенолов в сравниваемых экстрактах были выравнены до уровня экстракта клюквы – примерно 5000 мг/л, путём разведения экстрактов брусники и черники. Нейтрализация DPPH-радикала после 10-минутной инкубации с испытуемым веществом (среднее из трёх повторений) для экстракта клюквы составила 59 %, для экстракта брусники 66 % и для экстракта черники 81 %.

Ингибирование ABTS+ радикала, выраженное в тролокс-эквиваленте (ТЕ) при концентрации полифенолов ~ 5000 мг/л составило для экстракта клюквы 61,2 [57,1; 69,7], экстракта брусники 58,4 [49,2; 69,4], для экстракта черники 91,6 [85,0; 96,4].

Как видно, в тесте с DPPH-радикалом выявить различие в антирадикальной активности между тремя экстрактами северных ягод сложно, но сравнение экстрактов, уравненных по показателю общего содержания полифенолов, в тесте ингибирующей способности в отношении ABTS+ радикала по сравнению с Троллоксом можно видеть статистически значимое преимущество экстракта черники. Есть основания считать, что не только уровень концентрации полифенолов важен и не только общее полифенольное число определяет антирадикальную активность, но и содержание компонентов. Например, отсутствие значимого содержания галловой кислоты в экстрактах клюквы и брусники и присутствие этого полифенольного соединения в экстракте черники может и придавать дополнительные антиоксидантные свойства, зафиксированные в данном разделе работы.

В стандартном тесте МТТ оценивали результаты изменения жизнеспособности изолированных клеток (первичная культура альвеолярных макрофагов кроликов или перевиваемая культура эпителиальных клеток) при инкубации клеток с исследуемыми экстрактами северных ягод. Результаты получены однотипные, ниже приведены количественные данные для МТТ с использованием НЕК293 (таблица 6 и таблица 7).

Таблица 6 – Жизнеспособность изолированных клеток НЕК293 в присутствии экстрактов клюквы, брусники, черники (n = 8)

Исследуемые экстракты	Показатель жизнеспособности (% от 100 % контроля, Ме [Q1;Q3])	
	Разведение 1:100	Разведение 1:10
Экстракт ягод клюквы	101,5 [82,0; 116,7]	117,0[96,4;131,5]
Экстракт ягод брусники	96,6 [83,1; 108,6]	117,1[96,5;135,9]
Экстракт ягод черники	114,2[90,2;125,3]	123,7[109,4;148,3]

(Белова Е.А. и др. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2020. – №1. – С. 86-93)

Таблица 7 – Влияние экстрактов плодов клюквы, черники, брусники на жизнеспособность клеток НЕК293 в присутствии доксорубина (n = 8)

Исследуемые субстанции	Показатель жизнеспособности (% от 100 % контроля, Ме [Q1;Q3])
Доксорубин 1 мкг/мл	30,2 [20,8;39,6]
Доксорубин 10 мкг/мл	13,2 [10,5;16,7]
Доксорубин 10 мкг/мл + экстракт клюквы 1:100	91,4 [76,4;110,1]*
Доксорубин 10 мкг/мл + экстракт черники 1:100	90,6 [71,7;121,9]*
Доксорубин 10 мкг/мл + экстракт брусники 1:100	77,4 [52,2;98,5]*

Примечание: * $p < 0,05$ (метод Mann-Whitney) по отношению к значению жизнеспособности в присутствии доксорубина 10 мкг/мл

(Белова Е.А. и др. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2020. – №1. – С. 86-93)

Как следует из полученных данных, при инкубации эпителиальных клеток перевиваемой клеточной культуры исследуемые экстракты плодов клюквы, черники, брусники в разведениях 1:100 не проявляют цитотоксического действия, а способствуют сохранению жизнеспособности клеток, при увеличении концентрации экстрактов плодов клюквы, черники, брусники, показатели жизнеспособности клеток растут. Способность исследуемых экстрактов плодов клюквы, черники, брусники предохранять клетки от воздействия цитотоксического действия наглядно выявляется в экспериментах с доксорубином. Доксорубин как стандарт цитотоксической субстанции, ингибирует жизнеспособность клеток перевиваемой культуры в значительной степени, но внесение экстрактов северных ягод в среду инкубации принципиально меняет положение: клетки сохраняют жизнеспособность.

Ситуация с жизнеспособностью альвеолярных макрофагов кролика в тесте МТТ аналогична описанной.

Вероятность проявления противовоспалительного эффекта полифенольных экстрактов северных ягод *in vitro* выявилась в тесте с ингибированием экспрессии генов воспалительных биомаркеров в ЛПС-стимулированных RAW264.7 макрофагах, данные приведены в таблицах 8–10.

