

Бюджетное учреждение высшего образования
Ханты-Мансийского автономного округа – Югры
«Сургутский государственный университет»

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Людмила Васильевна Коваленко

кандидат медицинских наук, доцент

Кривых Елена Алексеевна

Сургут – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА.....	11
1.2. ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА....	13
1.3. ВЕРОЯТНЫЕ ПУТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ВЕДУЩИЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА	19
1.4. ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СЕВЕРНЫХ ЯГОД РОДА VACCINIUM КАК КОРРЕКТОРЫ ОСНОВНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ЖИВОТНЫЕ	38
2.2. РЕАКТИВЫ	39
2.3. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ЯГОД РОДА VACCINIUM.....	39
2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭКСТРАКТОВ ЯГОД РОДА VACCINIUM	40
2.5. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ (LC-MS ANALYSIS)	41
2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ: DPPH-ТЕСТ И ABTS-ТЕСТ	43
2.7. МТТ-ТЕСТ	44
2.8. КУЛЬТУРА МАКРОФАГОВ И ПЦР-АНАЛИЗ	46
2.9. МЕТОДЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА .	48
2.10. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.11. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	50
ГЛАВА 3. МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА	52

ГЛАВА 4. ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЭКСТРАКТОВ КЛЮКВЫ, БРУСНИКИ, ЧЕРНИКИ: АНТИОКСИДАНТНЫЙ, ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ IN VITRO.....	70
ГЛАВА 5. ОСНОВНЫЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТОВ КЛЮКВЫ, БРУСНИКИ И ЧЕРНИКИ НА МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА	88
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	120
ВЫВОДЫ	133
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	135
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	138

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Высокая распространенность метаболического синдрома (МС) среди населения обуславливает интенсивность исследования путей его профилактики и коррекции факторов риска [73, 278, 283]. Результаты исследований *in vitro* и *in vivo* однозначно демонстрируют высокий потенциал полифенольных биологически активных соединений в контроле липогенеза, гликемии, дифференцировки адипоцитов, ослаблении воспалительных процессов и подавлении окислительного стресса [21, 116, 238].

Среди источников полифенольных соединений, потенциально перспективных для исследования при МС, выделяют ягоды темного цвета, содержащие антоцианы и родственные им флавоноиды [74, 81, 290]. Северные ягоды рода *Vaccinium*: клюква (*Vaccinium oxycoccos* L.), черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.) и другие как вероятные источники биологически активных субстанций изучаются достаточно широко. Полагают, что эти ягоды, содержащие микроэлементы и ряд биологически активных фитохимических веществ, могут быть перспективными диетическими продуктами при МС [174, 239].

Антиоксидантные свойства этих ягод выявлены в различных исследованиях: *in vitro*, на животных и на людях [181]. Некоторые авторы [294] для продуктов из ягод черники выявили корректирующее влияние на модели МС, проявляющееся снижением уровня оксидативного стресса в тканях в сочетании с гипогликемическим и гиполипидемическим эффектами. Так, в клиническом исследовании De Mello V.D. и соавт. [160] при МС установлена связь между диетой с включением черники и уровнем гиппуровой кислоты, являющейся биомаркером потребления полифенолов, и оказывающей влияние на улучшение гликемического контроля. В целом можно предположить, что эти ягоды, богатые биологически активными полифенольными соединениями с антиоксидантной активностью, могут быть полезными в коррекции МС, но при этом следует

констатировать, что исследования по этой проблеме малочисленны, а результаты противоречивы [81]. Это относится, в первую очередь, к исследованиям фармакодинамики полифенольных соединений при использовании их для патогенетической коррекции различных проявлений МС [20, 95].

Следует учитывать, что существует вероятность значительных колебаний состава полифенольных соединений рода *Vaccinium* и их свойств в зависимости от места произрастания ягод и степени обработки растений при выращивании. В связи с этим актуальными становятся исследования, включающие изучение влияния Северного региона на химический состав этих ягод [7, 24, 32]. Особенности химического состава дикорастущих ягод северо-западной части Сибири описаны в нескольких работах, выполненных в Сургутском государственном университете [31, 32, 33].

Результаты этих исследований, проведенных с дикорастущими ягодами рода *Vaccinium*, наводят на мысль об их более высоком биологическом потенциале в сравнении с культивируемыми. В качестве примера можно привести исследования дикорастущей клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) [14], черники (*Vaccinium myrtillus* L.) и брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.) [52, 228]. При этом медико-биологические исследования полифенолов ягод рода *Vaccinium* из Сибири практически отсутствуют. Таким образом, более углубленные исследования в отношении полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium* региона Западной Сибири как варианта возможной коррекции проявлений метаболического синдрома представляются актуальными и заслуживают внимания в эксперименте и клинике.

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

Задачи исследования

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.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на основе моделирования метаболического синдрома с применением различных методов биохимии, экспериментальной фармакологии и статистики. В исследовании использовано современное высокотехнологичное научное оборудование. В качестве материала исследования использовались здоровые половозрелые крысы-самки Wistar и крысы с моделью метаболического синдрома, клетки первичной культуры альвеолярных макрофагов кролика, клетки перевиваемой культуры НЕК293, клеточная линия мышинных макрофагов RAW 264.7 (ATCC TIB-71). Изучено влияние полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium* на проявления экспериментального 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.

Личный вклад автора

Личное участие автора заключалось в анализе литературы по теме диссертационного исследования, разработке дизайна в соответствии с его целью и задачами исследования, получении исходных экспериментальных данных, интерпретации и систематизации полученных результатов. Все эксперименты выполнены автором лично или при консультативной помощи сотрудников лаборатории и кафедры патофизиологии. Автором проанализированы результаты исследований, сформулированы выводы и практические рекомендации. При обсуждении результатов исследования проведен сравнительный анализ личных наблюдений и данных литературы. Статистическая обработка полученных результатов проведена лично диссертантом.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается четко сформулированными задачами, применением современных подходов для решения

поставленных задач и методов исследования, интерпретацией полученных результатов при помощи соответствующих методов статистики. Результаты исследования представлены и апробированы на российских и международных научных конференциях и опубликованы в научных журналах.

Апробация работы

Результаты исследования доложены:

1. На XXI Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 8–9 апреля 2015 г.). Тема устного доклада с презентацией: «Эффекты флавоноида кверцетина на модели метаболического синдрома у крыс».

2. На 25 European Congress on Obesity (Вена, Австрия, 23–26 мая 2018 г.). Тема постерного доклада: «Basic pharmacodynamic effects of extracts of cranberries, cowberries and blueberries on the model of metabolic syndrome».

3. На XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 12–13 апреля 2018 г.). Тема доклада с презентацией: «Создание модели метаболического синдрома у крыс».

4. На первой международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Технологии будущего нефтегазодобывающих регионов», проведенной в рамках первого Международного молодежного научно-практического форума «Нефтяная столица» (Сургут, 8–9 февраля 2018 г.). Тема устного доклада с презентацией: «Потенциальные фармакотерапевтические свойства полифенолов винограда и дикорастущих ягод».

5. На X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 14-19 мая 2018 г.). Тема доклада: «Фенольные соединения ягод трех видов растений рода *Vaccinium* L.».

6. На Международном симпозиуме «Астана Биотех 2018» (Астана, Казахстан 12-13 июня 2018 г.). Тема постерного доклада: «Вероятность влияния

концентрата полифенолов винограда и экстрактов северных ягод на процессы аутофагии».

По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них 5 статей в журналах, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» ВАК РФ для изложения результатов докторских и кандидатских диссертаций, 1 монография.

Объем и структура работы

Материал диссертации изложен на 174 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы 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.

Внедрение результатов исследования

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).

ГЛАВА 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Распространенность метаболического синдрома

Метаболический синдром классически определяется как совокупность, по крайней мере, трех из пяти следующих состояний: центральное ожирение, гипертензия, гипергликемия, гипертриглицеридемия и низкий уровень липопротеинов высокой плотности в сыворотке [37]. Консенсус международных медицинских сообществ, подтверждает, что метаболический синдром – это совокупность метаболических заболеваний и нарушений, в том числе гипергликемии, гипертензии, дислипидемии и ожирения, особенно абдоминального варианта [261].

Хотя определение точной распространенности метаболического синдрома остается сложной задачей, эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что более одного миллиарда человек в мире страдают от метаболического синдрома, и это значение постоянно растет, учитывая изменения образа жизни [100, 145]. В настоящее время распространенность МС наиболее низкая в Китае (15,2–21,1% населения) [246] и на Филиппинах (11,9%) [247], в то время как среди населения США данный показатель составляет 34,2% [222], а в Пакистане достигает 49,0% [247]. Причем распространенность метаболического синдрома увеличивается не только в США и Европе, но и в азиатских странах, таких как Китай, Индия и Южная Корея [80, 181]. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), США наблюдалось увеличение распространенности метаболического синдрома на 35% с момента появления этого термина в 1980-х годах до 2012 г. [222]. Распространенность МС по некоторым оценкам составляет около одной трети взрослого населения Америки [261]. Более поздние данные Института исследования здоровья и питания (NHANES) свидетельствуют о некотором снижении распространенности МС до 24% у мужчин и 22% у женщин [213].

Эпидемиологические данные свидетельствуют, что распространенность МС зависит от пола, возраста, этнического происхождения, территории проживания, образования, уровня физической активности и многих других параметров и факторов [50].

Поскольку распространенность метаболического синдрома растет во всех государствах [10, 69, 108, 169], увеличиваются и медицинские расходы, связанные с лечением ожирения. Именно поэтому профилактика метаболического синдрома и борьба с ним оцениваются как важные проблемы здравоохранения.

В Российской Федерации по результатам исследований 40% населения имеют 2 компонента МС, 11% – 3 и более его составляющих. Чаще он встречается у лиц среднего и старшего возраста (30–40 %). Высока его распространенность среди больных ожирением – 49%; среди лиц с нарушенной толерантностью к глюкозе частота МС составляет 50%, а при сахарном диабете – 80% [37].

Более детальная оценка эпидемиологии метаболического синдрома в российской популяции людей 25–64 лет проведена в рамках исследования ЭССЕ-РФ 2 в 2017 г. [36]. Абдоминальное ожирение выявлено у 49,7 % мужчин и 61,6 % женщин. Метаболический синдром выявлен у 33 % россиян в возрасте 25–64 лет. Авторы исследования предполагают, что доля лиц с метаболическим синдромом увеличивается с возрастом, что связано с увеличением продолжительности жизни населения РФ, и позволяет предположить рост общего числа лиц, имеющих данную патологию.

В Сибири, в соответствии с результатами глобального популяционного российского исследования, распространенность метаболического синдрома составила от 18% у мужчин до 33% у женщин [51]. Для северных регионов России (Архангельская область) приводятся данные в 23,7% [249]. При этом следует учитывать, что в Сибири и на Дальнем Востоке зарегистрировано несколько меньше больных сахарным диабетом, чем в европейской части страны, но эти показатели удваиваются в среднем за 10–15 лет. Среди коренного азиатского населения распространенность сахарного диабета обоих типов и метаболического синдрома меньшая, чем среди европеоидных жителей Сибири

[41]. В Московском регионе с 1998 года по 2004 год проводилась программа «Целевая диспансеризация населения г. Москвы», в ходе которой было обследовано 3 272 272 мужчин и женщин в возрасте 35–55 лет. Установлено, что признаки МС имели 16% обследованных [73].

1.2. Этиология и патогенез метаболического синдрома

Ожирение, видимо, является основным компонентом МС и обычно рассматривается как центральное патогенетическое звено симптомакомплекса [35]. Развитие метаболического синдрома зависит от распределения жира и его количества. Избыток жира в области живота (форма «яблока») повышает риск его развития. При этом наблюдается высокое соотношение окружности талии к окружности бедер, что свидетельствует о низком соотношении мышечной и жировой ткани. МС встречается реже среди людей, которые имеют избыточный подкожный жир вокруг бедер (форма «груша»). В этом случае отмечается уменьшение соотношения окружности талии к окружности бедер, что отражает высокое соотношение массы мышц к жировой массе [45].

Избыток жира в брюшной полости ведет к избытку свободных жирных кислот в портальной вене, увеличивающему накопление жира в печени. Жир также накапливается в мышечных клетках. Развивается резистентность к инсулину в сочетании с гиперинсулинемией. Метаболизм глюкозы ухудшается, развиваются дислипидемия и гипергликемия. Уровень мочевой кислоты в сыворотке крови, как правило, повышен, что увеличивает риск развития подагры. Развивается также протромботическое состояние с повышенным уровнем фибриногена и ингибитора активатора плазминогена I. Как следует из вышеуказанного источника МС способствует развитию хронического воспаления.

Значение ожирения в патогенезе МС, безусловно, не абсолютизируется. Так, в ряде исследований продемонстрировано, что от 10 % до 30 % лиц, страдающих ожирением, при стандартном обследовании не имеют очевидных признаков МС [50]. RE Brown и JL. Kuk [110] также нашли, что так называемое

«здоровое ожирение» представляет собой редкое явление, но все-таки встречается в диапазоне от 3 до 6 % среди пациентов, имеющих индекс массы тела (ИМТ) >30 кг/м². Очевидно, что абсолютное количество жира в организме не полностью коррелирует с риском развития нарушений обмена веществ, резистентности к инсулину и возникновению сердечно-сосудистых заболеваний [65]. Предполагается, что в основе развития «нездорового ожирения» лежит не просто избыточное накопление жировой ткани, а изменения в функционировании адипоцитов и распределении жировой ткани в организме [280]. Такой вид ожирения характеризуется уменьшением подкожно-жировой клетчатки, гипертрофией висцеральных адипоцитов, провоспалительным состоянием жировой ткани.

Нарушение липидного обмена способствует развитию ожирения и МС [122, 212]. Липидные изменения могут быть как причиной, так и следствием нарушения метаболизма глюкозы, в результате которого развивается резистентность к инсулину. Соответственно, МС и другие метаболические заболевания и состояния (гипергликемия, дислипидемия, гипертония и сахарный диабет 2 типа), характеризующиеся нарушениями в метаболизме глюкозы или липидов, тесно взаимосвязаны [252]. Однако общая точка зрения на взаимоотношения между МС и другими метаболическими заболеваниями отсутствует [78].

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 [96, 145].

Как видно, патофизиология метаболического синдрома включает в себя несколько сложных механизмов, которые еще полностью не выяснены. До сих пор ведутся споры о том, являются ли различные элементы МС отдельными нозологическими единицами или подпадают под общие, более широкие патогенетические механизмы. Помимо генетических и эпигенетических факторов [142], факторов образа жизни и окружающей среды, таких как переедание 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 [27, 28]. 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. На рисунке 1 из обзора G. Fahed и соавт. 2022 года [217], показаны установленные к настоящему времени звенья патофизиологии МС.

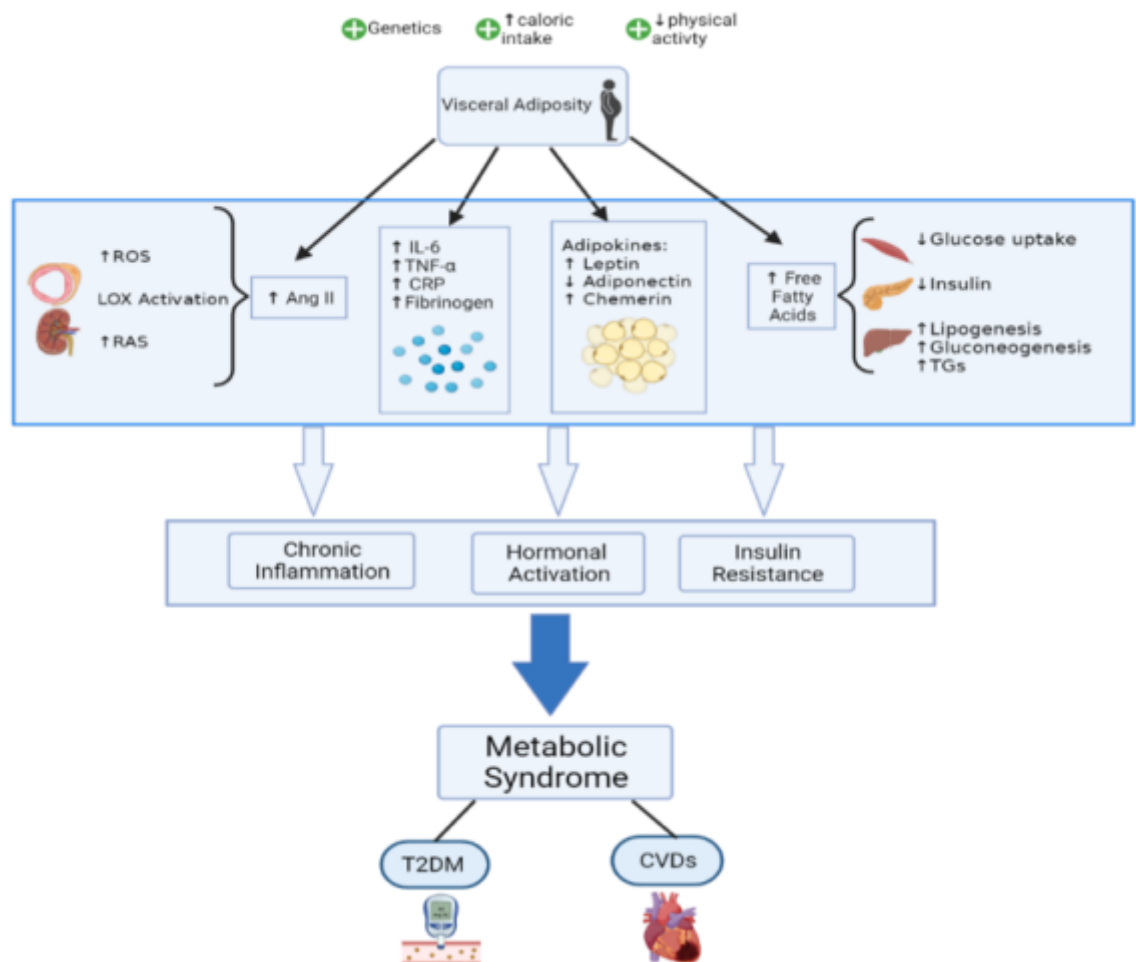


Рисунок 1. Основные патофизиологические звенья метаболического синдрома

Кроме того, относительно новые открытия показали сложное, но достоверно определенное взаимодействие между аутофагией и патофизиологическими звеньями метаболического синдрома [89, 149, 197].

Нарушения процессов аутофагии все более часто признаются частью патофизиологии метаболического синдрома. Так, ожирение, жировая болезнь печени и диабет как основные компоненты метаболического синдрома демонстрируют нарушение регуляции аутофагии в гепатоцитах [76, 80]. Вездесущий небольшой хроматин-связанный негистоновый пептид, High Mobility Group Box-1 (HMGB1), недавно привлек внимание как критический промотор процессов аутофагии при метаболическом синдроме. Уровни HMGB1 связаны с воспалением [202], резистентностью к инсулину, гипергликемией [102] и ожирением [111].

Новые исследования относительно аутофагии подтверждают ранее высказанное предположение о том, что жировая ткань действительно является активным и сложным эндокринным органом, который секретирует молекулы, играющие ключевую роль при воспалении, иммунном ответе, регуляции аппетита, сосудистых событиях, репродуктивных функциях и чувствительности к инсулину [192].

Научные данные последнего десятилетия связывают развитие метаболического синдрома также с дисбиозом кишечника: из-за повышенной проницаемости кишечника происходит транслокация липополисахарида, компонента наружной мембраны грамотрицательных бактерий, что определяет метаболическую эндотоксемию, которую можно рассматривать как причинный фактор хронического вялотекущего системного воспаления [153].