Таблица 8 – Эффект ингибирования экспрессии генов воспалительных биомаркеров в ЛПС-стимулированных RAW264.7 макрофагах в присутствии экстракта плодов клюквы (n = 7)

Условия эксперимента	Коэффициент по отношению к ЛПС-стимуляции, Ме [Q1;Q3]	
	IL-1 β	IL-6
Контроль (интактные клетки)	0,00	0,04
ЛПС стимуляция	1	1
Уровень концентрации экстракта плодов клюквы		
50 мкг/мл	1,37 [1,01;1,66]*#	1,53 [1,11;1,67]*#
100 мкг/мл	0,86 [0,64;0,98]*#	1,20 [0,70;1,44]#
150 мкг/мл	0,49 [0,36;0,71]*#	0,70 [0,47;0,91]*
Дексаметазон, 10 μ M	0,25 [0,13;0,33]	0,47 [0,38;0,55]

Примечание: уровень воздействия ЛПС принят условно за 1; * $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню стимуляции ЛПС; # $p < 0,05$ по отношению к позитивному контролю с дексаметазоном (метод Mann-Whitney)

(Белова Е.А. и др. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2018. – №1. – С. 75-84)

Таблица 9 – Эффект ингибирования экспрессии генов воспалительных биомаркеров в ЛПС-стимулированных RAW264.7 макрофагах в присутствии экстракта плодов брусники (n = 7)

Условия эксперимента	Коэффициент по отношению к ЛПС-стимуляции, Ме [Q1;Q3]	
	IL-1 β	IL-6
Контроль (интактные клетки)	0,00	0,04
ЛПС стимуляция	1	1
Уровень концентрации экстракта плодов брусники		
50 мкг/мл	0,76 [0,55;0,88]*#	1,29 [1,01;1,3]*#
100 мкг/мл	0,22 [0,11;0,44]*	1,19 [0,99;1,22]#
150 мкг/мл	0,33 [0,19;0,48]*	0,65 [0,53;0,74]*
Дексаметазон, 10 μ M	0,25 [0,13;0,33]	0,47 [0,38;0,55]

Примечание: уровень воздействия ЛПС принят условно за 1; * $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню стимуляции ЛПС; # $p < 0,05$ по отношению к позитивному контролю с дексаметазоном (метод Mann-Whitney)

(Белова Е.А. и др. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2018. – №1. – С. 75-84)

Таблица 10 – Эффект ингибирования экспрессии генов воспалительных биомаркеров в ЛПС-стимулированных RAW264.7 макрофагах в присутствии экстракта плодов черники (n = 7)

Условия эксперимента	Коэффициент по отношению к ЛПС-стимуляции, Me [Q1;Q3]	
	IL-1 β	IL-6
Контроль (интактные клетки)	0,00	0,04
ЛПС стимуляция	1	1
Уровень концентрации экстракта плодов черники		
50 мкг/мл	0,72 [0,66;0,89]*#	0,93 [0,78;1,01]
100 мкг/мл	0,41 [0,25;0,58]*	0,50 [0,38;0,58]*
150 мкг/мл	0,35 [0,24;0,49]*	0,46 [0,38;0,54]*
Дексаметазон, 10 μ M	0,25 [0,13;0,33]	0,47 [0,38;0,55]

Примечание: уровень воздействия ЛПС принят условно за 1; * $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню стимуляции ЛПС; # $p < 0,05$ по отношению к позитивному контролю с дексаметазоном (метод Mann-Whitney)

(Белова Е.А. и др. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2018. – №1. – С. 75-84)

Как видно, присутствие экстрактов ягод рода *Vaccinium* в среде культивирования макрофагов на фоне стимуляции ЛПС в условиях нашего эксперимента проявляется в значительном снижении экспрессии генов, отвечающих за продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6. Наиболее выраженный эффект получен в случае использования экстракта черники. Эти результаты позволяют говорить о наличии у экстрактов северных ягод противовоспалительного потенциала.

Таким образом, установлен полифенольный состав экстрактов черники, клюквы, брусники из северо-западного региона Западной Сибири, наибольшую концентрацию полифенольных компонентов определили для экстракта черники. Для всех экстрактов северных ягод выявлен в экспериментах *in vitro* антиоксидантный, цитопротекторный и противовоспалительный потенциал, зависимый от концентрации полифенолов.

Полученные нами данные в целом, по содержанию полифенолов и антиоксидантной активности сопоставимы с результатами исследования клюквы и черники из региона Аляски [М.Н. Grace, et al., 2014], не существенно отличаясь по содержанию антоцианов и отдельных флавонов. Значительные отличия по фенольным компонентам выявляются при сравнении наших данных с данными по бруснике и клюкве из районов севера и востока Европы (Польша, Белоруссия, Норвегия) [Р. Kylli, et al., 2011; S. Skrovankova, et al., 2015]. Принято считать, что именно концентрация полифенольных компонентов определяет выраженность антирадикальных, антиоксидантных свойств [Т. Hussain, et al., 2016; G. Bjørklund, S. Chirumbolo, 2017] и полученные нами данные подтверждают данное положение. Дополнительно, результаты исследования проявлений цитопротекторного эффекта и возможности снижения экспрессии генов провоспалительных цитокинов, проведенные нами, позволяют гипотетически распространить зависимость между уровнем полифенолов и величиной как цитопротекторного, так и противовоспалительного потенциала.

Основные фармакодинамические эффекты экстрактов клюквы, брусники и черники на модифицированной модели метаболического синдрома

В качестве объекта исследования была использована модифицированная модель метаболического синдрома у крыс, вызванная овариэктомией и углеводно-жировой диетой. Дополнительно, артериальную гипертензию провоцировали ведением в течение 10 дней 0,8 % раствора натрия хлорида вместо питьевой воды [N.Tian, et al., 2005], а сахарный диабет вызывали введением стрептозоцина [Р.У. Хабриев, 2005]. Исследуемые экстракты плодов северных ягод вводили в течение 2 недель. В таблицах 11–13 представлены полученные изменения параметров у крыс с метаболическим синдромом на фоне использования экстрактов северных ягод.