Сложная экосистема микроорганизмов (включая бактерии, вирусы, простейшие и грибы), обитающих в различных отделах человеческого организма (желудочно-кишечном тракте, коже, ротовой полости, дыхательной и мочеполовой системах), определяется как микробиота. Большая часть микробиоты находится в желудочно-кишечном тракте [245]. Микробиота содержит более чем в 100 раз больше уникальных генов, чем кодифицировано в

геноме человека [178]: она включает более 100 триллионов микробов и 5 000 различных видов, на которые приходится 5 миллионов генов.

Микробиота человека варьируется в зависимости от диеты, образа жизни и наличия или отсутствия определенных заболеваний. Действительно, было показано, что диета с высоким содержанием жиров и сахара изменяет кишечную экосистему (на уровне типов, родов и/или видов), вызывая изменения в метаболических путях и индуцируя каскадные провоспалительные сигналы [289]. Некоторые исследования показали, что дисбиоз вызывает слабовыраженное воспаление, ожирение и, следовательно, метаболический синдром [173], в то время как другие установили, что дисбактериоз является результатом слабовыраженного воспаления при ожирении и метаболическом синдроме [216]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, является ли дисбактериоз причиной или следствием метаболического синдрома. Тем не менее, модуляция дисбиоза с помощью диетических вмешательств и пробиотических добавок предоставила доказательства возможного положительного эффекта при лечении осложнений метаболического синдрома [233].

При всем этом признается, что метаболический синдром не является болезнью, а представляет собой обычное сложное явление, которое проявляется как всемирная эпидемия и представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения. Метаболический синдром значительно увеличивает заболеваемость и смертность от всех причин во всем мире [217, 294]. Большинство исследований доказали, что метаболический синдром связан с удвоением риска сердечно-сосудистых заболеваний и 5-кратным увеличением риска диабета 2 типа [175, 276, 223]. В настоящее время неясно, существует ли единый патогенетический механизм, который мог бы расшифровать патофизиологию метаболического синдрома. Весьма вероятно, что абдоминальное ожирение и резистентность к инсулину могут играть центральную роль в развитии метаболического синдрома [164, 276].

Важное значение в выяснении механизмов развития МС могут иметь его экспериментальные модели.

МС считается многофакторным заболеванием с экологическими и генетическими компонентами. Генетические модели связаны с мутацией рецептора лептина, которая вызывает гиперфагию. Это приводит к энергетическому дисбалансу, способствующему развитию ожирения, ИР, дислипидемии, непереносимости глюкозы и, в конечном итоге сахарному диабету 2 типа [46, 85].

Диетические модели МС воспроизводят нездоровые пищевые привычки и малоподвижный образ жизни человека и позволяют оценить эффект избыточного потребления макронутриентов на метаболизм и энергетический баланс [113].

Анализ результатов моделирования диетического варианта МС на грызунах, полученных в 35 исследовательских группах по всему миру, позволил E. Rodríguez-Correa, и соавт. [104] выявить основные признаки, к получению которых нужно стремиться при моделировании МС. К ним относятся увеличение массы тела, накопление висцерального жира, целевой уровень триглицеридов в сыворотке, уровень глюкозы в крови натощак, толерантность к глюкозе, развитие сахарного диабета типа 2 типа, повышение систолического АД.

Типы диет для моделирования МС можно разделить на три группы: 1) с высоким содержанием углеводов (HCH); 2) с высоким содержанием жиров (HFD); 3) с высоким содержанием углеводов и высоким содержанием жиров (HCH-HFD).

Для получения первых моделей МС были использованы диеты с высоким содержанием углеводов, основанные на использовании фруктозы (Reaven's в 1979) [114]. В дальнейшем исследователи предлагали использование вместо воды в качестве питья 5-10% растворы глюкозы [167]. Нарушение липогенеза и гликогенеза, ингибирование липолиза, гипертрофия жировой ткани позволяли получить большинство необходимых маркеров МС в срок от 4 до 16 недель [268].

Начальной работой в получении МС с высоким содержанием жиров (более 10 %, гиперкалорийный тип диеты) можно считать опубликованное сообщение Mickelsen, Takashi и Craig сообщение 1955 г [219]. Диета состояла из более чем 65% гидрогенизированного жира и применялась в течение более 40 недель. Животные перестали прибавлять в весе на 40-й неделе, а после этого срока начали

терять вес. Влияние таких диет на энергетический обмен зависит от типа жира, добавляемого в рацион (обычно диеты, содержащие сало). Наиболее типичные характеристики МС при таких диетах - накопление триглицеридов и ожирение [170].

Диету с высоким содержанием и углеводов, и жиров называют кафетерийной диетой [234]. Считается надежной моделью, обеспечивающей ожирение, дислипидемию, гиперинсулинемию, непереносимость глюкозы, гипергликемию и воспаление [185, 260].

Общим недостатком использования всех вышеуказанных 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 [259].

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 [172]. Поэтому, нам показалось целесообразным усовершенствование кафетерийной модели создания МС в эксперименте.

1.3. Вероятные пути воздействия на ведущие патогенетические факторы метаболического синдрома

Многие причины, включая возраст, наследственность и стиль жизни, потенциально влияют на риск развития метаболического синдрома [269]. Среди них диета является одной из важных причин. Многие исследования указывают на связь между особенностями питания и метаболическим синдромом [59, 140, 206].

Известно, что лечение больных с метаболическим синдромом сводится в основном к коррекции основных патогенетических звеньев: инсулинорезистентности (ИР), висцерального ожирения, нарушения углеводного и жирового обменов, артериальной гипертензии [39, 40, 53]. В последнее время появились публикации, описывающие не только особенности патофизиологии метаболического синдрома, но и попытки коррекции отдельных патофизиологических процессов при метаболическом синдроме, например, предпринимаются попытки снижения уровня окислительного стресса как одного из патогенетических звеньев данного синдрома.

Таким образом, метаболический синдром, по определению, не является заболеванием, а представляет собой совокупность отдельных метаболических факторов риска, включая абдоминальное ожирение, гипергликемию, гипертриглицеридемию, артериальную гипертензию и низкий уровень холестерина липопротеинов высокой плотности.

Рассматривая возможности коррекции основных компонентов метаболического синдрома, терапевтические вмешательства обычно делят на модификацию образа жизни, фармацевтическую терапию и бариатрическую хирургию [293].

Поскольку урбанизация, чрезмерное потребление питательных веществ, нездоровое питание и малоподвижный образ жизни являются основными причинами метаболического синдрома, то изменение образа жизни (в первую очередь переход на здоровое питание) является основным вариантом профилактики метаболического синдрома.

Для клинического ведения МС часто требуется полифармацевтическая терапия, но это может вызвать побочные эффекты и снизить комплаентность пациента к лечению. По этой причине поиск действенной и альтернативной терапевтической стратегии, естественной и свободной от побочных эффектов, может стать полезным инструментом в борьбе с метаболическим синдромом. В этом контексте использование функциональных пищевых продуктов может оказывать благотворное влияние на массу тела, кровяное давление и контроль

метаболизма глюкозы, на повреждение эндотелия, на улучшение липидного профиля, течение воспалительных процессов и состояние антиоксидантной защиты при окислительном стрессе [21, 44, 88, 105, 183].

Важно подчеркнуть, что улучшение пищевых привычек в сторону более здорового образа жизни может сыграть фундаментальную роль в профилактике и лечении метаболического синдрома. Так, средиземноморская диета, богатая полифенолами, представляет собой здоровую диету, характеризующуюся регулярным потреблением фруктов, овощей и оливкового масла в качестве основного растительного источника жиров. Многочисленные исследования фактически указывают на то, что эта диета, насыщенная всеми группами растительных полифенолов, связана со снижением риска возникновения метаболического синдрома [48, 270].

В настоящее время выделено и изучено более 5 000 фитохимических веществ, включая полифенолы, каротиноиды, алкалоиды, фитостеролы, азотсодержащие соединения и сероорганические соединения. Среди них наиболее изученными, безусловно, являются полифенольные соединения. Это продукты вторичного метаболизма растений, ответственные за типичную окраску ягод и фруктов, защиту растения от микроорганизмов и других паразитов, обычно участвующих в росте, размножении и метаболизме растения [136, 287].

Сосредоточив внимание на профилактических и терапевтических методах, основанных на использовании растительных полифенолов как природных биоактивных соединений, свободных от побочных эффектов, мы предполагаем, что есть основания надеяться на разработку эффективной стратегии для профилактики и лечения метаболического синдрома.

1.4. Полифенольные компоненты северных ягод рода *Vaccinium* как корректоры основных проявлений метаболического синдрома

Трудно оспаривать мнение о том, что достаточное потребление фруктов, ягод и овощей имеет решающее значение для поддержания общего состояния

здоровья и снижения заболеваемости у людей [27, 63, 201, 298]. На этом фоне использование некоторых ягод в виде основы для разработки лекарственных препаратов или функциональных продуктов питания в настоящее время поощряется в надежде получения терапевтических эффектов в виде уменьшения воспаления, снижения риска возникновения рака, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, нейродегенеративных процессов, т.е. в надежде получения антивозрастных (antiaging) эффектов или корректирующих эффектов при типично сопутствующей старению патологии [11, 19, 24, 30, 34, 171, 180].

Дикие ягоды всегда являлись ценным вариантом традиционной еды на Аляске, севере Европы и севере Азии. Многие из этих ягод, например, клюква обыкновенная (*Vaccinium oxococcus* L.), черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.), имеют давние традиции в российской, европейской и североамериканской народной медицине.

Предполагается, что биологически активные вещества северных диких ягод могут способствовать профилактике сосудистых заболеваний, снижать риск возникновения рака и когнитивных нарушений, что делает потребление этих ягод важным фактором здоровья населения в северных регионах [95, 179]. Особенную актуальность эта проблема приобретает в условиях Крайнего Севера в связи с негативным воздействием экстремальных условий окружающей среды [26, 56].

В свете нынешней новомодной «омолаживающей волны» в исследованиях внимание ученых к экстрактам северных ягод и их составным частям значительно усилилось. Если рассматривать вопрос освещения в доступной литературе данных по влиянию экстрактов северных ягод на процессы старения организмов и связанных со старением патологических процессов, то следует указать, что к настоящему времени имеется значительное количество работ, проведенных на модельных организмах [15, 16, 203, 228].

На модели метаболического синдрома у крыс, вызванного диетой с высокой концентрацией жиров и углеводов, зафиксировано снижение экспрессии генов TNF- α и IL-6, повышение экспрессии гена адипонектина. Но у крыс, получавших экстракт виноградных косточек, содержащий полифенолы, эти маркеры

воспаления (TNF- α и IL-6) определялись в меньшей концентрации [224]. На фруктозной модели МС у крыс линии Wistar в работе К.О. Таримова и соавт. [58] обнаружен эффект нормализации морфофункциональных показателей под влиянием полифенолов, а именно ресвератрола и концентрата стильбенов.

Опубликовано немалое количество работ [11, 28, 37, 56], в которых в клинических условиях подтверждается способность препаратов кверцетина и дегидрокверцетина, являющихся полифенолами, корректировать инсулинорезистентность у больных сахарным диабетом 2-го типа.

Установлено, что экстракты из голубики (*Vaccinium uliginosum*) влияют на процессы старения (продолжительность репликативного старения) *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila*, а экстракты из черники (*Vaccinium myrtillus* L.) или клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) тормозят снижение когнитивных функций у старых крыс и мышей [83, 107, 132, 143, 282]. Эти экспериментальные факты в отношении антивозрастных эффектов полифенольных экстрактов могут считаться обоснованными. Данное утверждение подтверждается результатами экспериментов, в которых отдельные полифенолы (например, ресвератрол), содержащиеся в плодах и водно-спиртовых экстрактах ряда ягод, включая чернику, влияют на систему генов, в частности Sirt1, а "sir-гены" переводят клетки в защитный режим, охраняющий их от развития возрастных патологий и повышающий продолжительность жизни лабораторных животных до 70 % [153, 190].

Известно, что ягоды клюквы, черники и других северных, темно-окрашенных ягод содержат антоцианы и флавоноиды, с которыми обычно связывают антиоксидантные эффекты, предположительно участвующие в антивозрастном действии [15, 86, 174, 235]. Безусловно, чрезвычайно широкий спектр полифенолов, получаемый при анализе указанных северных ягод, не позволяет пока точно определить источник антивозрастных эффектов, поэтому предполагается, что потенциально все полифенолы могут иметь геропротекторный эффект [86].

Далее мы приводим краткий обзор исследований экстрактов ягод рода *Vaccinium*, имеющих отношение к возраст-ассоциированной патологии и

коррекции проявлений МС, проведенный по базе PubMed с 2006 по апрель 2021 года с включением некоторых работ из русскоязычной базы MedLine. Поисковые термины: «Aging», «Antiaging», МС, названия ягод, входящих в семейство Ericaceae, подсемейство Vaccinoideae: *Vaccinium myrtillus* L. – Bilberry – Черника; *Vaccinium oxycoccos* L. – Small cranberry – Клюква обыкновенная; *Vaccinium uliginosum* L. – Bog whortleberry – Голубика; *Vaccinium vitis-idaea* L. – Lingonberry – Брусника.

Клюква (лат. *Oxycoccus*, подрод рода *Vaccinium* – *Vaccinium subgen*). Плоды клюквы, а также различные экстракты из ее плодов, видимо, являются наиболее распространенными компонентами различных пищевых продуктов. При этом существует общее убеждение, что потребление пищевых продуктов, содержащих клюкву или ее компоненты, полезно для здоровья человека [227]. Если оценивать число публикаций, то следует указать, что наиболее часто в качестве объекта исследования используется вид северо-американской клюквы (*Vaccinium macrocarpon*), реже изучается клюквы (*Vaccinium microcarpon*), произрастающей в Европе и Азии.

В ягодах обоих подвидов полифенольные компоненты сходны и разграничить полифенольный состав американской и европейской клюквы пока не представляется возможным [177]. Результаты хроматографических анализов антоцианов северо-американской и европейской клюквы также принципиально не различимы, хотя можно установить некоторое различие в содержании полимерных фенольных соединений, в частности – процианидиновых димеров [102].

Поскольку именно североамериканский вид клюквы (*Vaccinium macrocarpon*) используется более интенсивно в пищевой промышленности при приготовлении на ее основе так называемых продуктов «полезного питания», то и сопутствующие экспериментальные исследования также сосредоточены на этом виде растения [233].

Наиболее часто для экстрактов плодов клюквы описывается антирадикальное действие или антиоксидантный эффект в условиях *in vitro*. При

этом, как источники этих эффектов указываются флавоноиды или их фракции в виде олигомерных, а также полимерных форм проантоцианидинов [187].

С наличием высокой концентрации полифенолов в экстрактах из плодов клюквы связывают торможение роста холестерина и его фракций при кормлении экспериментальных животных атерогенным кормом. При этом в качестве механизма указанного эффекта рассматривают повышение устойчивости липопротеинов к окислению, происходящее в присутствии полифенолов, ингибирование агрегации тромбоцитов, вызываемое полифенолами, а также торможение экспрессии провоспалительных генов при хроническом воспалении [207].

Относительно возможного влияния на иммунитет установлено, что проантоцианидины, выделенные из экстракта клюквы, поддерживают системы врожденного иммунитета у *Caenorhabditis elegans* и обеспечивают удлинение репликативного возраста [128, 271]. Когда рассматривается возможный механизм продления жизни *Caenorhabditis elegans*, то считается, что проантоцианидины клюквы действуют через инсулиноподобную сигнальную систему [275]. Кроме удлинения жизни *Caenorhabditis elegans* найдено сходное явление при использовании экстракта клюквы и в отношении жизни плодовых мушек [128]. Найдено, что при кормлении мушек экстрактами плодов клюквы увеличивается их двигательная активность, повышается репродуктивная функция. Для млекопитающих данных по изменению продолжительности жизни при применении экстракта клюквы пока нет, но продемонстрирована способность задерживать возрастное снижение функциональных способностей панкреатических бета-клеток крыс при длительном кормлении их экстрактами клюквы [155].

Показателен результат исследования влияния экстракта североамериканской клюквы на мышей с метаболическим синдромом при их ежедневном кормлении (в течение 8 недель): зафиксировано достоверное снижение массы тела и выявлена тенденция к уменьшению инсулинорезистентности, определено пребиотическое действие экстракта на кишечный микробиом мышей [79, 286]. Пребиотическое действие в отношении

микробиома кишечника мышей с моделью метаболического синдрома было описано и для полифенольного экстракта ягод винограда. Экстракт корректировал содержание в кишечнике бактерий *Akkermansia* [139]. Эти данные в совокупности позволили связать использование полифенолов и пребиотический эффект [273]. Интересно, что использование собственно пробиотика с высоким содержанием бактерий *Akkermansia* приводило к уменьшению выраженности симптомов метаболического синдрома у мышей [286].

Установлен корректирующий эффект клюквенного сока при приеме 240 мл в течение 8 недель ежедневно в условиях клинического исследования (РКИ), проведенного на 56 пациентах с МС (30 женщин и 26 мужчин) [130]. В условиях этого клинического исследования, несмотря на малочисленность исследуемой группы и группы плацебо, авторам работы удалось обнаружить достоверные изменения: уровень триглицеридов в сыворотке был ниже ($1,15 \pm 0,04$ ммоль/л по сравнению с $1,25 \pm 0,04$ ммоль/л; $P = 0,027$), С-реактивный белок сыворотки был ниже ($0,522 \pm 0,115$ мг/л по сравнению с $0,997 \pm 0,120$ мг/л, $P = 0,0054$). Было доказано, что клюквенный сок способствует снижению артериального давления, преимущественно диастолического артериального давления. Уровень глюкозы в плазме натощак был ниже ($P = 0,03$) в группе, где участники исследования получали сок ($5,32 \pm 0,03$ ммоль/л против $5,42 \pm 0,03$ ммоль/л).

Клиническое исследование с еще меньшим числом участников и без контрольной группы (15 женщин с МС) [202], участники которого принимали вдвое большее количество клюквенного сока ежедневно в течение 8 недель, имело своим результатом улучшение параметров липидного обмена в совокупности с повышением уровня ферментов антиоксидативной системы крови.

Сходные данные получил и I.T. Lee [148] в РКИ (30 больных с СД 2 типа и ожирением, в возрасте более 65 лет): клюквенный сок, назначенный по 1 стакану (200-250 мл) в день в исследуемой группе вызывал некоторое снижение уровня холестерина ЛПНП и общего холестерина. При этом не выявлено влияния на уровень глюкозы крови и общую массу тела.

T.N. Simão и соавт. [256] в условиях клинического исследования была проведена оценка возможного влияния потребления клюквенного сока на показатели липидного обмена и некоторые биомаркеры у пациентов с МС (20 пациентов с верифицированным МС получали клюквенный сок в большом количестве 700 мл в день, 36 – плацебо). В этих условиях на фоне потребления клюквенного сока определено достоверное увеличение концентрации адипонектина и снижение уровня гомоцистеина. Однако другие маркеры, например, провоспалительные цитокины ФНО-а, ИЛ-1, ИЛ-6 не менялись существенно. При этом уровень продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови у тех, кто принимал клюквенный сок, был ниже, чем в группе плацебо ($p < 0,05$).

Связь между изменением антиоксидантной активности и развитием болезни Альцгеймера предполагается несколькими авторами, но доказательства получены пока только в эксперименте. Так, установлена способность концентрированного экстракта клюквенного сока ингибировать уровень биомаркеров, типичных для модели нейродегенеративной патологии на *Caenorhabditis elegans* [128, 154, 275].

Практически во всех работах, проведенных с экстрактами ягод рода *Vaccinium*, фиксируется относительно высокий уровень концентрации антиоксидантов [171]. Эксперименты с экстрактами плодов клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) практически всегда свидетельствуют об относительно высоком уровне антиоксидантной активности в условиях *in vitro* [108, 251, 271]. Это обстоятельство позволяет рассматривать эффекты экстрактов плодов клюквы с позиций оксидативной теории старения и предполагать, что антиоксидантные эффекты могут быть связаны с торможением процессов клеточного старения, как это определено в экспериментах на дрозофилах и *Caenorhabditis elegans* [107].

Противомикробные эффекты экстрактов ягод описаны достаточно подробно в экспериментах и клинике. В условиях *in vitro* установлен бактерицидный эффект экстракта клюквы (а также экстракта брусники) в отношении грамположительного *S. aureus* [124, 175, 199]. При этом экстракт клюквы проявляет противомикробный эффект ограниченного спектра в основном в

отношении грамположительных возбудителей инфекции мочевыводящих путей [187]. В комплементарной медицине при циститах принято использовать либо свежие ягоды клюквы, либо замороженные, либо водно-спиртовые экстракты клюквы [168].

Кохрановский систематический обзор, как высший уровень доказательной медицины, констатирует наличие антимикробного терапевтического эффекта экстракта плодов клюквы у пациентов с инфекцией мочевыводящих путей типа циститов [189]. Особенно выраженный клинический эффект при использовании экстрактов клюквы найден у женщин с рецидивирующей формой цистита (снижение времени потребности в антибиотиках на фоне применения препарата клюквы). С.Н. Wang и соавт. [126] также находят, что экстракты клюквы при длительном приеме на фоне комплексной терапии циститов могут потенцировать действие антибиотиков.

Для экстракта плодов клюквы, как и экстрактов ряда ягод, содержащих антоцианы (определяющие темный цвет окраски плодов) в условиях *in vitro* на нескольких перевиваемых культурах опухолей (клетки MCF-7, HT-29, HCT116, NCaP) описан дозозависимый цитостатический эффект.

Для экстракта клюквы определен некоторый проапоптотический эффект на культурах клеток рака толстой кишки HT-29 [106].

Отдельное место занимают результаты исследования влияния северных ягод, включая клюкву, на состав микробиоты кишечника и проницаемость слизистой оболочки кишечника [262]. Факты коррекции микробиома при потреблении экстрактов северных темно-окрашенных ягод, в том числе и клюквы, позволяют предполагать вероятность использования функциональных продуктов на основе ягод клюквы или ее экстрактов для уменьшения риска метаболических нарушений, связанных с функцией микробиома [152, 265].

Ягоды клюквы считаются важными источниками полифенольных соединений, корректирующих через антиоксидативное воздействие состояния, сопровождающиеся оксидативным стрессом [98, 245]. Хотя большинство полифенолов обладают низкой биодоступностью в кишечнике [103, 241, 253], но

взаимодействие с микробиотой кишечника обеспечивает корректирующий метаболический эффект при многих состояниях, включая возраст-ассоциированные [79, 240].

Брусника (лат *Vaccinium vitis-idaea*). Судя по результатам фитохимических работ, полифенольный состав сходен с таковым, описанным для ягод клюквы, однако содержание флавоноидов определяется в более низких концентрациях, чем в ягодах клюквы [119]. Высокий уровень антиоксидантной активности обнаружен в экстракте дикорастущей канадской брусники. Именно с антиоксидантным эффектом связывают и цитопротекторное действие в эксперименте с изолированными фибробластами, а также торможение апоптоза в этих же условиях [99]. Подтверждение антиапоптозного действия цельного экстракта брусники и отдельных его фракций (флавоноиды и антоцианы) получено на клетках H9c2 на модели реперфузионного повреждения клеточной культуры. Установлено, что происходит активация каспазы-3 и интенсифицируется передача сигналов в системе MAP-киназы [205]. В культуре клеток пигментного эпителия сетчатки человека добавление экстракта брусники в среду инкубации приводит к повышению уровня антиоксидантов и ликвидации, имевшегося оксидативного стресса. Авторы связывают этот эффект со стимуляцией уровня антиоксидантной защиты, проявляющейся повышением активности гемоксигеназы (HO-1) и глутатион-S-трансферазы [101].

Пролонгированное применение в корме мышей экстракта брусники в диапазоне доз от 50 до 200 мг/кг при моделировании хронического стресса имело своим результатом улучшение познавательных рефлексов и кратковременной памяти. Когнитивные эффекты сопровождалась ростом активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы GSH-Px в тканях головного мозга параллельно снижению активности малонового диальдегида (MDA). На основании данных этого эксперимента предполагают, что спровоцированное приемом экстракта брусники повышение антиоксидантного потенциала позволяет ликвидировать оксидативный стресс и нормализовать нейромедиаторы [154].

В тесте на мутагенность (Comet assay) на изолированном фрагменте толстой кишки крысы установлено, что экстракт ягод брусники проявляет антигенотоксическую и антимуtagenную активность, а также снижает инвазивную способность тестовых бактерий [121].

При моделировании ультрафиолетового повреждения фоторецепторов сетчатки глаза экспериментальных животных в отношении экстракта плодов брусники обнаружено, что профилактическое введение экстракта оказывает защитное действие, снижая уровень повреждения сетчатки [281].

Противомикробное действие свежих ягод, экстракта ягод и концентрата ягод брусники при мочевых инфекциях установлено в ряде клинических исследований, суммированных в систематическом обзоре [250].

Экстракт плодов брусники в экспериментальных условиях тестировался на моделях сахарного диабета и/или метаболического синдрома. Получены разнонаправленные изменения биомаркеров под влиянием экстракта брусники, но установленная тенденция снижения уровня глюкозы в крови, а также достоверное уменьшение уровня триглицеридов и уменьшение морфологических признаков стеатоза печени дало основание авторам обзора [199] рекомендовать проведение клинической апробации экстракта брусники на широком спектре возраст-ассоциированной патологии.

Черника (*Vaccinium myrtillus* L.) также представляет собой темно-окрашенную северную ягоду, представленную и в дикорастущем виде и в виде культивируемого растения со съедобными плодами. Плоды черники более часто, чем плоды других северных ягод, служат объектами экспериментального и клинического изучения. Для экстракта североамериканской черники и европейского подвида (альпийской) черники полифенольный состав описан довольно подробно, обозначены основные фракции, включая мономерные антоцианы, фенольные кислоты, кумарины, флавонолы, дигидрохалконы и флавоноиды [108, 240]. Как и для других темно-окрашенных ягод (клюквы и брусники), для экстракта черники зафиксирован антиоксидантный эффект [163]. Следует заметить, что многие исследователи выделяют экстракт черники из ряда

экстрактов северных ягод по выраженности биологических свойств. При сравнении экстрактов различных видов *Vaccinium* (*Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium corymbosum* и *Vaccinium oxycoccus*) наиболее сильное ингибирование окисления наблюдалось *in vitro* в клеточной культуре с экстрактом *V. myrtillus*: 50 % ингибирования при 7 мкМ содержания антоцианов. Эта активность была в 1,5–4 раза выше, чем у экстрактов других ягод. Эти результаты, по мнению авторов, свидетельствуют о высоком потенциале экстракта черники в отношении нейро- и митохондриозащитных эффектов [297].

Большое количество исследований экстракта плодов черники проведено в офтальмологии. Так, установлено, что экстракт черники обладает выраженным протективным эффектом на моделях ультрафиолетового повреждения клеток сетчатки глаза [281]. Многочисленные авторы на априорной основе предлагают использовать экстракт плодов черники для дополнения терапевтических комплексов при широком спектре офтальмологических заболеваний. При этом такая рекомендация обосновывается имеющимся предположением о вероятной стимуляции синтеза родопсина и стимуляции регенерации ткани сетчатки при использовании биологически активных пищевых добавок с полифенолами черники [292, 296]. В эксперименте на морских свинках найдено, что длительное (8 недель) кормление экстрактом черники позволяет уменьшить степень миопии и нарушение рефракции [147]. Указанные доклинические исследования дают основания для проведения клинических исследований при миопии, но результаты рандомизированных клинических исследований по этому поводу пока не встречаются в доступной литературе.

На модели токсического гепатита, вызванного четыреххлористым углеродом, и модели местного воспаления мягких тканей, вызванного механическим повреждением, у мышей оценивалась возможность проявления противовоспалительного действия экстракта черники. Как доказательство вероятности противовоспалительного эффекта определено снижение уровня биомаркеров воспаления (а именно, TNF-альфа и NF-kB) и маркеров цитолиза (АСТ, АЛТ) [89].

Антитоксический эффект экстракта черники описывается на модели цисплатинового повреждения яичников у крыс: пероральное введение экстракта черники на протяжении месяца предупреждало токсическое влияние цисплатины на яичники экспериментальных животных, что связывают с антиоксидантным эффектом экстракта черники [232].

Для экстракта черники установлена возможность гипогликемического действия на модели стрептозотоцинового сахарного диабета. При этом статистически значимо эффект экстракта черники не отличался от эффекта стандартного гипогликемического препарата акарбозы. [195].

В исследованиях *in vitro* [150] в простых тест-системах с бесклеточной средой определен α -глюкозидазный и амилоглюкозидазный эффект экстракта ягод черники, сопоставимый с эффектом стандартных сахаропонижающих препаратов. Полученный эффект позволяет предполагать, что механизм гипогликемического эффекта экстракта черники может быть аналогичен механизму противодиабетических эффектов стандартного сахаропонижающего препарата акарбозы.

Исследование влияния экстракта плодов черники на поведенческие реакции мышей с моделью метаболического синдрома в условиях стресса [289] доказывает наличие гипогликемического, гиполипидемического, антидепрессивного эффектов на фоне выраженного антиоксидантного действия.

Применение БАД на основе черники у пациентов с метаболическим синдромом позволяет снизить уровень гипергликемии и уменьшить степень инсулинорезистентности [160].

Для экстракта черники определена возможность противомикробного действия, бактериостатические свойства выявлены *in vitro* в отношении тестовых коллекционных как грамположительных, так и грамотрицательных штаммов *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) и *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) [120]. Экстракт плодов черники в условиях *in vitro* в клеточной культуре проявляет также эффект подавления репликации вируса гриппа А / H3N2 и вируса CV-B1 [183].

На основании наличия у экстракта выраженного антиоксидантного потенциала высказывается мысль о возможной пользе его применения при сердечно-сосудистых заболеваниях, возраст-ассоциированной патологии, сопровождающейся оксидативным стрессом, хронических воспалительных реакциях [174]. Однако экспериментальная и клиническая доказательные базы в этом отношении пока неполные. В экспериментах на модели болезни Альцгеймера у мышей при применении экстракта черники показана возможность предотвращения дегенерации. При этом содержание β -амилоида в мозге достоверно не менялось, но было зафиксировано повышение концентрации нерастворимых фракций β -амилоида. Этот факт дал исследователям возможность предположить, что полифенолы, в частности стильбены, содержащиеся в экстракте черники, способны нейтрализовать токсичность β -амилоида, стимулировать его агрегацию [297].

А. Virel и соавт. [204] удалось при магнитно-резонансной визуализации нейровоспаления на модели болезни Паркинсона у крыс обнаружить приток фагоцитов в ткани головного мозга при использовании диеты, обогащенной черникой. При пероральном введении экстракта плодов черники на протяжении 16 недель в дозе 10 мг/кг зафиксировано противовоспалительное действие.

В исследовании Nora Pap и соавт. [98] обнаружен гипотензивный эффект экстракта плодов черники у крыс при его введении внутрь. Установлено, что на модели гипертонии, вызванной избытком натрия хлорида, введение сублимированного экстракта черники на протяжении 4 недель позволяет снизить систолическое артериальное давление.

Относительно экстракта черники в литературе описаны и некоторые результаты клинических исследований при стеатозе печени (жировой гепатоз, жировая инфильтрация печени). В двойном слепом рандомизированном клиническом исследовании на 74 пациентах с НЖБП очищенные антоцианы (320 мг/сут), полученные из черники и использованные в течение 12 недель, вызывали значительное снижение ($p < 0,05$) в плазме аланинаминотрансферазы ($-19,1\%$

против 3,1 %), цитокератина 18 M30 фрагмента (–8,8 % против 5,6 %) и миелопероксидазы (–75,0 % против – 44,8 %) [144].

Довольно часто описывают эффекты не только отдельных ягод, но и их всевозможных смесей. В качестве примера можно привести работу G.C. Vidana Gamage и соавт. [169], в которой сопоставили шесть ягодных экстрактов (дикой черники, брусники, клюквы, бузины, малины и клубники) по антиоксидантной активности, цитотоксическому потенциалу, показателю аутофагии и антиангиогенной активности (способности уменьшать нежелательный рост кровеносных сосудов в опухоли). А затем разработали синергетическую формулу смеси экстрактов OptiBerry H141, на которой экспонировались высокое значение антиоксидантной активности, низкая цитотоксичность, а также превосходные антиангиогенные свойства. Антиангиогенные подходы для лечения рака представляют приоритетное направление в сосудистой биологии опухоли. Показано, что OptiBerry значительно ингибирует экспрессию VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), который является ключевым регулятором ангиогенеза опухоли. Клетки эндотелиомы, предварительно обработанные OptiBerry, показали сниженную способность к образованию гемангиом и заметно пониженный рост опухоли – более чем на 50 %. По существу, эти исследования подчеркивают новый антиангиогенный, антиоксидантный и антиканцерогенный потенциал новой формулы экстракта ягод, богатых антоцианами.

Таким образом, анализ доступной литературы позволяет считать северные темноокрашенные ягоды рода *Vaccinium* (клюква, брусника, черника) потенциальным источником природных антиоксидантов. Имеющиеся к настоящему времени результаты исследований позволяют предполагать, что полифенольные компоненты северных ягод могут проявлять выраженную биологическую активность при патологии, сопровождающейся оксидативным стрессом и/или хроническим воспалением. Сочетание антиоксидантного эффекта и противовоспалительного действия может реализовываться в позитивном влиянии на широкий спектр патологии – от сердечно-сосудистой до онкологической [97]. При этом можно констатировать, что хотя антиоксидантным

свойствам полифенолов северных ягод по-прежнему придается первостепенное значение, но появляется все больше исследований, затрагивающих проблему взаимодействия полифенолов ягод и микробиома кишечника [79, 139]. Результаты работ по исследованию взаимодействия полифенолов и микробиоты могут существенно дополнить современные представления о механизме действия полифенолов северных ягод [138].

Согласно мнению Европейского органа по безопасности пищевых продуктов (EFSA), северные лесные ягоды, в частности клюква, брусника, черника, должны быть естественной частью здорового питания в странах Северной Европы и Северной Америки [135]. В крупном рандомизированном исследовании северных стран (Sysdiet) изучали диету жителей Севера, куда входили цельнозерновые виды хлеба, северные ягоды, три рыбных блюда в неделю, а также молочные продукты с низким содержанием жира [153]. Здоровая диета Nordic с экстрактами северных ягод, жирной рыбой и продуктами из цельного зерна уменьшает эндотелиальную дисфункцию, липидный профиль у лиц, страдающих ожирением, и снижает риск развития сахарного диабета у тех, кто страдает от метаболического синдрома [77, 96, 100, 296].

Благотворное влияние потребления антоцианов ягод рода *Vaccinium* на сердечно-сосудистый риск поддерживают и эпидемиологические данные. Для изучения влияния экстрактов клюквы, брусники, черники, богатых антоцианами, на липиды сыворотки крови был проведен метаанализ соответствующих рандомизированных контролируемых исследований. Шестнадцать исследований с участием 1 109 пациентов были включены в этот метаанализ [156]. Конечно, материал имел значительную гетерогенность, но среди экстрактов ягод по эффективности выделяется экстракт черники. В этой группе результаты значительно превосходили плацебо по параметру улучшения липидного профиля – снижению холестерина ЛПНП и увеличению ЛПВП – по сравнению с другими вариантами.

В целом, результаты анализа литературных данных при проведении систематического обзора позволяют с определенной долей уверенности

предполагать наличие некоторого потенциала биологической активности полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium*.

При этом следует обратить внимание на немногочисленность публикаций отечественных исследователей, а, следовательно, на меньшую степень изученности биологической активности российских ягод рода *Vaccinium*.

Только в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре, встречается 14 видов ягодных растений, большинство которых имеют пищевое значение [9, 32, 42, 75]. Если принять во внимание то обстоятельство, что фитохимический состав и свойства дикорастущих ягод существенно зависят от почвенно-климатических условий их произрастания, длительности вегетационного периода, фазы развития плодов, то станет понятна необходимость получения достоверных характеристик и данных относительно именно региональных видов ягод [7, 14, 24, 52, 61, 66].

При проведении литературного обзора нам не удалось найти описание полифенольного компонентного состава отечественных северных ягод. Но имеющиеся единичные публикации позволяют выявить некоторые специфические особенности фитохимического состава плодов ягодных культур. Так, оказалось, что экстракты брусники и клюквы из Сургутского района Ханты-Мансийского автономного округа – Югры содержат фенольных кислот, а также алкилфенолов больше, чем описано в литературе для экстрактов северо-американских и северо-европейских подвидов этих ягод [32].

Таким образом, результаты исследований, описанные в литературе, в целом доказывают наличие биологической активности полифенолов из экстрактов плодов клюквы, брусники и черники, а также позволяют предположить вероятность использования указанных экстрактов для коррекции патофизиологических процессов при метаболическом синдроме. При этом большинство работ выполнено на основе исследования экстрактов северо-американских ягод. Значительно меньше данных мы имеем о свойствах ягод Сибири и практически неизвестен эффект экстрактов отечественных ягод в отношении метаболического синдрома. На этом фоне исследования, более

конкретизированные в отношении северных ягод рода *Vaccinium*, могут иметь научную и прикладную значимость.

Очевидная малочисленность сведений о компонентном составе дикорастущих северных ягод России в целом и Северо-Западной Сибири, в частности, недостаточность сведений относительно вероятных эффектов полифенольных экстрактов этих ягод на основные патофизиологические звенья метаболического синдрома, не позволяют оценить потенциальную значимость экстрактов северных ягод в коррекции метаболического синдрома.

Логично полагать, что при наличии охарактеризованных *in vitro* и *in vivo* с позиций экспериментальной патофизиологии полифенольных экстрактов северных ягод и при наличии стандартной экспериментальной модели МС, адекватной цели доклинических исследований новых лекарственных средств, можно рассчитывать на достижение цели настоящей работы по экспериментальному обоснованию целесообразности применения полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium* для коррекции проявлений метаболического синдрома.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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).

2.1. Экспериментальные животные

Опыты проведены на 159 половозрелых крысах-самках Wistar массой 180–230 г (возраст 6–8 мес.), а также на 5 кроликах шиншилла массой тела 3,0–3,2 кг, полученных из питомника и содержавшихся в стандартных условиях вивария. Животные до начала эксперимента содержались в течение не менее 14 дней в карантинных условиях. При проведении сравнительных экспериментальных исследований животных распределяли в исследуемые и контрольные группы рандомно.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными ГОСТ Р 53434-2009, по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). В соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77, для кормления крыс использовали комбикорм «Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, соответствующий ГОСТ Р 50258-92. Питьевая вода также соответствовала ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая». Питевой режим у экспериментальных животных до экспериментов был в режиме *ad libitum*. Стандартный световой режим: 12 часов света / 12 часов темноты. Температура воздуха, относительная влажность, режим проветривания, регистрировались ежедневно, согласно правилам вивария.

Исследования проводили согласно национальным общим этическим принципам экспериментов на позвоночных животных (Directive 2001/83/EC, Regulation (EC) No 178/2002 and Regulation (EC) No 1223/2009 (COM (2012) 0542 – C7-0318/2012 – 2012/0266(COD)) [125]. При проведении эвтаназии и проведении экспериментов по определению выживаемости животных учитывали надлежащие принципы обращения с экспериментальными животными, используемыми для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) от 18.03.1986.