Таблица 11 – Основные биомаркеры липидного обмена у крыс с МС через 2 недели на фоне применения экстрактов северных ягод, Ме[Q1;Q3]

Параметры	Плацебо (n = 17)	Клюква (n = 18)	Брусника (n = 17)	Черника (n = 17)
Общий холестерин, мг/дл	151,2 [137,7;160,6]	146,2 [139,87;152,53]	150,8 [140,4;161,1]	139,5 [130,78;142,22]
Холестерин ЛПНП, мг/дл	51,2 [47,0;55,3]	45,7 [43,3;48,1]	44,7 [41,3;48,1]	30,4 [27,7;42,1]*
Холестерин ЛПВП, мг/дл	30,0 [26,6;33,4]	50,7 [47,6;53,9]*	48,9 [43,6;54,1]*	53,7 [49,1;58,3]*
Индекс атерогенности	4,04	1,89	2,08	1,59
Триглицериды, мг/дл	180,5 [171,1;189,9]	130,0 [122,4;137,6]*	124,8 [116,3;133,3]*	125,4 [119,1;138,7]*

Примечание: * $p < 0,05$ (метод Манн-Уитнея); индекс атерогенности = (общий ХС – ЛПВП)/ЛПВП

Таблица 12 – Биомаркеры общетоксического ответа у крыс с МС через 2 недели на фоне применения экстрактов северных ягод, Ме[Q1;Q3]

Параметры	Плацебо (n = 17)	Клюква (n = 18)	Брусника (n = 17)	Черника (n = 17)
Глюкоза, ммоль/л	6,3 [4,9;7,5]	5,4 [2,9;7,8]	6,0 [2,8;9,1]	5,6 [2,9;8,7]
Билирубин, мкмоль/л	5,2 [4,3;6,0]	6,0 [5,2;6,7]	6,2 [5,2;7, 1]	5,0 [4,4;5,4]
АЛТ, ед/л	54 [49; 53]	32 [20; 34]*	38 [30;48]*	29 [21; 37]*
ЩФ, ед/л	238 [218;339]	206,0 [180,3;231,7]	185,0 [166,1;203,9]*	135,0 [113,0;157,0]*
ЛДГ, ед/л	2353 [2072; 2634]	2053 [1753; 2306]	1974 [1668; 2084]	1733 [1548; 1907]*
Мочевина, мм/л	4,2 [3,7;4,6]	4,8 [4,5;5,2]	5,1 [4,4;5,7]	3,9 [3,4;4,3]
Креатинин, мкм/л	60,0 [52,6;67,3]	50,0 [43,7;56,3]	69,0 [60,3;77,7]	68,0 [60,4;73,6]
Общий белок, г/л	80,2 [75,3;85,1]	85,4 [78,2;92,6]	80,6 [75,1;86,1]	77,4 [69,3;85,5]

Примечание: * $p < 0,05$ (метод Манн-Уитнея)

Таблица 13 – Маркеры ожирения у крыс с МС через 2 недели на фоне применения экстрактов северных ягод, Me[Q1;Q3]

Параметры	Плацебо (n = 17)	Клюква (n = 18)	Брусника (n = 17)	Черника (n = 17)
Масса тела, г	338,0 [316,0;360,0]	341,7 [304,2;379,2]	305,2 [287,3;323,1]	315,4 [290,0;330,8]
Индекс массы тела, г/см ²	69,44 [68,7;70,5]	64,8 [63,3;65,5]	60,4 [56,0;64,1]	59,7 [54,2; 64,3]
Окружность живота, см	31,4 [30,1;32,2]	32,1 [30,4;34,1]	29,7 [25,3;33,7]	27,2 [23,5;31,7]
Брюшной жир, мг/мм	488,2 [456,9;519,7]	470,4 [446,7;503,5]	464,8 [434,7;485,5]	403,7 [370,1;430,6]
Периренальный жир, г	15,6 [8,3;22,9]	15,4 [13,0;17,8]	12,5 [10,9;14,1]	12,7 [10,8;14,6]

Изменения биохимических параметров сыворотки крови крыс с моделью метаболического синдрома, отражённые в таблицах 11–13, дают основание предполагать активную корректирующую роль исследуемых экстрактов северных ягод в процессах развития типичных признаков этой патологии. Так, выраженное влияние исследуемых экстрактов на показатели липидного обмена наиболее наглядно проявляется в изменениях уровня триглицеридов в сыворотке крови. Триглицеридемия, как известно [И.Е. Чазова, В.Б. Мычка, 2003; S.M. Grundy, 2004] является ключевым звеном развития метаболического синдрома. Снижение уровня триглицеридов в крови крыс с моделью метаболического синдрома под влиянием экстрактов клюквы, брусники и черники, установленное в условиях нашего эксперимента, можно считать кардинальным признаком вмешательства использованных экстрактов ягод в патофизиологию метаболического синдрома. Хотя уровень концентрации общего холестерина остается неизменным, снижение концентрации холестерина ЛПНП обнаружено было для всех вариантов использования экстрактов ягод, хотя статистически значимого уровня это явление достигает только в случае применения экстракта ягод черники. Можно считать, что экстракт черники при двухнедельном применении у крыс с моделью метаболического синдрома способствует снижению уровня холестерина ЛПНП, эта же тенденция, но без статистической достоверности выявлена и для экстрактов клюквы и брусники. Кроме того, как следует из данных таблицы 12, общим эффектом для полифенольных экстрактов клюквы, брусники и черники при развитии метаболического синдрома является снижение уровня активности АЛТ и ЩФ. Если повышение уровня трансаминазы и щелочной фосфатазы на фоне увеличения общей массы печени при моделировании метаболического синдрома может быть отражением гепатопатии с избыточным цитолизом печёночных клеток, сопровождающейся явлениями холестаза, эти феномены считаются типичными проявлениями неалкогольной жировой дистрофии печени, присущими патофизиологии метаболического синдрома [О.Н. Корнеева 2007; S. BeLLentani, 2008]. Полученные данные относительно зафиксированного нами снижения уровня АЛТ и ЩФ при применении экстракта клюквы, брусники и черники, позволяют предполагать потенциальный терапевтический эффект экстрактов северных ягод в отношении проявлений жировой дистрофии печени при метаболическом синдроме. В условиях нашего эксперимента нам не удалось зафиксировать изменение массы тела и массы брюшного жира под влиянием исследуемых экстрактов северных ягод, назначаемых внутрь крысам с метаболическим синдромом (таблица 13).