На выполнение данной работы было получено разрешение локального комитета Сургутского государственного университета по этике «О соблюдении требований международных и российских законодательных актов об юридических и этических принципах проведения научных работ с участием человека и экспериментальных животных» (№ 17 от 15 января 2015 г.).

2.2. Реактивы

Соединения процианидина A2 (PAC-A2), процианидина B2 (PAC-B2), катехина и эпикатехина, 4-диметиламиноциннамальдегид (DMAC), реактив Folin-Ciocalteu, 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH), 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновой кислоты (тролокс), 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) соль диаммония (ABTS), 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (AAPH), фосфатный буфер, 2,4,6-три(2-пиридил)-с-триазин (TPTZ), гексагидрат хлорида железа (III) и флуоресцеин натриевая соль (FL), органические растворители ВЭЖХ класса были приобретены у Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, USA).

2.3. Получение полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium*

Ягоды клюквы, черники, брусники были собраны в летне-осенний период 2015–2019 годов в Сургутском районе Ханты-Мансийского автономного округа – Югры Тюменской области Российской Федерации. Начальная стадия обработки включала гомогенизацию ягод – 1 кг в 1 л воды при температуре 25 °C – и

фильтрацию через сита. Субстанцию экстрагировали с использованием этанола (0,4 л) при температуре 25 °С. Этаноловый экстракт пропускали через фильтровальную бумагу и концентрировали при 35 °С с использованием роторного испарителя, суспендировали в воде (30 мл), а затем суспендировали с н-гексаном (3 × 30 мл), чтобы удалить каротиноиды, жиры и воски, в последующем дополнительно разводили в 90 мл спирта для селективного извлечения флавонолов, антоцианов и проантоцианидинов. Далее экстракт концентрировали выпариванием в вакууме в роторном испарителе в течение 60 мин. Стандартизацию проводили по общему фенольному числу – 10 мг/мл.

2.4. Определение компонентного состава фенольных соединений экстрактов ягод рода *Vaccinium*

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 по методу Singleton [263]. Принцип этого метода основан на способности полифенолов в составе экстрактов вступать в реакцию с реагентом Фолина-Чокальтеу (Folin-Ciocalteu) в щелочной среде. В результате считали, что усиление окраски происходит пропорционально увеличению концентрации полифенолов. Концентрации полифенолов были выражены в мг/л эквивалента галловой кислоты (gallic acid) на основе стандартной кривой, созданной по галловой кислоте. Общее количество мономерных антоцианов (anthocyanin, ANC) измеряли с помощью спектрофотометрического метода [198] на спектрофотометре Evolution 201 (Thermo Scientific), концентрации рассчитывали в мг/л эквивалента цианидин 3-О-глюкозида (cyanidin 3-O-glucoside). Общие проантоцианидины (ПАЦ) определяли колориметрическим методом с использованием ДМАС в 96-луночных планшетах [224]. Серия разведений стандартного димера процианидина А-2 была подготовлена в 80 %-ном этаноле в диапазоне от 1 до 100 мкг/мл. Все пробы

анализированы в трех экземплярах. Протокол ридера был установлен так, чтобы считать оптическую плотность (640 нм) в каждой лунке планшета каждую минуту в течение 30 мин. (SpectraMax® M3, Sunnyvale, CA, USA).

Характеристика полифенольных экстрактов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика полифенольных экстрактов клюквы, брусники, черники

Внешний вид	Густая, подвижная жидкость
Цвет	Темно-бордовый с коричневым оттенком
Запах	Свойственный используемому сырью
Вкус	Терпкий, слегка горьковатый, с кислоткой
Растворимость 1 объема концентрата в 1 объеме 96 %-ного этилового спирта и воды	Хорошо растворяется в 96 %-ном этиловом спирте и воде
Наличие осадка	Небольшой аморфный осадок
Показатель pH	3,5–4,0
Содержание сухих веществ, %	16–18
Посторонние примеси	Не допускаются
Плотность	1,35–1,36
Содержание фенольных веществ, мг/л	4000–18 000

2.5. Хроматографический анализ (LC-MS Analysis)

Экстракты разводили раствором вода/этанол (1:1). Экстракты клюквы и брусники разводили в пять раз, экстракт черники – в шесть раз при анализе неокрашенных фенольных соединений и в шестьдесят – при анализе антоцианов. Затем растворы фильтровали через нейлоновые фильтры 0,2 мкм (Uniprep, Whatman).

Анализ содержания фенольных соединений проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1290 Infinity. Разделение в градиентном режиме осуществлялось на колонке ZORBAX RRHD SB-C18 2.1 × 100 мм, 1,8 мкм. Подвижная фаза состояла

из двух компонентов: 0,1 %-ного водного раствора муравьиной кислоты (компонент А) и ацетонитрила, содержащего муравьиную кислоту в концентрации 0,1 % (компонент В). Градиент осуществлялся в следующей последовательности. Исходный элюент состоял из компонента А. В течение пяти минут концентрация компонента В повышалась до 10 % и сохранялась следующие пять минут. С десятой по двадцать пятую минуту концентрация компонента В повышалась до 35 %. Затем колонка очищалась и кондиционировалась. Скорость потока равнялась 0,3 мл/мин при 30 °С. Для анализа использовали 3 мкл пробы. Регистрация осуществлялась диодно-матричным детектором при 280 нм и 325 нм. Спектр поглощения фиксировался в диапазоне 210–600 нм с шагом 2 нм. При разделении антоцианов в качестве компонента А в элюенте использовался пятипроцентный водный раствор муравьиной кислоты, и регистрация проводилась при 520 нм.

Время, мин	%	Компонент В
0		0
5		10
10		10
25		20
35		35
36	100	Очистка колонки
40		100
41	0	Уравновешивание
45		50

В качестве внешних стандартов использовались: галловая кислота, стандарт; (+)-катехин, аналитический стандарт; хлорогеновая кислота, первичный референсный стандарт; кофейная кислота, $\geq 99,0$ сертифицированный референсный материал; (–) -эпигаллокатехин, аналитический % (HPLC); (–)-эпикатехин, аналитический стандарт; эпигаллокатехин галлат, первичный референсный стандарт; эпикатехин галлат, первичный референсный стандарт; транс-п-кумаровая кислота, аналитический стандарт; транс-феруловая кислота, сертифицированный референсный материал; м-кумаровая кислота (99 %); о-

кумаровая кислота (97 %); катехин галлат, аналитический стандарт; кверцитрин, первичный референсный стандарт; мирицетин, аналитический стандарт; ресвератрол, аналитический стандарт; пицеид, ≥ 95 % (HPLC); морин гидрат; кверцетина дигидрат, первичный референсный стандарт; ($\pm$)-нарингенин, аналитический стандарт; апигенин, аналитический стандарт; апигенин-7-глюкозид, аналитический стандарт; кемпферол, аналитический стандарт; кемпферол-3-глюкозид, аналитический стандарт. Все стандарты – производства Sigma-Aldrich.

Мирицетин, ресвератрол, кверцетин, апигенин и кемпферол растворяли в 96 %-ном этаноле, остальные стандарты растворяли в смеси этанол/вода 50/50 до концентраций, необходимых для построения калибровочных кривых.

Идентификацию фенольных соединений проводили в соответствии с временами удерживания и спектрами поглощения соответствующих аналитических стандартов [119, 196, 301].

Количественная характеристика содержания индивидуальных веществ проводилась с использованием калибровок по соответствующим стандартным образцам. Концентрации антоцианов даны в единицах глюкозидов соответствующих антоцианидинов. Концентрации цианидин-гликозидов рассчитывались как мальвидин-3-глюкозид. Концентрации процианидинов даны в единицах концентрации катехина. Гликозиды кверцетина определяли как кверцетин-3-глюкозид. Концентрации кумаровохиновой кислоты и мирицетин-3-галактозида рассчитывали как п-кумаровую кислоту и мирицетин соответственно.

2.6. Определение свободных радикалов: DPPH-тест и ABTS-тест

Концентрация радикалов была измерена с помощью стабильного DPPH и тролокса в качестве эталонного вещества [236]. Образцы разбавляли в 10 раз 80 %-ным метанолом перед смешиванием с реагентом. Аликвоту (100 мкл) из каждой пробы отбирали пипеткой и вносили в 3,9 мл раствора DPPH (0,08 М в 95 %-ном этаноле) для инициации реакции. Время реакции – 3 часа при комнатной температуре. Снижение абсорбции свободных радикалов DPPH было

просчитано при 515 нм против этилового спирта (спектрофотометр Evolution 201 Thermo Scientific). Тролокс (0, 100, 200, 300, 400, и 500 мкм) был использован в качестве стандартного антиоксиданта. Анализ проводился в трех повторах для каждого образца и каждой концентрации стандарта. Антиоксидантная активность была зафиксирована в микромолях тролокс-эквивалента на мл (мкмоль ТЭ/мл).

ABTS-тест проводили, как описано по R. Re и соавт. [90]. Тест базируется на сокращении количества радикалов ABTS⁺ при наличии антиоксидантов в ягодных экстрактах. ABTS катион-радикал (ABTS⁺•) получали посредством реакции раствора ABTS (7 мм) с 2,45 мМ персульфата калия (конечная концентрация) и выдерживанием смеси в темноте при комнатной температуре в течение 12–16 ч. перед использованием. Для анализа ABTS⁺ раствор разводили в деионизированной воде и измеряли абсорбцию 0,7 ($\pm$ 0,02) при 734 нм. После добавления 100 мкл экстракта ягод к 3 мл ABTS⁺• абсорбцию измеряли через 10 мин. инкубации при 30°C. Все определения проводили в трех повторах. Антиоксидантная активность была зафиксирована в мкмоль ТЭ/мл.

2.7. МТТ-тест

Для МТТ-теста использовали два варианта клеток – клетки первичной культуры альвеолярных макрофагов кролика и клетки перевиваемой культуры НЕК293.

Для получения альвеолярных макрофагов использовали здоровых кроликов породы шиншилла массой 3,0–3,2 кг (5 самцов). Кролики находились в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде и пище. Кролика наркотизировали с помощью тиопентала натрия, введенного в краевую ушную вену из расчета 40 мг/кг. Операция по выделению блока легкие-сердце проводили стандартно, с максимальной осторожностью, избегая повреждения. Далее легкие отмывали от крови теплым физиологическим раствором (37 °C). Легкие через трахею медленно наполняли раствором Хенкса (37 °C) до тех пор, пока все доли легких равномерно не расправятся (обычно

использовали около 40–50 мл раствора Хенкса). После 2–3 минут самотеком жидкость переносили в охлажденную стерильную центрифужную пробирку объемом 50 мл. Процедуру промывания легких раствором Хенкса проводили дважды. Оба смыва центрифугировали 20 минут при 1000 об/мин на холоде (4 °C). Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали в заранее подготовленной полной питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 1 %-ного раствора гентамицина в качестве антибиотика. Далее подсчитывали количество клеток в камере Горяева, используя краситель трипановый синий, для которого живые клетки непроницаемы, а мертвые окрашиваются им в синий цвет. Проводили подсчет только живых клеток.

После подсчета клеток суспензию разводили культуральной средой таким образом, чтобы в конечном разведении число клеток в суспензии оказалось 1×10^6 /мл, после чего клеточную суспензию переносили в 24-луночные планшеты для культивирования, по 1,0 мл в каждую лунку, и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37 °C в течение 30 минут. После прикрепления макрофагов ко дну планшета исходную среду меняли на свежую теплую среду (37 °C), удаляя из культуры не прикрепившиеся посторонние клетки. В лунки вносили исследуемые соединения (0,1 мл): экстракты клюквы, черники и брусники в разведениях 1:10 и 1:100; доксорубин в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл; доксорубин 10 мкг/мл + экстракты клюквы, брусники, черники (разведение 1:100); контроль — клетки без добавления исследуемых субстанций (0,1 мл питательной среды). Инкубировали при 37 °C в атмосфере CO₂ (5 %) в течение 2 часов. Жизнеспособность клеток в контроле (клетки без добавления экстрактов) принимали за 100 % [67].

Перевиваемая клеточная культура. Использовали культуру клеток HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™) — клетки почки эмбриона человека. Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 1 %-ного гентамицина при 37 °C в атмосфере CO₂ (5 %). Через 48 часов клетки сеяли в 96-луночный

планшет в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (104 клетки в каждой лунке), помещали в CO₂-инкубатор. К культуре клеток были добавлены тестируемые соединения (экстракты клюквы, черники и брусники в разведениях 1:10 и 1:100; доксорубин в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл; доксорубин 10 мкг/мл + экстракты клюквы, брусники, черники (разведение 1:100); контроль – клетки без добавления исследуемых субстанций). Далее клетки культивировали в тех же условиях 48 часов. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторениях [67].

МТТ-тест проводили в соответствии с СОПом, основанном на инструкции производителя «In vitro toxicology Assay kit MTT based» (Sigma). Принцип МТТ-теста основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать неокрашенные формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реагента) до голубого кристаллического формазана, растворимого в диметилсульфоксиде. Коэффициент поглощения цветного раствора выражали количественно путем измерения при длине волны 550 нм методом спектрофотометрии (Evolution 201 Thermo Scientific).

Жизнеспособность клеток в контроле (клетки без добавления исследуемых субстанций) принимали за 100 %.

2.8. Культура макрофагов и ПЦР-анализ

В эксперименте использовали клеточную линию мышинных макрофагов RAW 264.7 (ATCC TIB-71, полученную из American Type Culture Collection; Livingstone, MT, USA) в Dulbecco's modified Eagle's среде (DMEM, Life Technologies, NY, USA) с добавлением 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 %-ной фетальной бычьей сыворотки при плотности, не превышающей 5×10^5 клеток/мл. Клетки выдерживали при температуре 37 °С в инкубаторе с CO₂ (5 %), затем высевали в 96-луночный планшет для анализа жизнеспособности. Жизнеспособность клеток измеряли спектрофотометрическим

методом в трех повторах при 550 нм помощью МТТ-теста ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]) [196].

Тотальную РНК выделяли из макрофагов с использованием реагента TRIzol (Life Technologies) в соответствии с инструкциями изготовителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, используя SynergyH1/Take 3 (BioTek, Winooski, VT); кДНК синтезировали, используя 2 мкг РНК каждого образца с помощью коммерческого набора «2cDNA Reverse Transcription kit» (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя ABI GeneAMP 9700 (Life Technologies).

Полученная кДНК была амплифицирована методом количественной ПЦР с использованием «SYBR green PCR Master Mix» (Life Technologies). Чтобы избежать помех из-за загрязнения геномной ДНК, интрон-перекрывающиеся праймеры были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerExpress версии 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): β -актин, прямой праймер: 5'-AAC CGT GAA AAG ATG ACC CAG AT-3', обратный праймер: 5'-CAC AGC CTG GAT GGC TAC GT-3'. COX2, прямой праймер: 5'-TGG TGC CTG GTC TGA TGA TG-3', обратный праймер: 5'-GTG GTA ACC GCT CAG GTG TTG-3'. IL1 β прямой праймер: 5'-CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G-3', обратный праймер: 5'-GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA-3'. Количественную ПЦР проводили на аппарате ABI 7500 Fast real time PCR (Life Technologies), используя 1 цикл при 50 °C в течение 2 мин и 1 цикл при 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов по 15 сек при 95 °C и 1 мин при 60 °C. Экспрессию мРНК анализировали с использованием метода $\Delta\Delta CT$ 7500 Fast System SDS Software v1.3.0 (Life Technologies). Считали, что значения $<1,0$ указывали на ингибирование экспрессии генов по сравнению с ЛПС, который дает максимальную индукцию (1.0). Таким образом, более низкие значения свидетельствуют о более высокой противовоспалительной активности. Значения $>1,0$ означает экспрессию определенного гена при избыточной стимуляции ЛПС. Проводили 2-кратное измерение экспрессии генов [23, 267].

2.9. Методы моделирования метаболического синдрома

Отработка методики моделирования метаболического синдрома проводили на 56 крысах самках Wistar. В одном варианте в качестве агента, инициирующего метаболический синдром, использовали 20 %-ный раствор фруктозы (была использована D-фруктоза > 99 % (Syarikat системы, Малайзия) [231]. В эксперименте 12 крыс получали в течение 8 недель фруктозу, 12 крыс были в контрольной группе и имели нормальный питьевой режим и не подвергались каким-либо воздействиям. Во втором варианте 17 самкам под наркозом (8 мг/кг массы кетамина) была проведена двусторонняя овариэктомия [28]. В асептических условиях проводили операцию лапаротомии, яичники перевязывали и удаляли. Рану послойно ушивали и проводили обработку операционного поля антисептиками, а через неделю была назначена специальная диета. В качестве источника избыточного количества углеводов использовали 10 %-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды [231]. В качестве диеты с повышенным содержанием жиров использовали специальный коммерческий вариант корма с повышенным содержанием жиров (El-Gomhoria Company, Cairo, Египет), предназначенный для моделирования ожирения у крыс [149]. Контрольную группу составили 19 интактных самок.

В последующем основные исследования вероятного эффекта экстрактов северных ягод проводили на модели метаболического синдрома, воспроизведенного аналогично второму варианту методики, описанной выше. В эксперимент было взято 100 крыс Wistar, самок массой тела 180–200 г.

Через 16 недель экспериментальных животных в опытной группе случайным образом поделили на следующие группы: группа животных, получавших исследуемую субстанцию «экстракт полифенолов клюквы» внутрь 0,5 мл, – 15 голов; группа животных, получавших исследуемую субстанцию «экстракт полифенолов брусники» внутрь 0,5 мл, – 15 голов; группа животных, получавших исследуемую субстанцию «экстракт полифенолов черники» внутрь

0,5 мл, – 15 голов; группа животных, получавших ежедневно внутрь 0,5 мл физиологического раствора (плацебо) – 16 голов.

Моделирование артериальной гипертензии. Через 2 недели из каждой группы крыс случайным образом выбрали по 8 крыс и в течение 10 дней поили их вместо питьевой воды 0,8 %-ным раствором натрия хлорида с целью провокации гипертензивного синдрома [284].

Моделирование гипергликемии. Оставшиеся животные получили дважды через 3 дня по 45 мг/кг стрептозоцина в 0,2 М растворе натрия фосфата (рН 4,5) [83]. Стрептозоцин вводили крысам после 12-часового голодания при свободном доступе к воде. Через 3 дня после последней инъекции стрептозоцина оценивали уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крысы, на приборе для измерения уровня глюкозы крови «Gamma Mini» (Gamma, Великобритания).

Тест толерантности к инсулину. Тест толерантности к инсулину выполняли следующим образом. Раствор кристаллического инсулина (30 ME/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. Одного разреза на кончике хвоста было достаточно, чтобы собрать все образцы крови. На графике концентрация/время строили фармакокинетическую кривую глюкозы в крови. С помощью компьютерной программы Bordgia 1.03 рассчитывали AUC (интегральная площадь под фармакокинетической кривой), по методу наименьших квадратов проводили анализ кривой содержания глюкозы в крови от 0 до 120 минут [188].

Для оценки остеопротекторных свойств экстракта черники у животных была изучена плотность костной ткани через 3 месяца от момента проведения процедуры овариэктомии в контрольной группе (плацебо) и исследуемой группе (введение экстракта черники). Плотность костной ткани изучали на приборе Ivis Spectrum CT, PerkinElmer, USA.

Кроме оценки плотности костной ткани проводили морфологическое исследование приготовленных срезов костной ткани (использовали бедренную

кость крысы).

Параллельно исследованию вероятных остеопротекторных свойств было проведено исследование оксидативного статуса в плазме крови крыс, получавших плацебо или экстракт черники на приборе FRAS 4 (Evolvo s.r.l., Italy) с использованием наборов d-ROMs Test (показывает количество АФК) и PAT Test (характеризует общую антиоксидантную активность плазмы крови).