Кроме ожирения и нарушений липидного обмена, гипертензия также считается

кардинальным признаком метаболического синдрома (рис. 3).

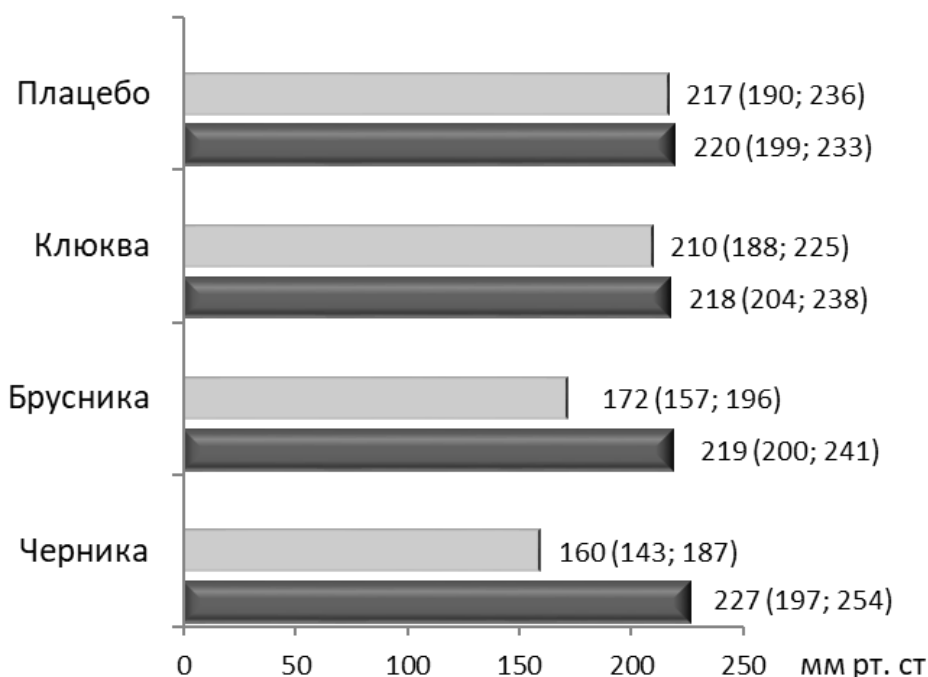


Рисунок 3. Результаты исследования влияния экстрактов черники, брусники и клюквы на систолическое артериальное давление у крыс при моделировании гипертензивного синдрома (n=8).

(Белова Е.А., Коваленко Л.В. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2016. - №1. – С.13-16)

Как видно по средним показателям систолического артериального давления выявляется тенденция снижения уровня давления у крыс на фоне применения экстрактов брусники, черники, клюквы. Однако, в случае использования экстрактов черники и брусники получены статистически значимые изменения. Можно считать, что экстракт брусники и экстракт черники препятствует возникновению гипертензивного синдрома у крыс, провоцируемого избыточным введением натрия хлорида.

Результаты исследования влияния экстрактов черники, брусники и клюквы на содержание глюкозы в крови крыс с экспериментальным стрептозоциновым сахарным диабетом приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Уровень глюкозы в крови крыс с экспериментальным стрептозоциновым сахарным диабетом на фоне метаболического синдрома

Группы животных	Уровень глюкозы крови, Me[Q1;Q3] ммоль/л,
Животные, получавшие плацебо, (n=6)	31,2 [24,3;39,5]
Животные, получавшие экстракт клюквы, (n=7)	11,1 [8,56;14,5]*
Животные, получавшие экстракт черники, (n=7)	13,2 [9,50;15,6]*
Животные, получавшие экстракт брусники, (n=5)	21,5 [18,5;24,6]

Примечание: * $p < 0,05$ в сравнении с плацебо, метод Mann-Whitney

Как видно, в группе крыс, получавших плацебо на фоне введения стрептозоцина, сформировался чрезвычайно высокий уровень гипергликемии, что объясняется введением относительно высоких доз стрептозоцина уже на фоне исходной инсулинорезистентности, вызванной длительным влиянием фруктозо-жировой диеты.

Если же животные получали экстракты плодов северных ягод, уровень сахара в крови после введения стрептозоцина не повышался так значительно как в группе плацебо. Различие с плацебо было статистически значимым в случаях применения экстракта плодов черники и клюквы.

Таким образом, водно-спиртовые экстракты черники и клюквы в условиях данной модели, очевидно, препятствуют гипергликемическому действию стрептозоцина.