После окончания экспериментов животные подвергались эвтаназии с помощью двуокиси углерода.

2.10. Гистологические исследования

Морфологическое исследование и мофометрические определения с использованием сетки Автандилова Г.Г. проведены в соответствии со стандартными правилами, описанными в методической работе [62]. Исследуемые ткани выдерживали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина по правилам приготовления гистологических препаратов. Далее фиксированные ткани помещали в воск-парафиновые блоки. Полученные воск-парафиновые блоки резали на микротоме и изготавливали парафиновые срезы толщиной 4–5 микрон, которые в последующем окрашивали стандартно гематоксилином и эозином для оценки характера морфологических процессов.

2.11. Статистический анализ

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения». Нормальность распределения показателей оценивали с использованием критерия Shapiro-Wilk's W-test. 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 $Me (Q1 - Q3)$. Для исследования статистической значимости различий средних величин двух независимых выборок использовался критерий Mann-Whitney (U-test), в одной группе наблюдения в динамике – критерий Wilcoxon (W-test). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05 [5].

ГЛАВА 3. МОДЕЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Стандартно обозначенной формы представления термина «метаболический синдром» не существует. В диссертационном исследовании условно понятие «метаболический синдром» понимается как комплекс/сочетание следующих кардинальных факторов: ожирения, дислипидемии, артериальной гипертензии и гипергликемии. Именно эти факторы определяют уровень риска катастрофических сердечно-сосудистых исходов [215]. И при развитии МС у человека, и при моделировании МС у экспериментальных животных среди факторов, способствующих развитию метаболического синдрома, выделяют высокое содержание углеводов и высокое содержание жиров в диете. Поэтому в условиях нашего эксперимента мы пытались моделировать метаболический синдром, вводя крысам избыток углеводов и избыток диетических жиров, используя вариант так называемой «кафетерийной диеты».

Основная цель данного фрагмента исследования заключалась в создании модели метаболического синдрома у крыс путем замены потребления питьевой воды водным 20 %-ным раствором фруктозы на фоне нормальной, стандартной диеты.

Основным поставщиком углеводов в наших экспериментах выбран простой моносахарид фруктоза, широко используемая в качестве подсластителя в пищевых продуктах и напитках [166]. Относительно фруктозы описан эффект ожирения при введении ее в избыточных (нефизиологических) дозах экспериментальным животным [109]. Предположительно, механизм развития ожирения и сахарного диабета под воздействием фруктозы связан с повреждением фруктозой GLUT5 транспортера в панкреатических β -клетках. Также предполагают, что фруктоза обходит основной путь гликолиза, который превращает глюкозо-6-фосфатазу во фруктозо-1,6-бифосфат под действием фосфо-фруктокиназы [165]. Эти два фактора противодействуют глюкозе, которая стимулирует секрецию инсулина, преобразующего глюкозу в гликоген.

Для моделирования МС мы использовали крыс Wistar, как это рекомендовано, поскольку у этих крыс можно добиться увеличения массы тела и увеличения количества триглицеридов [284]. Для моделирования метаболического синдрома мы апробировали в серии предварительных экспериментов 10 %-ный, 20 %-ный и 25 %-ный водные растворы фруктозы. Результаты по критериям: ожирение, триглицеридемия, гипертония, инсулинорезистентность были более приемлемы при использовании 20 %-ного раствора фруктозы, и именно этот режим был использован для последующего моделирования.

Для двух серий эксперимента использовались самки крыс (200–240 г). Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с международными правилами работы с экспериментальными животными European Communities Council Directive (86/609/EEC) [125].

В первой серии экспериментов крысы были случайным образом разделены на две группы по 6 особей, все получали стандартный гранулированный корм вивария, но питьевой режим принципиально отличался: в течение восьми недель крысы, которые служили контролем, получали обычную водопроводную воду, а в экспериментальных группах питьевая вода не была доступна, а вместо воды крысам предлагался 20 %-ный водный раствор фруктозы.

Для питья крысам в опытной группе вместо воды давали фруктозу, разбавленную питьевой водой до концентрации 20 %.

Как критерии ожирения использовали следующие показатели: процент прироста веса тела, индекс массы тела (ИМТ) и окружность живота крыс. Вес крыс определялся еженедельно. Изменение массы тела рассчитывали, вычитая вес, зафиксированный в конце эксперимента, из исходного веса, а затем вычислялся процент прироста. Индекс массы тела определяли в начале эксперимента, исходно и по окончании эксперимента путем деления веса (г) к длине тела (от носа до ануса). Окружность живота измеряли сантиметровой лентой.

Для измерения артериального давления использовали неинвазивный сфигмоманометр ADInstruments. Крыс предварительно вводили в легкий наркоз, уровень систолического артериального давления определяли по трем последовательным измерениям.

Образцы крови из хвостовой вены брали в начале и в конце эксперимента.

Животные выводились из эксперимента в специальной камере с двуокисью углерода. Во время вскрытия брюшной полости жир, включая паранефральный и забрюшинный собирали для взвешивания. В соответствии с работой [230] вес забрюшинного жира относили к длине большеберцовой кости и выражали в миллиграммах на миллиметр длины большеберцовой кости (мг/мм).

Образец жировой ткани немедленно фиксировали в 10 %-ном формалине. Впоследствии тонкие срезы (5 μ м) были окрашены гематоксилином/эозином для гистоморфометрических исследований. Использовалась программа Морфология 5.1, которая обеспечивала три измерения площади в 350 μ м $\times$ 250 μ м в каждом из образцов, устанавливая площадь адипоцита, периметр и диаметр.

Макроскопическая картина вскрытой брюшной полости крыс в контроле и опыте представлена на рисунках 2 и 3.

Как видно, массив жировой ткани у крыс, получавших фруктозу вместо питьевой воды, был несколько более объемным на вид, это было заметно в паранефральной области, в области брыжейки, забрюшинного пространства.



Рисунок 2. Обзорный вид вскрытой брюшной полости крысы в контроле. Стрелки показывают отложения жировой ткани вокруг почек, в области брыжейки и забрюшинного пространства

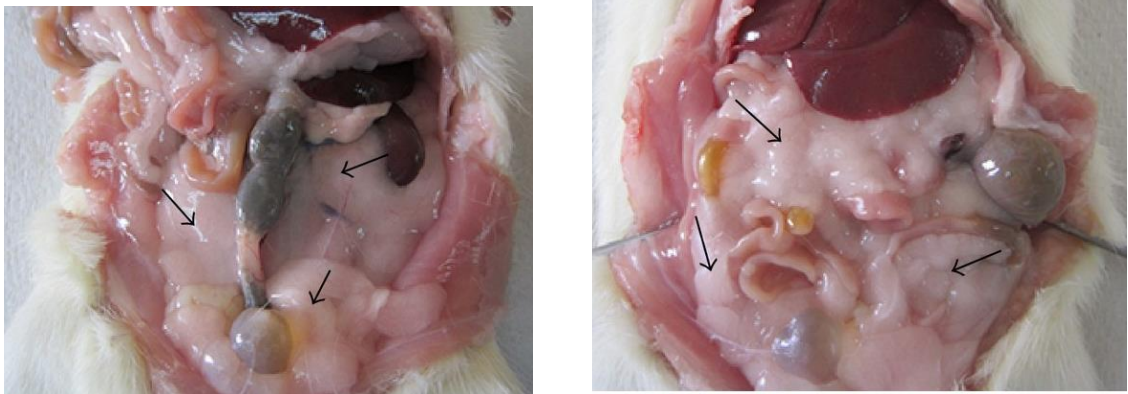
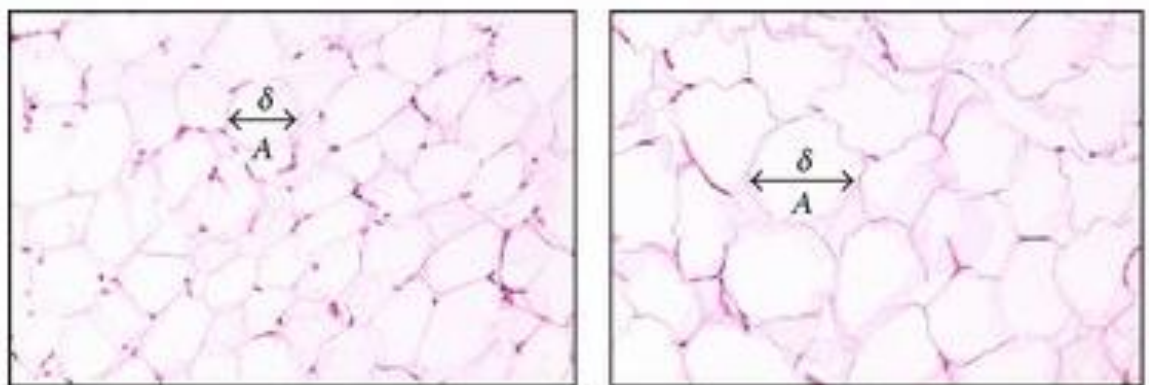


Рисунок 3. Обзорный вид вскрытой брюшной полости крысы в опыте. Стрелки показывают отложения жировой ткани вокруг почек, в области брыжейки и забрюшинного пространства

Микроскопия срезов жировой ткани, как показано на рисунке 4, выявляет выраженную гипертрофию адипоцитов у крыс, которым моделировали метаболический синдром с использованием 20 %-ного раствора фруктозы. Как видно, адипоциты в опыте были значительно больше, чем адипоциты в контроле, это очевидно при сравнении по диаметру и по площади.



Контроль

Опыт

Рисунок 4. Гистоморфология адипоцитов в жировой ткани при использовании 20 %-ного раствора фруктозы в течение 8 недель. Гематоксилин/эозин, увеличение $\times 400$. Обозначены диаметр, периметр и площадь

Визуально отложения абдоминальной жировой ткани были выше в группе крыс, получавших фруктозу (рис. 5 и 6), средние значения веса жировой ткани (таблица 2) также подтверждают это впечатление.

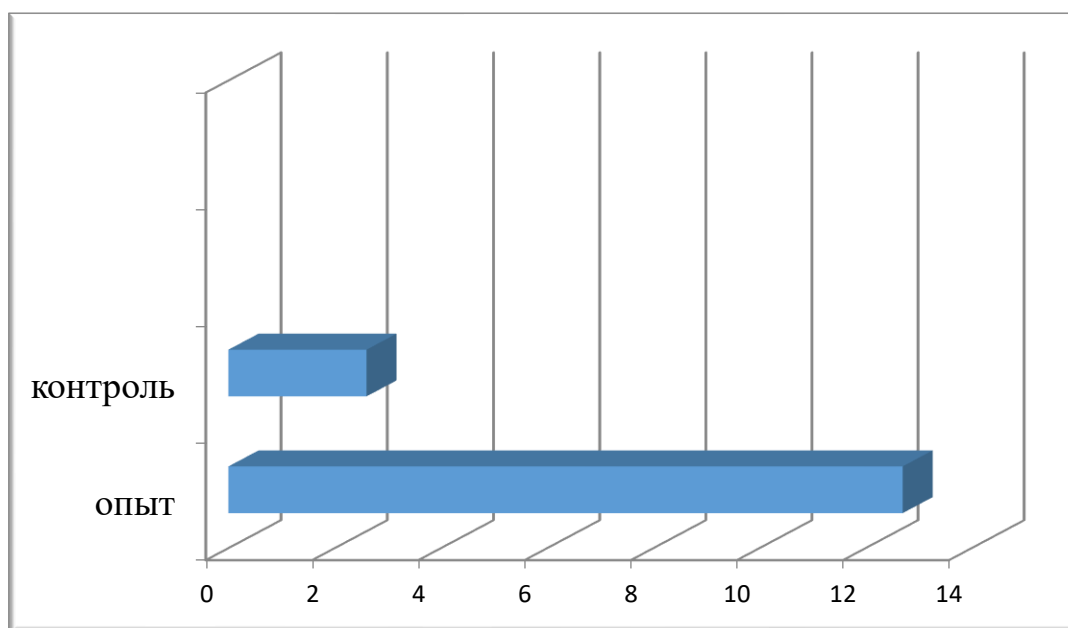


Рисунок 5. Расчетная площадь адипоцитов в $\mu\text{m}^2 \times 10^4$: контроль — $2,6 \pm 0,08$, опыт — $12,7 \pm 1,1$

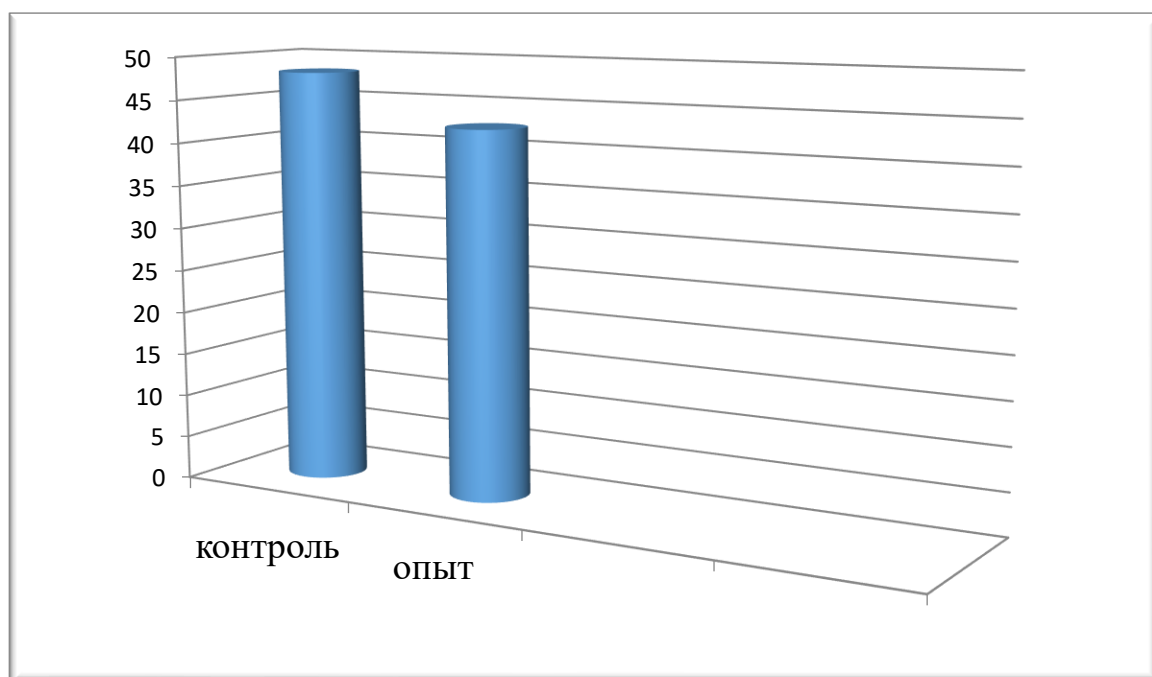


Рисунок 6. Количество адипоцитов в жировой ткани на площади $350 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$: контроль — $48,2 \pm 5,7$, опыт — $42,6 \pm 7,2$

Как видно из таблицы 2, все три параметра ожирения – процент прироста массы тела, ИМТ и окружность живота – были выше в группе крыс, которым давали 20 %-ный раствор фруктозы, по сравнению с группой крыс, которым

давали питьевую воду. Нормальным значение ИМТ для самцов крыс Wistar считается в диапазоне от $0,45 \pm 0,02$ г/см² до $0,68 \pm 0,05$ г/см² [128]. Наше исследование показало, что после восьми недель потребления фруктозы ИМТ достоверно возрастал.

Таблица 2 – Метаболические параметры крыс через 8 недель использования 20 %-ного раствора фруктозы, Ме[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: представлены значения среднего арифметического и стандартной ошибки среднего при $n = 6$ для каждой группы. Надстрочное обозначение * – достоверное различие между контролем и опытом.

Окружность живота также показала более высокие значения по сравнению с контролем. Эти результаты свидетельствуют, что потребление 20 %-ного раствора фруктозы привело к увеличению потребления калорий, следовательно, было большим и отложение липидов [123]. Известно, что избыточное отложение абдоминальной жировой ткани являются кардинальным признаком метаболического синдрома, поскольку это связано с развитием как дислипидемии, так и гипергликемии [193]. Считается, что жировая ткань действует как эндокринный орган, который включается в метаболизм глюкокортикоидных гормонов, а нарушение регуляции глюкокортикоидного метаболизма приводит к дислипидемии [158].

Зафиксированная в условиях нашего эксперимента систолическая гипертензия также может быть связана с ожирением. В формировании гипертензии в состоянии ожирения могли принимать участие увеличение сердечного выброса и общего периферического сопротивления. Предполагают, что активация симпатической нервной системы и ренин-ангиотензиновой системы также вероятна при ожирении [209].

Как видно из представленных данных (таблица 2), у крыс при потреблении фруктозы формируется гипертриглицеридемия, при этом уровень общего холестерина не меняется.

Состояние гипергликемии было зафиксировано в группе крыс с потреблением фруктозы. Это, предположительно, может быть связано с тем, что, как известно, фруктоза в отличие от глюкозы, не способна стимулировать секрецию инсулина в панкреатических β -клетках поджелудочной железы [109].

Полученные результаты позволяют утверждать, что с помощью 20 %-ного раствора фруктозы в течение 8 недель у крыс можно получить имитацию ожирения, нарушений липидного обмена, повышения систолического артериального давления и относительной гипергликемии.

Однако следует учесть важное обстоятельство: в контрольной и опытной группах изначально было взято по 12 голов крыс. В каждой группе были взяты по 6 крыс для определения метаболических параметров по окончании 8 недель и

умерщвлены в конце эксперимента. Оставшиеся в каждой группе по 6 крыс продолжали получать в качестве замены питьевой воды 20 %-ный раствор фруктозы (опыт) и питьевую воду без фруктозы (контроль) далее еще на протяжении 4 недель. В группе крыс, получавших 20 %-ный раствор фруктозы, постепенно животные отказывались от питья и погибали (на 1 неделе – 1 крыса, на второй неделе – 4 крысы, на четвертой неделе – 1 крыса). В контрольной группе все животные оставались живы. 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 36 крыс были распределены случайным образом в две группы. Контрольную группу составили 19 интактных крыс, находившихся на стандартной диете вивария и не подвергавшихся каким-либо воздействиям. В группе эксперимента 17 самкам была сделана двусторонняя овариэктомия. Кроме того, крысам была назначена специальная углеводно-жировая диета. В качестве источника избыточного количества углеводов использовали 10 %-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды в течение 8 недель [231]. В качестве диеты с повышенным содержанием жиров использовали коммерческий вариант корма с повышенным содержанием жиров (производства El-Gomhoria Company, Cairo, Египет) [149].

По 6 крыс в каждой группе было оставлено после проведения основного этапа эксперимента еще на 4 недели для контроля выживаемости.

Тест толерантности к инсулину выполняли через 8 недель следующим образом. Раствор кристаллического инсулина (30 ME/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. Одного разреза на кончике хвоста было достаточно, чтобы собрать все образцы крови. На графике концентрация/время строили фармакокинетическую кривую глюкозы в крови. С помощью

компьютерной программы Bordgia 1.03 рассчитывали AUC (интегральная площадь под фармакокинетической кривой), по методу наименьших квадратов проводили анализ кривой содержания глюкозы в крови от 0 до 120 минут [188]. Измеряли процент прироста веса тела, индекс массы тела и окружность живота в начале и в конце эксперимента.

Для измерения артериального давления использовали неинвазивный сфигмоманометр ADInstruments. Крыс вводили в легкий наркоз, брались средние данные систолического артериального давления по трем последовательным измерениям. Образцы крови были получены в начале и в конце эксперимента, который длился 8 недель, из хвостовой вены крыс.

Через 8 недель питьевую 10 %-ный раствор фруктозы заменили 0,8 %-ным раствором натрия хлорида и давали в течение недели с целью провокации гипертензивного синдрома [91].