Результаты оценки потенциальных остеопротективных свойств экстракта черники представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Остеопротекторные эффекты экстрактов северных ягод

Группы животных	Средняя плотность костной ткани, hounsfield, Me[Q1;Q3]
Интakтные, n=6	1651 [1603;1699]
Животные с овариэктомией, получавшие плацебо, n=6	1347 [1336;1358] p = 0,027 при сравнении с интактными животными
Животные с овариэктомией, получавшие экстракт клюквы, n=6	1408 [1358;1458] p = 0,041 при сравнении с интактными животными p = 0,202 при сравнении с плацебо
Животные с овариэктомией, получавшие экстракт брусники, n=6	1470 [1428;1512] p = 0,048 при сравнении с интактными животными p = 0,09 при сравнении с плацебо
Животные с овариэктомией, получавшие экстракт черники, n=6	1554 [1537;1571] p = 0,146 при сравнении с интактными животными p = 0,036 при сравнении с плацебо

Из данных, приведённых в таблице 15 видно, что на фоне метаболического и посткастрационного синдрома формируется значительно выраженный остеопороз у тех животных, которые получали плацебо. Но длительное, 12 недельное применение экстрактов северных ягод несколько меняет картину развития остеопороза. Так, при применении экстракта клюквы остеопороз формируется, но выраженность его имеет тенденцию уменьшения (без статистической значимости), судя по количеству hounsfield, отражающих плотность костной ткани в образце. При использовании экстракта брусники выраженность остеопороза, судя по абсолютным цифрам, также снижена и в отличие от варианта плацебо выглядит заметнее, но также не подтверждается статистически. В условиях нашего эксперимента статистически достоверно выглядит только вариант применения экстракта черники: экстракт черники статистически значимо предотвращает развитие остеопороза у крыс, оказывает положительное влияние на плотность костной ткани, повышая ее в сравнении с плацебо что может указывать на вероятные остеопротекторные свойства (рис. 7-8).

Вариант представления:

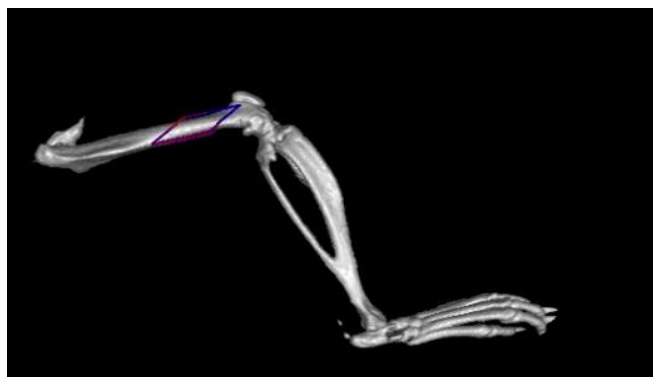
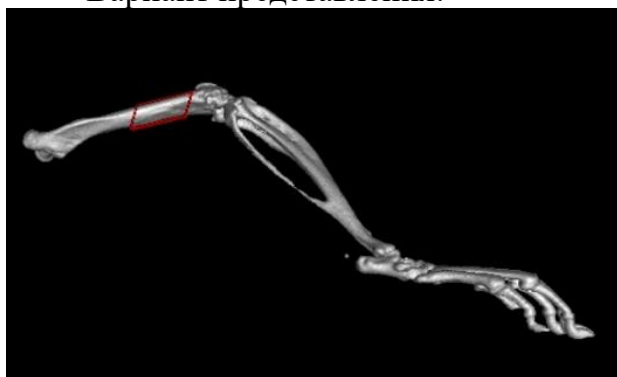


Рисунок 7. Томограмма костной ткани бедра крысы с остеопорозом на фоне метаболического синдрома, получавшей плацебо (слева) и экстракт черники (справа)

Поскольку в развитии остеопороза свободные радикалы крови имеют важное значение [G. Banfi, et al., 2017], интерес представляло исследование уровня свободных радикалов крови (АФК) и уровня ферментов антиоксидантной защиты в крови крыс с остеопорозом при применении исследуемых экстрактов северных ягод. Данные представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Антиоксидантные эффекты экстрактов плодов северных ягод в условиях модели недостаточности половых гормонов у крыс через 12 недель применения

Группы экспериментальных животных	D-ROMs test, CARR U (1 CARR U = 0.08mg/100ml H ₂ O ₂ , Me[Q1;Q3])	PAT test, U Cor (1 U Cor = 1,4 μмоль/л аскорбиновой кислоты), Me[Q1;Q3])
Интakтные крысы, n=5	311 [280;333]*	2636 [2599;2867]*
Крысы, получавшие плацебо, n=5	461 [611;522]	1256 [1112;1324]
Крысы, получавшие экстракт клюквы, n=6	388 [355;428]*	2480 [2156;2612]*
Крысы, получавшие экстракт брусники, n=5	421 [399;435]	2135 [1955;2214]*
Крысы, получавшие экстракт черники, n=6	387 [348;425]*	2677 [2511;2733]*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с плацебо, метод Mann-Whitney

D-ROMs test показывает концентрацию АФК в плазме крови. Видно, что на фоне недостаточности половых гормонов у крыс концентрация АФК наиболее высоко в группе животных, получавших плацебо. Применение экстрактов северных ягод обеспечивает снижение уровня свободных радикалов в крови крыс, статистически значимое в случае с экстрактами клюквы обыкновенной и черники обыкновенной и статистически незначимое снижение АФК при использовании экстракта брусники обыкновенной.

PAT test позволяет измерить антиоксидантный потенциал плазмы крови. На фоне остеопороза антиоксидантный потенциал значительно падает, как видно из данных эксперимента с плацебо, но во всех исследуемых группах крыс, получавших экстракты северных ягод, степень снижения уровня антиоксидантных ферментов не столь велика, как в группе плацебо. Экстракты плодов клюквы, брусники и черники при применении у крыс на фоне остеопороза и метаболического синдрома обеспечивают повышение уровня антиоксидантного потенциала, практически до нормы увеличивает потенциал антиоксидантной активности экстракт черники.

Результаты морфологических исследований, проведенных нами, призваны были доказать предполагаемые изменения, развивающиеся под влиянием применения полифенольных экстрактов северных ягод в тканях экспериментальных животных. Анализ морфологических признаков воздействия исследуемых экстрактов северных ягод на организм крыс с моделью метаболического синдрома, приведенные в данном фрагменте исследования, позволяет суммировать полученные данные следующим образом.

Использование экстракта плодов черники обыкновенной у крыс с метаболическим синдромом реализуется рядом признаков: а) в ткани сердца отмечается уменьшение отека межуточной ткани, улучшаются реологические процессы в микроциркуляторном

русле, исчезают зоны кровоизлияний и уменьшаются признаки дистрофических процессов; б) в ткани поджелудочной железы остаются лишь единичные признаки крупнокапельной дистрофии паренхимы и умеренная дистрофия ацинарных структур; в) зафиксировано остеопротективное действие на костную ткань и усиление компенсаторно-приспособительных процессов.

Результат введения экстракта плодов клюквы обыкновенной крысам с метаболическим синдромом при морфологическом исследовании проявляется: а) в ткани сердца незначительным уменьшением числа гипертрофированных кардиомиоцитов; б) в жировой ткани под воздействием экстракта клюквы происходят изменения, свидетельствующие о вероятности коррекции морфологической картины: уменьшаются признаки полнокровия, уменьшается количество разрывов соединительнотканых структур в крупных вакуолях.

Применение экстракта плодов брусники обыкновенной реализуется следующими морфологическими признаками: а) в печени сохраняется умеренный фиброз портальных трактов, но менее выражена белковая гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов; б) в ткани поджелудочной железы сохраняются очаговые крупно- и средне-капельные жировые вакуоли в паренхиме, отёк межуточной ткани; д) использование экстракта брусники практически не отражается на морфологической картине жировой ткани.

Заключение

В соответствии с гипотезой работы, экстракты северных ягод (клюквы, брусники, черники), содержавшие высокие концентрации полифенолов, могут проявлять антирадикальный и антиоксидантный эффект в организме и тем, самым ограничивать негативные последствия оксидативного стресса, являющегося одним из ведущих патофизиологических звеньев метаболического синдрома. Модифицированная в условиях нашего эксперимента модель метаболического синдрома воспроизводилась путем назначения диеты с избытком углеводов и жиров, овариэктомированным крысам, что позволило получить дополнительно остеопороз, введение крысам стрептозоцина позволило получить дополнительно высокую гипергликемию в дополнение к инсулинорезистентности, нагрузка NaCl дала возможность получить выраженную артериальную гипертензию. Таким образом, модифицированная модель метаболического синдрома позволила воспроизвести на крысах – самках основные патофизиологические черты метаболического синдрома человека.

Установлено, что по содержанию полифенолов исследуемые экстракты располагались в следующем порядке: черника > клюква > брусника. Доказательства наличия у экстрактов плодов клюквы, брусники, черники антирадикального эффекта в отношении свободных радикалов DPPH и ABTS были получены *in vitro*. В МТТ-тесте выявлена способность экстрактов поддерживать жизнеспособность клеток (цитопротекторное действие) и предотвращать цитотоксическое действие доксорубина. Противовоспалительный потенциал исследуемых экстрактов проявлялся в значительном снижении уровня экспрессии генов, отвечающих за продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6. Наиболее выраженный эффект получен в случае использования экстракта черники.

При 2-х недельном интрагастральном введении экспериментальным животным с МС исследуемых экстрактов не удалось зафиксировать изменение массы тела или жировой ткани у крыс, однако, установлено снижение уровня триглицеридов в крови, при неизменности уровня общего холестерина и ЛПВП удалось зафиксировать снижение концентрации ЛПНП. Общим эффектом для всех экстрактов является уменьшение массы

печени, снижение уровня активности АЛТ и ЩФ. Введение экстракта брусники и черники противодействуют развитию гипертензивного синдрома у крыс с моделью МС. Экстракты плодов черники и клюквы препятствуют развитию гипергликемии. Экстракт черники уменьшает степень остеопороза, увеличивая плотности костной ткани.

Результаты морфологических исследований демонстрируют позитивные изменения (снижение уровня дистрофических процессов), развивающиеся под влиянием полифенольных экстрактов северных ягод в тканях экспериментальных животных.

Таким образом, экспериментальные данные, полученные при выполнении диссертационного исследования полифенольных экстрактов черники, клюквы и брусники, дают основания предполагать возможность коррекции некоторых патофизиологических процессов при метаболическом синдроме. Предполагаем, что в основе потенциального корректирующего терапевтического воздействия может быть цитопротекторный эффект, как интегральное проявление антиоксидантного, антирадикального и противовоспалительного компонентов действия экстрактов клюквы, брусники и черники. Найденные в исследовании патофизиологические пути вероятной регуляции развития метаболического синдрома могут быть приняты в качестве основания для проведения клинических исследований экстрактов северных ягод как корректоров при МС.