В конце эксперимента крысы были умерщвлены в камере двуокисью углерода. Ткани внутренних органов были взяты для проведения гистоморфологического исследования.

Как видно, все параметры, характеризующие ожирение, в данном варианте моделирования выражены, получена картина тяжелого ожирения (таблица 3).

Можно заметить, что липидный обмен характеризуется выраженными нарушениями, типичными не только для метаболического синдрома (гипертриглицеридемия), но и для гиперхолестеринемии (повышение общего холестерина и ЛПНП, снижение ЛПВП).

Увеличение билирубина, АЛТ, ШФ свидетельствует о возможном стеатозе печени.

Таблица 3 – Метаболические параметры крыс через 8 недель на фоне специальной диеты у овариэктомированных 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; индекс атерогенности = (общий ХС – ЛПВП)/ЛПВП

Уровень гликемии, в отличие от первого варианта моделирования, не превышает контрольные значения, но тест толерантности к инсулину ясно подтверждает развитие инсулинорезистентности у крыс (таблица 4).

Таблица 4 – 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.

Высокое артериальное давление в данном варианте модели метаболического синдрома очевидно связано с солевой диетой, использованной на конечном этапе моделирования (таблица 5).

Таблица 5 – 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)

Морфологические изменения во внутренних органах, приведенные ниже, типичны для картины повреждения тканей при метаболическом синдроме.

У интактных крыс основная масса миокарда представлена здоровой тканью, состоящей из сократительных клеток – сердечных миоцитов. Поперечнополосатая исчерченность ткани хорошо просматривается, сохраняются темно-окрашенные прямолинейные или ступенчатые полосы, расположенные перпендикулярно к длинной оси клетки, просматривается некоторое умеренное полнокровие единичных сосудов (рисунок 7 А). А при моделировании метаболического синдрома выявляются незначительное исчезновение поперечнополосатой исчерченности, отек и умеренное полнокровие межучной ткани, есть гиалиново-капельная дистрофия кардиомиоцитов (рисунок 7 В).

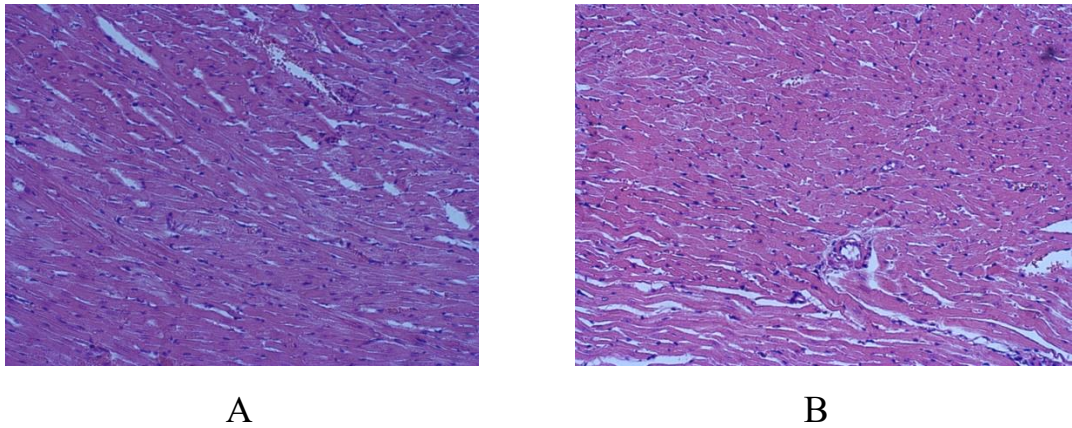
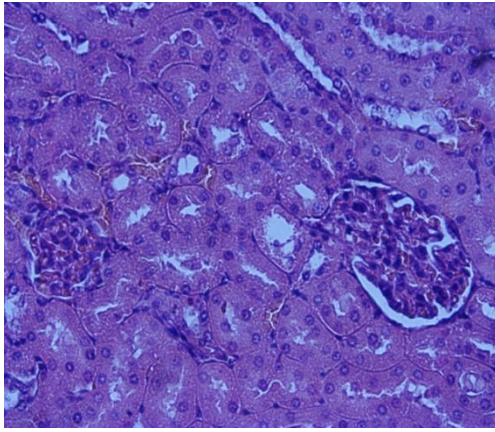
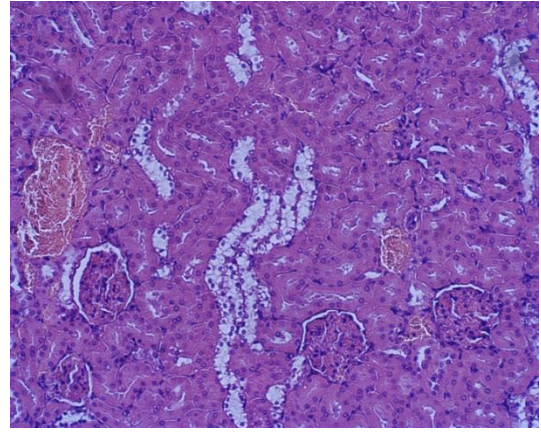


Рисунок 7. Ткань миокарда. Окраска гематоксилином и эозином: А – контроль, В – опыт, увеличение $\times 200$

В ткани почек крыс контрольной группы корковый и мозговой слои сохранены. В корковом веществе определяются почечные тельца, проксимальные и дистальные канальцы, в мозговом веществе – дистальные канальцы. В клубочках можно определить незначительную мезангиальную пролиферацию. Проксимальные канальцы представлены однослойным призматическим каемчатым эпителием, дистальные канальцы – однослойным кубическим эпителием. Интерстициальная соединительная ткань представлена рыхлой, волокнистой соединительной тканью. В просвете сосудов межуточной ткани определяются эритроциты. Мочевое пространство сохранено, свободно. Умеренное полнокровие сосудистых петлей клубочков и сосудов межуточной ткани (рисунок 8 А). Ткань почек крыс с моделью метаболического синдрома представлена на рисунке 8 В. Можно видеть, что часть почечных клубочков меньше, чем в контроле, при этом в части случаев видна расщепленная базальная мембрана. На этом же рисунке прослеживается и лобулярность сосудистых петлей. Все наблюдаемые сосуды межуточной ткани являются полнокровными. В межуточной ткани есть очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация. Эпителий дистальных канальцев инфильтрирован, набухший. В проксимальных канальцах можно проследить наличие гиалиново-капельной белковой дистрофии, а в дистальных канальцах – жировой дистрофии. В просвете канальцев можно видеть белковые массы. Строма отекая.



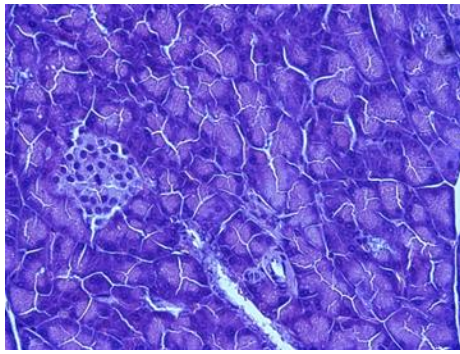
А



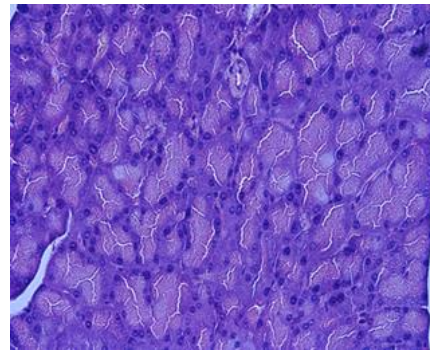
В

Рисунок 8. Ткань почки. Окраска гематоксилином и эозином. А – контроль, В – опыт. Увеличение $\times 400$

В ткани поджелудочной железы у интактных крыс (рисунок 9 А) ацинарное строение сохранено. С поверхности определяется тонкая соединительнотканная капсула. Паренхима ткани поджелудочной железы в виде долек с соединительнотканными перегородками и с выводными желчными протоками, сосудами, нервными пучками. Экзокринная часть состоит из панкреатических ацинусов и выводных протоков. В просвете протоков есть и плоский эпителий, и кубический, и призматический, видны также железистые бокаловидные клетки. Меньшая эндокринная часть образована расположенными между ацинусами островками Лангерганса. Видно, что островки отделены от ацинусов тонкой соединительнотканной прослойкой и представляют собой пронизанные густой сетью капилляров клеточные скопления округлой формы (рисунок 9 А). В ткани поджелудочной железы крыс, у которых моделировали метаболический синдром, при микроскопическом исследовании обнаруживается, что часть клеток железистых ацинусов находится в стадии атрофии (умеренной степени), наблюдается избыточное количество соединительной ткани, в стенках кровеносных сосудов наблюдаются признаки гиалиноза и склероза. Повсеместно видны зоны жировой дистрофии. Для клеток островков Лангерганса характерна дистрофия, само количество островков Лангерганса уменьшено. Белковая гиалиново-капельная дистрофия повреждает эпителиоциты (рисунок 9 В).



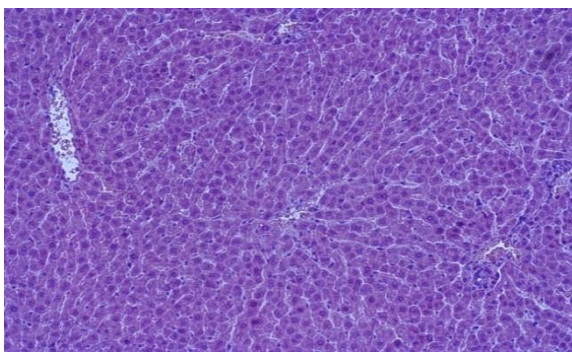
А



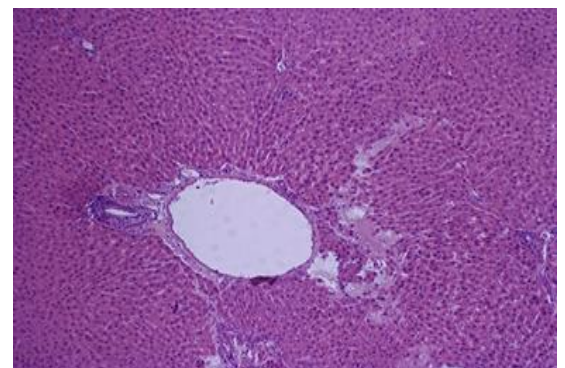
В

Рисунок 9. Поджелудочная железа. Ацинарное строение сохранено. Окраска гематоксилином и эозином. А – контроль, В – опыт. Увеличение $\times 400$

На препаратах ткани печени интактных крыс повсеместно просматриваются гексагональная дольки, по углам которых видны портальные тракты. Радиарная структура гепатоцитов сохранена (рисунок 10 А). В то же время структура ткани печени крыс, у которых моделировали метаболический синдром, частично нарушена (рисунок 10 В). Портальные тракты частично фиброзированы, просматриваются расширенные сосуды и множество желчных протоков. В расширенных венах и протоках видны белковые массы, есть признаки плазматического пропитывания стенок. Видны гепатоциты с признаками белковой и жировой дистрофии. Обнаруживаются печеночные клетки с увеличенными ядрами. Заметен фиброз портальных трактов, пролиферация желчных протоков. Синусоиды выглядят полнокровными.



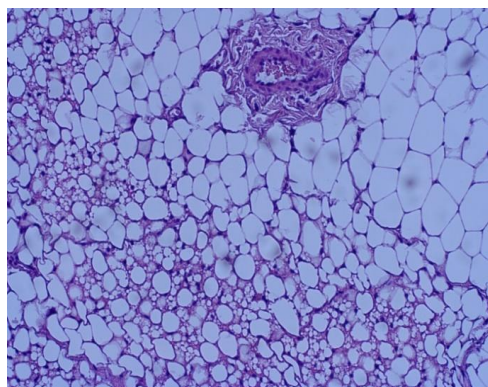
А



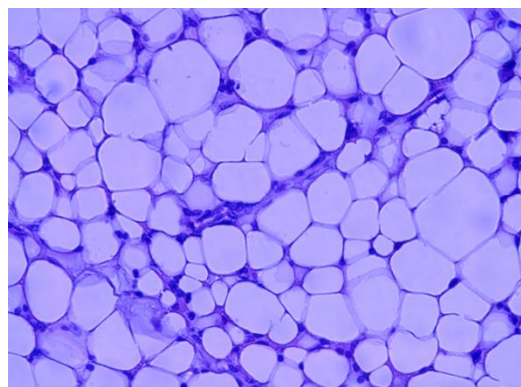
В

Рисунок 10. Ткань печени. Окраска гематоксилином и эозином. А – контроль, В – опыт. Увеличение $\times 200$

У крыс контрольной группы гистологическая картина жировой ткани представлена мелко-, средне- и крупнокапельными жировыми вакуолями, часть из них – с темной цитоплазмой. Незначительные скопления эритроцитов в межуточной ткани. Крупные жировые вакуоли, разделенные соединительнотканными прослойками (рисунок 11 А). В жировой ткани крыс с моделью метаболического синдрома видны скопления крупнокапельных жировых вакуолей. В строме полнокровие и признаки фиброза (рисунок 11 В).



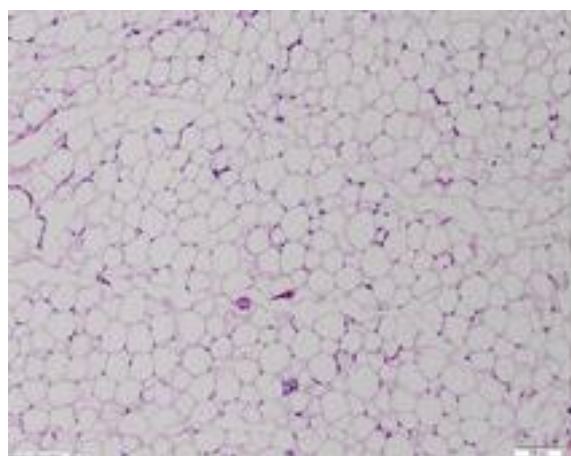
А



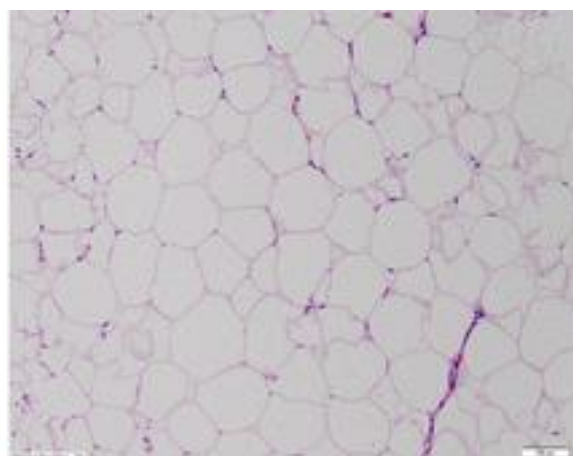
В

Рисунок 11. Жировая ткань. Окраска гематоксилином и эозином. А – контроль, В – опыт. Увеличение $\times 200$

При морфометрическом исследовании жировой ткани (программа Морфология 5.1) в каждом из образцов были измерены периметр и диаметр, произведен расчет площади адипоцита (рисунок 12).



А



В

Рисунок 12 – Жировая ткань. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм. А – контроль, В – опыт

Результаты морфометрии жировой ткани представлены на рисунках 13 и 14. Выявлена гипертрофия адипоцитов в группе крыс, у которых инициировали метаболический синдром. Визуально адипоциты в опыте выглядят значительно больше по диаметру и по площади по сравнению с контролем, как показано на рисунке 13. Количество адипоцитов, как показано на рисунке 14, существенно увеличилось в жировой ткани крыс с метаболическим синдромом. Можно констатировать и гипертрофию адипоцитов, и гиперплазию адипоцитов в данном варианте модели метаболического синдрома.

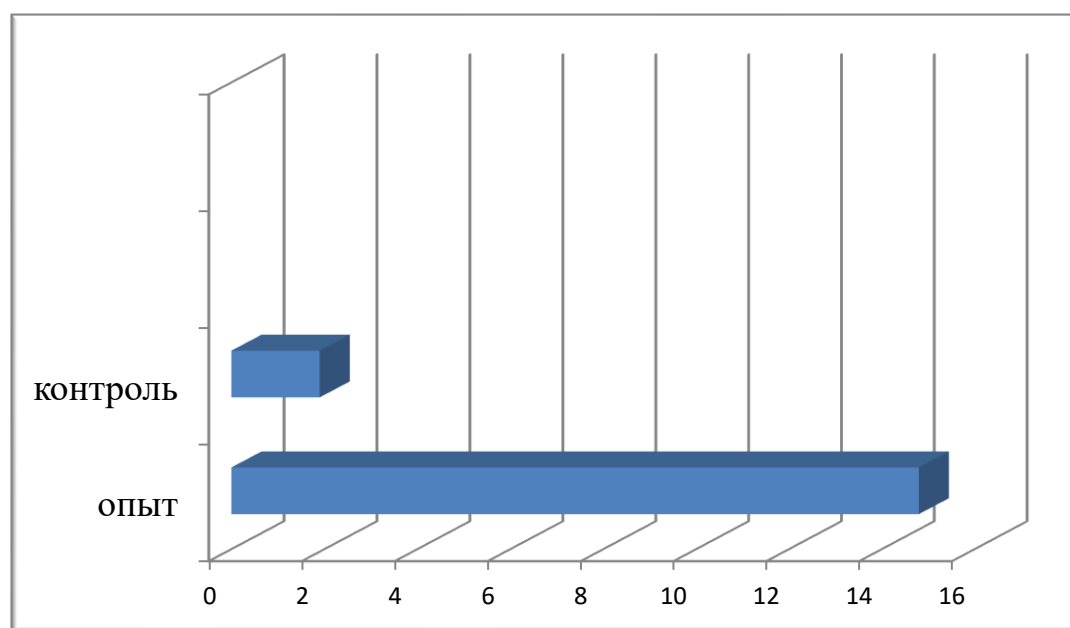


Рисунок 13. Расчетная площадь адипоцитов в $\mu\text{m}^2 \times 10^4$: контроль – $1,9 \pm 0,09$, опыт – $14,8 \pm 1,6$, $p < 0,05$

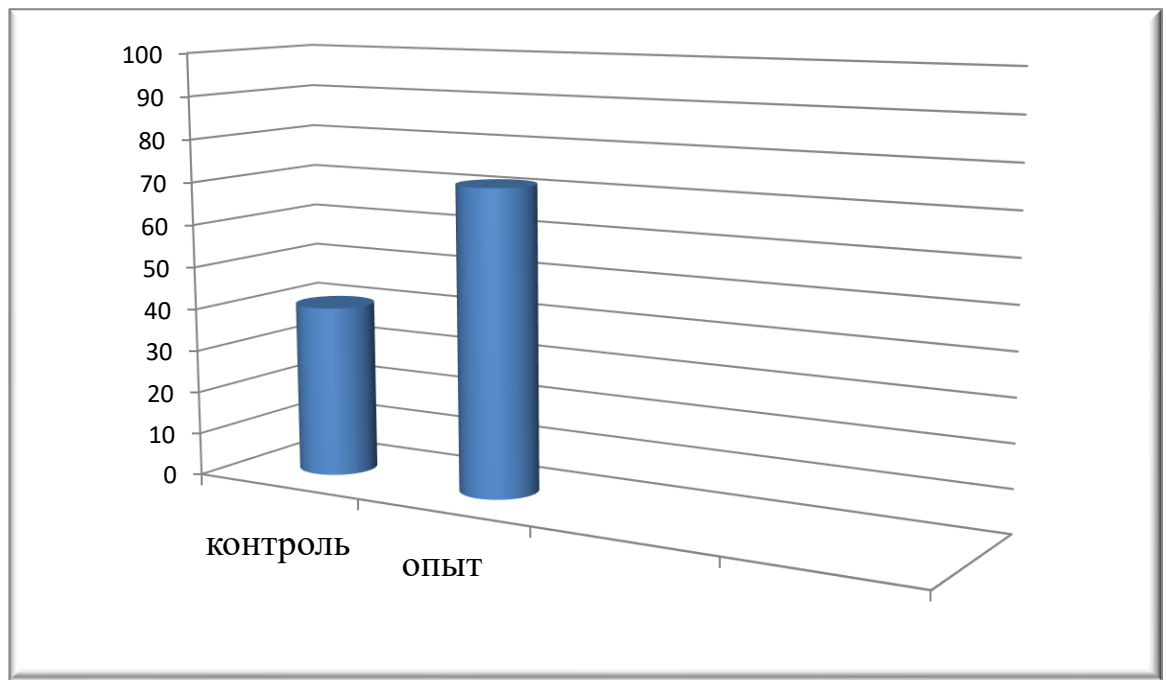


Рисунок 14. Количество адипоцитов в жировой ткани: контроль – $40,3 \pm 3,7$, опыт – $71,4 \pm 6,7$, $p < 0,05$

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 оказалась более гуманной.

Полученные нами варианты модели метаболического синдрома в достаточной степени коррелируют по своим основным параметрам с наиболее часто используемыми по литературным данным.

Так, если судить по публикациям базы PubMed последнего времени, в описании профилактического действия растительных полифенолов и

гетероциклических соединений при метаболическом синдроме наиболее часто используют либо модель, вызванную 16-недельным введением 10 %-ного раствора фруктозы, либо, как в нашем случае, – 8-недельным введением 20 %-ного раствора фруктозы [112]. При этом удастся продемонстрировать контроль гликемии и оксидативного стресса, но не эффект снижения триглицеридемии или других липидных нарушений [161, 194, 270]. В некоторых случаях продемонстрирована возможность снижения гипертензии на данной модели, но данные по этому поводу противоречивы [151].

Еще один вариант модели, вызванный жировой диетой либо сочетанием жировой и углеводной диеты на фоне овариэктомии самок или кастрации самцов, позволяет продемонстрировать возможности коррекции липидных нарушений, включая гиперхолестеринемию и гепатостеатоз [115, 159, 218].

Сложнее ситуация с использованием моделей метаболического синдрома для выбора технологий коррекции ожирения: однозначно рекомендуемой модели пока нет [134, 225], и описываемые результаты достаточно противоречивы [208].

Таким образом, результаты, полученные в условиях нашего эксперимента, свидетельствуют о возможности получения модели метаболического синдрома у крыс Wistar в двух вариантах: а) избыточно тяжелого варианта синдрома при замене питьевой воды на 20 %-ный раствор фруктозы в течение 8 недель; б) более адекватный вариант модели метаболического синдрома за счет использования специальной жировой диеты на фоне 10 %-ного раствора фруктозы после овариэктомии. Оба варианта метаболического синдрома могут являться объектами исследования для тестирования и выбора технологий коррекции течения метаболического синдрома в эксперименте. Однако, второй вариант нам кажется более удобным ввиду возможности тестирования на данной модели терапевтических вмешательств [6, 49].

ГЛАВА 4. ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЭКСТРАКТОВ КЛЮКВЫ, БРУСНИКИ, ЧЕРНИКИ: АНТИОКСИДАНТНЫЙ, ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ IN VITRO

Свежие ягоды клюквы, черники, брусники были заготовлены в 2015–2018 годах в Сургутском районе Ханты-Мансийского автономного округа – Югры Тюменской области Российской Федерации, и данные образцы считали типичными для региона северо-западной Сибири. Из свежих ягод рода *Vaccinium* были получены сначала водно-спиртовые экстракты, в последующем – бесспиртовые экстракты, которые и использовали для исследования. Стандартизацию проводили по общему фенольному числу – 10 мг/мл.

Концентрацию полифенолов в образцах исследовали, используя коммерческий набор для определения концентрации полифенолов Polyphenols Folin-Ciocalteu (ENOLOGY line by BioSystems, Spain) в соответствии с инструкцией производителя реагента, по методу Singleton [263].

При проведении хроматографического анализа экстракты разводили раствором вода/этанол (1:1). Экстракты клюквы и брусники разводили в пять раз, экстракт черники – в шесть раз при анализе неокрашенных фенольных соединений и в шестьдесят – при анализе антоцианов. Затем растворы фильтровали через нейлоновые фильтры 0,2 мкм (Uniprep, Whatman).

Анализ содержания фенольных соединений проводился методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1290 Infinity. Разделение в градиентном режиме осуществлялось на колонке ZORBAX RRHD SB-C18 2.1 × 100 мм, 1,8 мкм. Подвижная фаза состояла из двух компонентов: 0,1 %-ного водного раствора муравьиной кислоты (компонент А) и ацетонитрила, содержащего муравьиную кислоту в концентрации 0,1 % (компонент В). Идентификация фенольных соединений проводилась в соответствии с временами удерживания и спектрами поглощения соответствующих аналитических стандартов [119, 196, 301].

Количественная характеристика содержания индивидуальных веществ

проводилась с использованием калибровок по соответствующим стандартным образцам. Концентрации антоцианов даны в единицах глюкозидов, соответствующих антоцианидинов. Концентрации цианидин-гликозидов рассчитывались как мальвидин-3-глюкозид. Концентрации процианидинов даны в единицах концентрации катехина. Гликозиды кверцетина определялись как кверцетин-3-глюкозид. Концентрации кумаровохиновой кислоты и мирицетин-3-галактозида рассчитывались как п-кумаровую кислоту и мирицетин соответственно.

На рисунке 15 приведены значения общего полифенольного числа (концентрация полифенолов) в исследуемых соединениях.

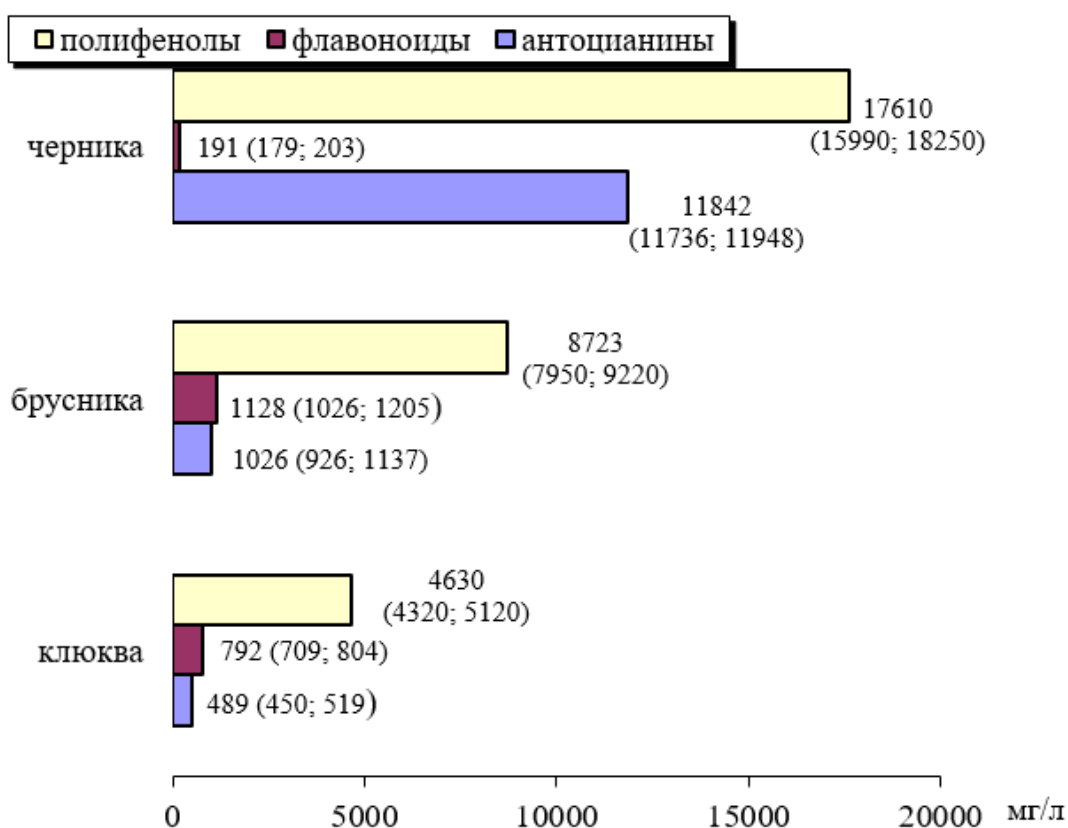


Рисунок 15. Фенольный состав экстрактов клюквы, брусники, черники

Примечание: концентрация полифенолов в экстракте клюквы, при $n = 5$, составляет 4630 мг/л (4320-5120); в экстракте брусники ($n = 4$) 8723 мг/л (7950-9220); в экстракте черники ($n = 5$) 17610 мг/л (15990-18250). Статистическая значимость различий концентраций полифенолов исследовалась методом Mann-Whitney: $p_{1-2} < 0,01$; $p_{1-3} < 0,001$.

Полученные данные свидетельствуют, что наибольшая концентрация полифенолов присутствует в экстракте черники, несколько ниже она в экстракте брусники и существенно меньше – в экстракте клюквы.

Более детально состав полифенольных компонентов водно-спиртовых экстрактов черники, брусники и клюквы представлен в таблицах 6 и 7 (приведены средние арифметические значения по трем определениям без стандартной ошибки среднего), а также на рисунках 16, 17 и 18.

Таблица 6 – 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
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

№	Компонент в соответствии со стандартом	Клюква	Брусника	Черника
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

Таблица 7 — Компонентный состав антоцианов в экстрактах ягод, мг/л

№	Антоциан	Экстракт клюквы	Экстракт брусники	Экстракт черники
Антоцианы подгруппы Delphinidin-3-O-				
1	Galactoside	7	20	117
2	Glucosidest	2	N	49
3	Arabinoside	N	N	830
Антоцианы подгруппы Cyanidin-3-O-				
1	Galactoside	86	118	500
2	Glucoside	16	44	601
3	Arabinoside	77	39	502
Антоцианы подгруппы Petunidin-3-O-				
1	Galactoside	-	-	49
2	Gucosidest	41	57	1006
3	Arabinoside	-	8	77
Антоцианы подгруппы Peonidin-3-O-				
1	Galactoside	207	117	96
2	Gucosidest	69	29	480
	Arabinoside	69	76	25
Антоцианы подгруппы Malvidin-3-O-				
1	Galactoside	16	8	94
2	Glucosidest	11	68	725
3	Arabinoside	50	82	397

Примечание: результаты отсутствуют

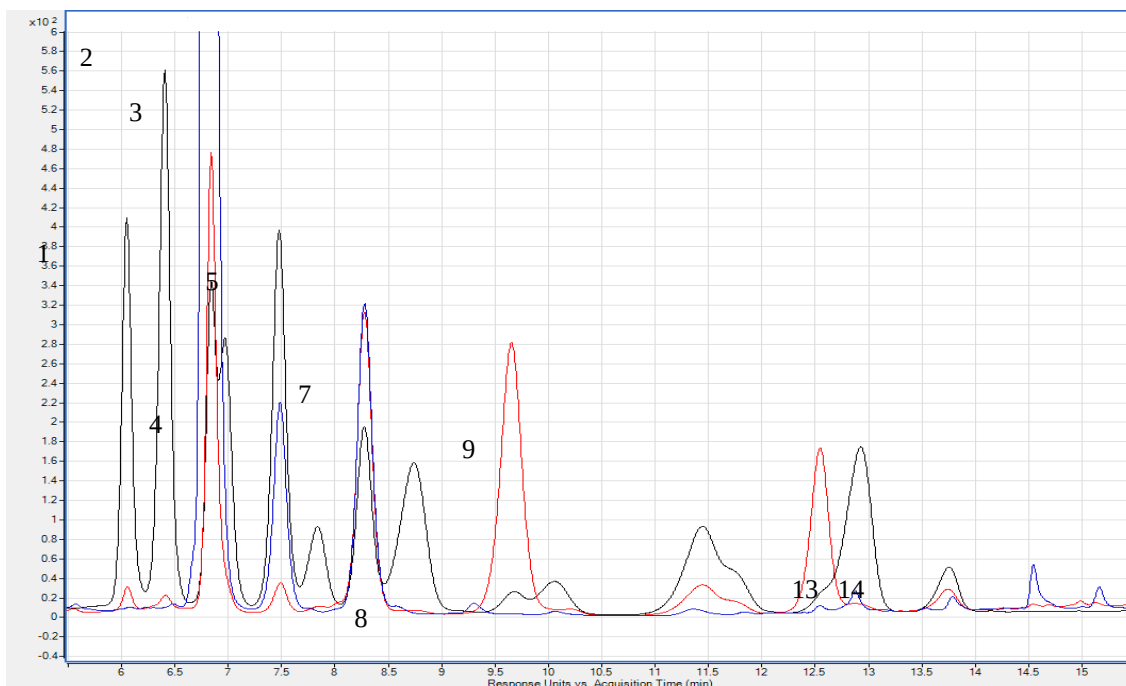


Рисунок 16. Антоцианы на хроматограммах экстрактов клюквы (красная линия), брусники (синяя линия) и черники (черная линия). λ 520 нм

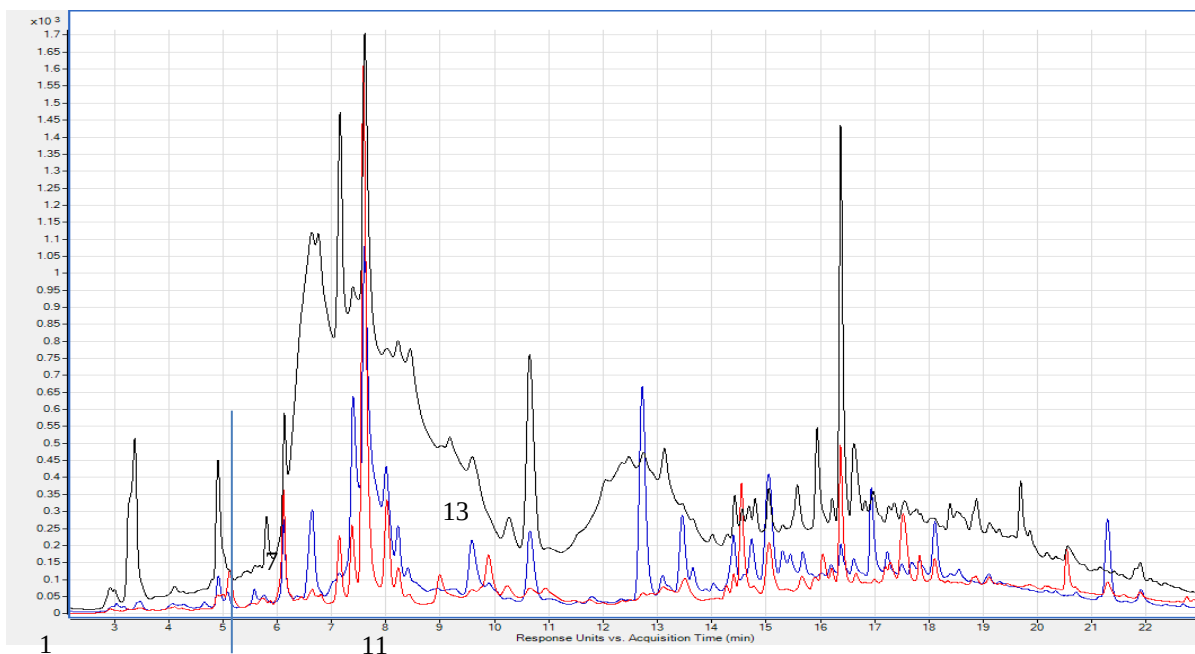


Рисунок 17. Гидроксibenзойные кислоты и флаван-3-олы на хроматограммах экстрактов клюквы (красная линия), брусники (синяя линия) и черники (черная линия). λ 280 нм

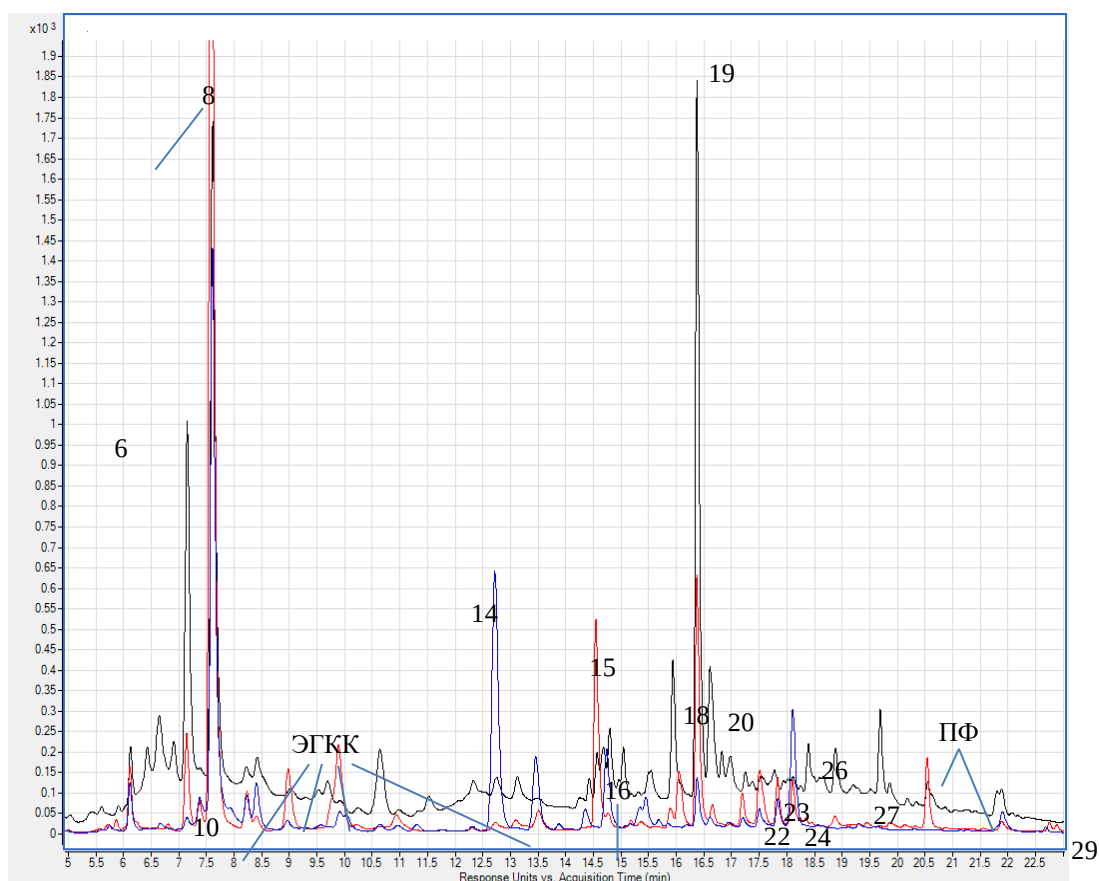


Рисунок 18. Гидроксикоричные кислоты и флавонолы на хроматограммах экстрактов клюквы (красная линия), брусники (синяя линия) и черники (черная линия). λ 325 нм. ЭГКК – эфиры гидроксикоричных кислот. ПФ – производные флавонолов

Как видно, в экстрактах клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) преобладает хлорогеновая кислота, а также изомеры кверцетина, флавонолы и флаваны. Среди антоцианов клюквы в наибольшей концентрации найдены Peonidin и Cyanidin галактозидазы и арабинозидазы. В экстракте брусники наибольшее значение имеют катехин, процианидины и флаваны, а из антоцианов – Cyanidin-3-O-galactoside. В экстракте черники найдены высокие концентрации эпикатехина, кверцетина, флавонолов и флаванов. Эти положения иллюстрирует рисунок 19. Содержание компонентов снижается в рядах: по полифенолам – черника, брусника, клюква; по проантоцианидинам – брусника, черника, клюква; по антоцианинам – черника, брусника, клюква [17, 64, 237].