Выводы

1. Модификация модели метаболического синдрома у крыс, заключающаяся в совмещении стандартного подхода в виде назначения диеты с избытком углеводов и жиров и дополнительных приемов в виде овариэктомии, приводит к остеопорозу. Введение стрептозотоцина провоцирует развитие сахарного диабета, нагрузка натрием хлоридом инициирует артериальную гипертензию. Эти экспериментальные воздействия позволяют имитировать основные проявления метаболического синдрома человека и провести исследование потенциальных терапевтических свойств полифенольных экстрактов плодов северных ягод.

2. Водно-спиртовые полифенольные экстракты плодов черники, брусники и клюквы, собранные в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре Тюменской области России, характеризуются высокой концентрацией полифенолов (17 610 мг/л, 8 723 мг/л, 4 830 мг/л, соответственно). Полифенольные экстракты плодов черники, брусники и клюквы *in vitro* ингибируют свободные радикалы в тестах DPPH и ABTS+, *in vivo*, а на модели метаболического синдрома у крыс снижают уровень свободных радикалов (на 15–16 %) и повышают активность антиоксидантных ферментов (на 69–100 %).

3. На изолированных клетках (альвеолярные макрофаги кролика и культура НЕК293) выявлены цитопротекторные свойства экстрактов плодов клюквы, брусники и черники, выражающиеся в поддержании жизнеспособности клеток в присутствии цитотоксического агента доксорубина (увеличение показателя жизнеспособности по сравнению с плацебо на 60–61,2 %, 53,5–47,2 % и 62,4–60,1 % соответственно). В клеточной культуре проявляется противовоспалительный эффект экстрактов черники, брусники и клюквы в виде дозозависимого снижения уровня экспрессии генов, отвечающих за продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6. При этом эффект экстрактов северных ягод при концентрации 150 мкг/мл сопоставим с противовоспалительным эффектом дексаметазона.

4. Двухнедельное внутрижелудочное введение крысам с МС экстрактов плодов клюквы, брусники и черники вызывало в каждом случае статистически значимое повышение уровня ЛВП и снижение атерогенного индекса; при этом введение экстракта

черники приводило к снижению ЛПНП. Одновременно отмечено статистически значимое снижение АЛТ и ЩФ в совокупности с уменьшением выраженности патоморфологических признаков гепатоза. Введение экстрактов клюквы и черники способствовало статистически значимому снижению уровня глюкозы (на 64 % и 58 % соответственно) и уменьшению признаков дистрофии паренхимы и ацинарных структур поджелудочной железы.

5. При двухнедельном внутрижелудочном введении крысам с МС экстрактов брусники и черники произошло статистически значимое уменьшение выраженности гипертензивного синдрома (соответственно на 20 % и 25 %). При морфологическом исследовании отмечали уменьшение отека межуточной ткани миокарда, а также гидропической дистрофии дистальных канальцев почек. Экстракт черники препятствовал развитию остеопороза путем увеличения плотности костной ткани и поддержания процессов костного ремоделирования.

Практические рекомендации

1. Модифицированная модель метаболического синдрома на крысах, включающая следующие состояния: ожирение, триглицеридемию, гиперхолестеринемию, неалкогольный стеатогепатоз, инсулинорезистентность, сахарный диабет II типа, артериальную гипертензию, остеопороз, может быть использована стандартно в экспериментальной патофизиологии и фармакологии.

2. Экстракт плодов дикорастущих ягод черники, собранных в Ханты-Мансийском округе – Югре Тюменской области России, рекомендуется использовать как основу биологически активной пищевой добавки, снижающей риск развития возраст-ассоциированной патологии и метаболического синдрома.

Статьи в рецензируемых научных изданиях по специальности

3.3.3 – патологическая физиология, и приравненные к ним публикации

1. Антирадикальная активность полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium* и влияние их на оксидативный статус / **Е. А. Белова**, Н. С. Кавушевская, Е. А. Кривых, Л. В. Коваленко // Вестник Новгородского Государственного университета им. Ярослава Мудрого. – 2022. – № 1 (126). – С. 47–51.

2. Патологические процессы при метаболическом синдроме как вероятные мишени терапевтического воздействия / Л. В. Коваленко, **Е. А. Белова**, А. Е. Гуляев, Н. С. Кавушевская, Т. А. Синюкова, Е. А. Кривых // Патогенез. – 2022. – Т. 20 – № 1. С. 4–13.

3. Изучение фенольных соединений ягод трех видов растений рода *Vaccinium*, произрастающих в Ханты - Мансийском автономном округе / **Е. А. Белова**, В. С. Тритэк, З. Т. Шульгау, А. Е. Гуляев, Е. А. Кривых, Л. В. Коваленко, А. А. Дренин, Э. Х. Ботиров // Химия растительного сырья. – 2020. – № 1. – С. 107–116. (**Scopus**).

4. Полифенольные компоненты северных дикорастущих ягод, антиоксидантный и противовоспалительный потенциал их экстрактов / **Е. А. Белова**, А. Е. Гуляев, Л. В. Коваленко, З. Т. Шульгау // Вестник СурГУ. Медицина. – 2018. – № 1 (35). – С. 75–84.

5. Цитопротекторный потенциал полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium*, произрастающих на территории Югры, в условиях *in vitro* / **Е. А. Белова**, Е. А. Кривых, Н. С. Кавушевская, Л. К. Быстревская, С. Б. Жаутикова // Вестник СурГУ. Медицина. – 2020. – № 1. – С. 86–93.

Статьи в научных журналах и сборниках, не входящих в список ВАК

6. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства концентратов полифенолов / Л. В. Коваленко, Л. Д. Белоцерковцева, Е. А. Кривых, А. Е. Гуляев, **Е. А. Белова** // Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере :

сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, Сургут, 29 октября 2016 года. – Сургут : Сургутский государственный университет, 2016. – С. 386–394.

7. Антиоксидантный и связанные с ним эффекты концентрата полифенолов винограда казахстанской селекции и экстрактов северных ягод, обнаруживаемые в условиях экспериментов *in vitro* и *in vivo* / З. Т. Шульгау, Ш. Д. Сергазы, Е. А. Кривых, В. С. Тритэк, Г. Н. Дудикова, Э. Х. Ботиров, Л. В. Коваленко, **Е. А. Белова**, А. Е. Гуляев // Астана Биотех 2018 : Материалы Международного Симпозиума Астана, 12–13 июня 2018 года. – Астана : НЦБ, 2018. – С. 193.

8. Белова Е. А. Создание модели метаболического синдрома у крыс / **Е. А. Белова** // Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием (Санкт-Петербург 12-13 апреля 2018 г.). – Санкт-Петербург, 2018. – С. 38–39.

9. Белова Е. А. Эффекты флавоноида кверцетина на модели метаболического синдрома у крыс / **Е. А. Белова** // Актуальные проблемы патофизиологии: XXI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием (Санкт-Петербург, 8-9 апреля 2015 г.). – Санкт-Петербург, 2015. – С. 21–22.

10. Вероятность влияния концентрата полифенолов винограда и экстрактов северных ягод на процессы аутофагии / Ш. Д. Сергазы, З. Т. Шульгау, В. С. Тритэк, Е. А. Кривых, Г. Н. Дудикова, Э. Х. Ботиров, **Е. А. Белова**, Л. В. Коваленко, А. Е. Гуляев // Астана Биотех 2018 : Материалы Международного Симпозиума, Астана, 12-13 июня 2018 года. – Астана : НЦБ, 2018. – С. 78.

11. Коррекция основных проявлений метаболического синдрома с помощью концентратов полифенолов винограда, клюквы, брусники и черники / Ш. Д. Сергазы, З. Т. Шульгау, В. С. Тритек, Г. Н. Дудикова, Л. В. Коваленко, **Е. А. Белова**, Е. А. Кривых, Г. К. Байдильдинова, Г. М. Адильгожина, Ж. Р. Хасенбекова, А. Е. Гуляев, Т. С. Нургожин // Вестник медицинского центра УДПРК. – 2017. – № 2 (67). – С. 143–144.

12. Патофизиология метаболического синдрома : монография / Е. В. Корнеева, Л. Д. Белоцерковцева, Л. В. Коваленко, И. Ю. Добрынина, А. В. Руденко, Л. Н. Верижникова, **Е. А. Белова**. – Москва : Издательский дом «Высшее Образование и Наука», 2012. – 136 с.

13. Разработка модели метаболического синдрома у крыс / А. Е. Гуляев, Ш. Д. Сергазы, З. Т. Шульгау, **Е. А. Белова**, Е. А. Кривых // Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере : сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции, Сургут, 27 октября 2020 года. – Сургут, 2020. – С. 27–38.

14. Фенольные соединения ягод трех видов растений рода *Vaccinium* L. / **Белова Е. А.**, Тритэк В. С., Шульгау З. Т., Гуляев А. Е., Коваленко Л. В., Дренин А. А., Ботиров Э. Х. // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации : сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума, Москва, 14-19 мая 2018 года. – Москва : ИФР РАН, 2018. – С. 227–232.

15. Belova E. A. Basic pharmacodynamic effects of extracts of cranberries, cowberries and blueberries on the model of metabolic syndrome / **Е. Belova**, L. Kovalenko, A. Gulyaev // Obesity Facts. 25-th European Congress on Obesity (Вена, Австрия, 23-26 мая 2018 г.). – 2018. – Vol. 11, Sup.1. – P. 105–106.

16. Belova E. A. Test results of antioxidant activity of some substances as the first degree of corrector adjustment of the main manifestations of metabolic syndrome / **Е. А. Belova**, A. E. Gulyaev, L. V. Kovalenko // Fundamental science and technology – promising developments (USA). – 2015. – Vol. 2. – P. 56–61.

17. Phenolic compounds from berries of three vaccinium species / **E. A. Belova**, A. E. Gulyaev, L. V. Kovalenko, A. A. Drenin, E. K. Botirov, V. S. Tritek, Z. T. Shul'gau // Chemistry of natural compounds. – 2016. – Vol. 52, № 2. – P. 329–330.

Список сокращений

АД – артериальное давление
АЛТ – аланинаминотрансфераза |
АФК – уровень свободных радикалов крови
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
МС – метаболический синдром
МТТ – тест для оценки метаболической активности клеток
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ЩФ – щелочная фосфатаза
AUC – интегральная площадь под фармакокинетической кривой
DPPH – 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил
NaCl – хлорид натрия