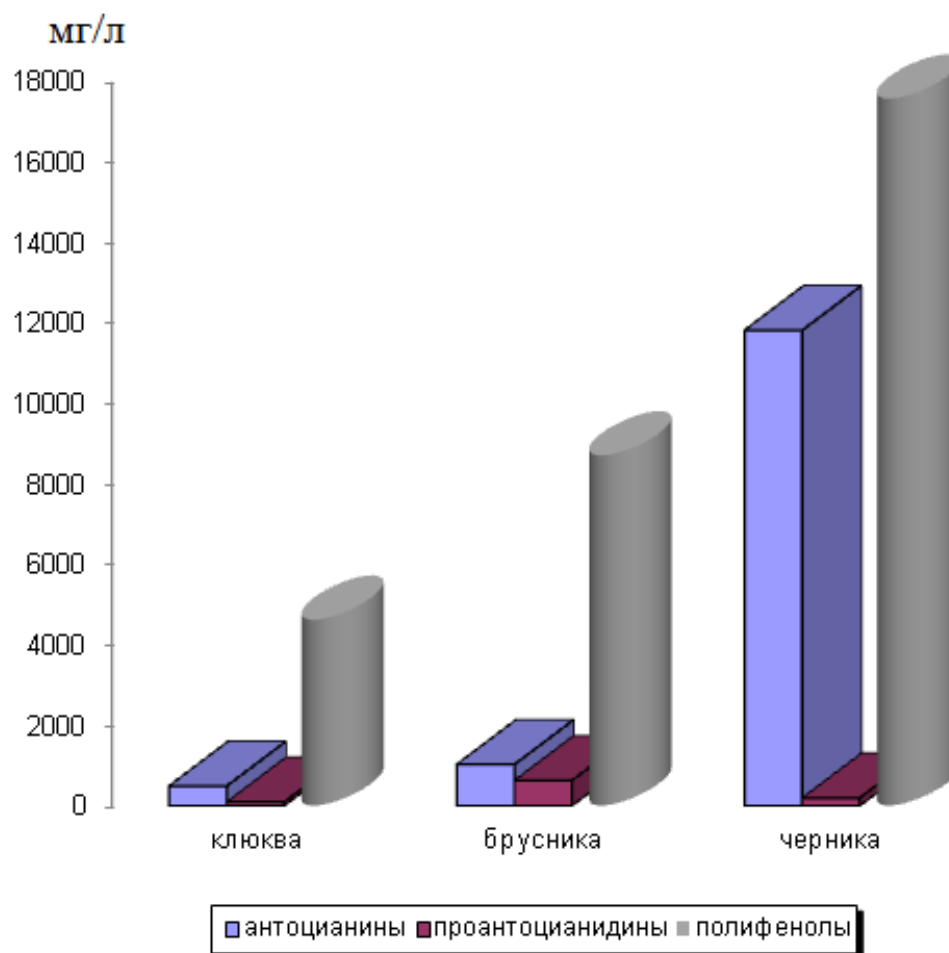


Рисунок 19. Фенольный состав экстрактов клюквы, брусники, черники

Результаты определения свободных радикалов в DPPH-тесте и ABTS-тесте представлены ниже.

Концентрация радикалов была измерена с помощью стабильного DPPH и тролокса в качестве эталонного вещества [263]. Образцы разбавляли в 10 раз 80 %-ным метанолом перед смешиванием с реагентом. Снижение абсорбции свободных радикалов DPPH была просчитана при 515 нм против этилового спирта (спектрофотометр Evolution 201 Thermo Scientific). Тролокс (0, 100, 200, 300, 400, и 500 мкм) был использован в качестве стандартного антиоксиданта. Анализ проводился в трех повторах для каждого образца и каждой концентрации стандарта. Антиоксидантная активность была зафиксирована в микромолях тролокс-эквивалента на мл (мкмоль ТЭ/мл).

ABTS-тест проводили, как описано по Re [90]. Тест базируется на сокращении количества ABTS+ радикалов при наличии антиоксидантов в

ягодных экстрактах. После добавления 100 мкл экстракта ягод к 3 мл ABTS+• абсорбцию измеряли через 10 мин. инкубации при 30°C. Все определения проводили в трех повторях. Антиоксидантная активность была зафиксирована в мкмоль ТЭ/мл.

В таблице 8 можно видеть значения оптической плотности раствора 100 μM DPPH-радикала после инкубации с испытуемым веществом (среднее из трех повторений).

Таблица 8 – Значения оптической плотности раствора 100 μM DPPH-радикала после 10-минутной инкубации с испытуемым экстрактом (среднее из трех повторений)

Образец	Оптическая плотность	Ингибирование DPPH-радикала, %
Экстракт клюквы	0,214	87
Экстракт брусники	0,313	81
Экстракт черники	0,176	89
Контроль (раствор DPPH без испытуемого образца)	1,663	0

В таблице 9 представлены результаты определения уровня ингибирования радикалов ABTS+ при инкубации с исследуемыми экстрактами северных ягод.

Таблица 9 – Ингибирование ABTS+ радикала в тролокс-эквиваленте (ТЭ) в присутствии исследуемых экстрактов (n = 9)

Образец	Тролокс- эквивалент (мкмоль ТЭ/мл)
Экстракт плодов клюквы	50,6 [46,3; 57,0]
Экстракт плодов брусники	66,7 [57,1; 73,2]
Экстракт плодов черники	142,5 [135,1; 151,1]*

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к результатам с экстрактом плодов клюквы или экстрактом плодов брусники

Как видно, относительная антиоксидантная активность, измеряемая в тестах DPPH и ABTS, отражает содержание полифенольных компонентов в исследуемых

экстрактах ягод.

Приведенные данные демонстрирует выраженную антирадикальную активность в отношении DPPH-радикала и ABTS+ радикала водно-спиртовых экстрактов из плодов черники, брусники, клюквы, причем выраженность антирадикального эффекта экстракта плодов черники, вследствие большей концентрации полифенолов – более высокая.

Для исключения влияния фактора общей концентрации полифенолов эти эксперименты были повторены с изменением концентрации полифенолов в экстрактах ягод. Концентрации полифенолов в сравниваемых экстрактах были выровнены до уровня экстракта клюквы – примерно 5000 мг/л – путем разведения экстрактов брусники и черники. Результаты приведены на рисунках 20 и 21 для радикалов DPPH и ABTS+ соответственно.

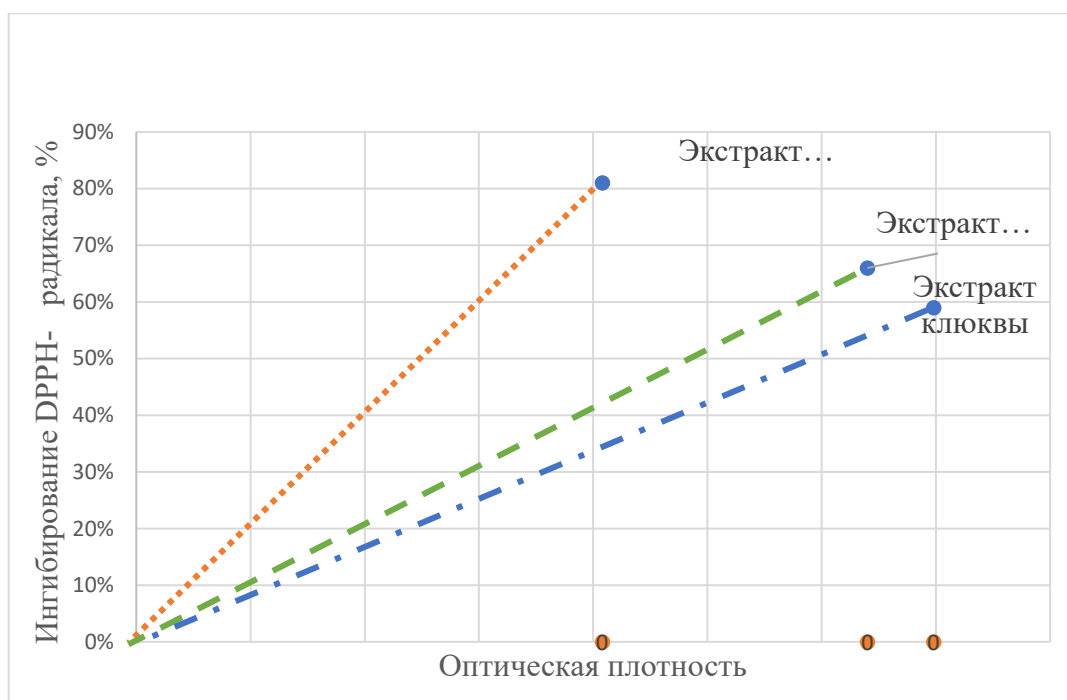


Рисунок 20. Значения оптической плотности раствора 100 μ M DPPH радикала после 10-минутной инкубации с испытуемым веществом (среднее из трех повторений)

Примечание: ингибирование DPPH- радикала, %: контроль (раствор DPPH без испытуемого образца) – 0 %; экстракт клюквы – 59 %; экстракт брусники – 66 %; экстракт черники 81 %; во всех случаях средняя концентрация полифенолов 5 000 мг/л.

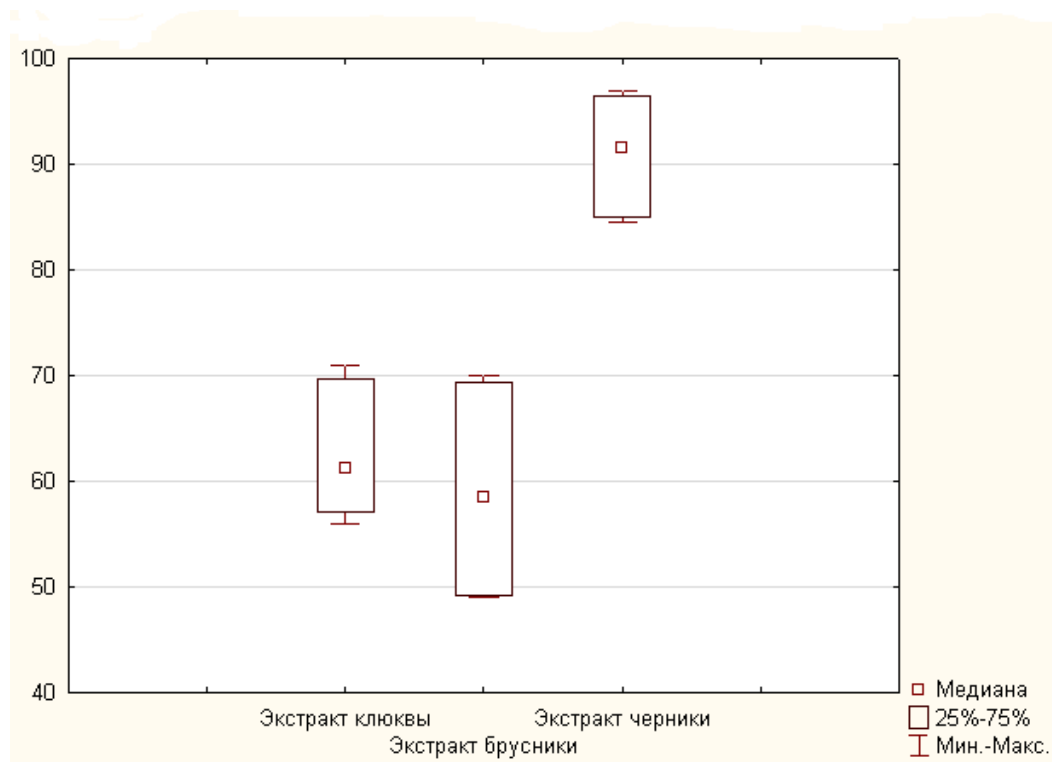


Рисунок 21. Ингибирование ABTS+ радикала в тролокс-эквиваленте (ТЕ) при концентрации полифенолов ~ 5000 мг/л (n = 6)

Примечание: значения тролокс-эквивалента – экстракт клюквы 61,2 [57,1; 69,7]; экстракт брусники 58,4 [49,2; 69,4]; для экстракта черники ТЕ 91,6 [85,0; 96,4] при $p < 0,05$ при сравнении с экстрактом плодов клюквы или брусники.

Как видно, между антирадикальной активностью в отношении DPPH радикала и интегральной концентрацией полифенолов выраженной зависимости не выявляется. Но сравнение экстрактов, уравненных по показателю общего содержания полифенолов, в тесте сравнения с тролоксом ингибирующей способности в отношении ABTS+ радикала выявляет некоторое статистически значимое преимущество экстракта черники. Есть основания считать, что не только уровень концентрации полифенолов важен и именно он определяет антирадикальную активность, но и содержание компонентов. Например, присутствие галловой кислоты в экстракте черники при отсутствии ее значимого содержания в экстрактах клюквы и брусники наводит на мысль о том, что это полифенольное соединение в экстракте черники может и придавать дополнительные антиоксидантные свойства.

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 [1, 2, 3, 17].

В первом случае использовали первичную культуру альвеолярных макрофагов кролика. Для получения альвеолярных макрофагов использовали здорового кролика шиншилла весом 3,2 кг. После прикрепления альвеолярных макрофагов ко дну планшета исходную среду меняли на свежую теплую среду (37°C), удаляя из культуры не прикрепившиеся посторонние клетки. В лунки вносили исследуемые соединения (0,1 мл): экстракты клюквы, черники и брусники в разведениях 1:10 и 1:100; доксорубицин в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл; доксорубицин 10 мкг/мл + экстракты клюквы, брусники, черники (разведение 1:100); контроль – клетки без добавления исследуемых экстрактов (0,1 мл питательной среды). Инкубировали при 37 °C в атмосфере CO₂ (5 %) в течение 2 часов. Жизнеспособность клеток в контроле (клетки без добавления экстрактов) принимали за 100 % [67]. Для каждого разведения экстрактов эксперименты выполняли трехкратно.

Перевиваемая клеточная культура. Использовали культуру клеток HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™) – клетки почки эмбриона человека. Клетки выращивали в среде DMEM с добавлением 10 %-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 1 %-ного гентамицина при 37 °C в атмосфере CO₂ (5 %). К культуре клеток были добавлены тестируемые соединения (экстракты клюквы, черники и брусники в разведениях 1:10 и 1:100; доксорубицин в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл; доксорубицин 10 мкг/мл + экстракты клюквы, брусники, черники (разведение 1:100); контроль – клетки без добавления исследуемых субстанций), и далее клетки культивировали в тех же условиях 48 часов [67]. Для каждого разведения экстрактов эксперименты выполняли трехкратно. Число экспериментов – 5 (в разное время использовано 5 образцов клеточной культуры).

Результаты оценки жизнеспособности изолированных альвеолярных макрофагов в условиях *in vitro* в присутствии в питательной среде экстрактов клюквы, черники и брусники представлены в таблицах 10 и 11.

Таблица 10 – Жизнеспособность изолированных альвеолярных макрофагов кролика в присутствии экстрактов клюквы, брусники, черники (n = 5)

Исследуемые экстракты	Показатель жизнеспособности (% от 100 % контроля, Ме [Q1;Q3])	
	Разведение 1:100	Разведение 1:10
Экстракт ягод клюквы	98,5 [80,6;100,9]	112,0 [102,2;139,7]
Экстракт ягод брусники	88,5 [67,3;101,9]	103,4 [91,2; 121,5]
Экстракт ягод черники	95,1 [70,0;116,2]	115,2 [108,3;129,1]

Таблица 11 – Влияние экстрактов плодов клюквы, брусники, черники на жизнеспособность альвеолярных макрофагов кролика в присутствии доксорубина (n = 5)

Исследуемые субстанции	Показатель жизнеспособности (% от 100 % контроля, Ме [Q1;Q3])
Доксорубин 1 мкг/мл	30,2 [20,3;41,4]
Доксорубин 10 мкг/мл	13,2 [8,2;17,1]
Доксорубин 10 мкг/мл + экстракт клюквы 1:100	90,2 [88,3;111,6]*
Доксорубин 10 мкг/мл + экстракт черники 1:100	92,4 [82,5;100,7]*
Доксорубин 10 мкг/мл + экстракт брусники 1:100	83,7 [65,3;92,0]*

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

В таблице 10 представлены показатели жизнеспособности клеток в % относительно взятой за 100 % жизнеспособности альвеолярных макрофагов кролика в контроле (клетки без добавления экстрактов). Как видно, при внесении в питательную среду исследуемых экстрактов северных ягод в разведении 1:100 жизнеспособность клеток в сравнении с контролем не менялась, цитотоксическое действие отсутствовало. При введении в среду инкубации альвеолярных макрофагов исследуемых экстрактов в разведении 1:10 жизнеспособность клеток достоверно также не менялась, хотя тенденция к повышению присутствовала.

Введение в среду инкубации цитотоксического агента доксорубина, как видно (таблица 11), вызывало резкое снижение показателя жизнеспособности изолированных клеток до уровня 10–40 %, что является свидетельством

цитотоксического эффекта доксорубина. Если же доксорубин вводился в питательную среду сразу после введения исследуемых экстрактов, то, как следует из таблицы 11, снижения жизнеспособности клеток практически не происходило. Данный эффект можно расценивать как цитопротекторный. Существенного различия в цитопротекторном эффекте экстрактов клюквы, черники и брусники в условиях данного эксперимента не обнаружено.

Результаты, полученные в аналогичных условиях эксперимента с использованием перевиваемой клеточной культуры эпителиальных клеток НЕК293, представлены в нижеследующих таблицах (12 и 13).

Таблица 12 – 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]

Таблица 13 – 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 по отношению к значению жизнеспособности в присутствии доксорубина 10 мкг/мл.

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 агента наглядно выявляется в экспериментах с доксорубицином. Доксорубицин 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 [17].

В обоих экспериментах и с первичной культурой клеток, и с перевиваемой культурой клеток при инкубации в течение 2 часов (с первичной культурой клеток) или 48 часов (с перевиваемой культурой клеток) с экстрактами клюквы, брусники, черники выявлена способность экстрактов предупреждать снижение жизнеспособности в присутствии цитотоксического агента. Считаем, что эти результаты позволяют нам предполагать наличие цитопротекторного потенциала у полифенольных экстрактов клюквы, брусники, черники [1,67].

Предполагаем, что входящие в состав экстрактов клюквы, брусники, черники полифенолы (в основном флавоноиды, антоцианы и проантоцианидины) как антиоксиданты способны защищать клетки от оксидативного повреждения, присутствующего в механизме цитотоксичности доксорубицина. Известно, что антрациклиновые антибиотики, к которым относится и доксорубицин, по своим фармакодинамическим параметрам, стимулируют выброс свободных радикалов и инициируют оксидативный стресс в клеточной культуре [141, 144, 277]. Видимо, антиоксидативное действие исследуемых экстрактов проявляется в условиях данного эксперимента в способности нейтрализовать свободные радикалы в клеточной культуре.

В ряде работ [162, 184], предшествующих нашему исследованию, было продемонстрировано антиоксидантное действие отдельных полифенолов или суммарных экстрактов множества темно-окрашенных ягод, включая ягоды черники. Результаты, полученные в условиях нашего эксперимента, отчетливо

коррелируют с вышеприведенными литературными данными.

Предполагаем, что антирадикальный и антиоксидантный эффект полифенолов, содержащихся в экстрактах клюквы, брусники, черники, вероятно, являются механизмом цитопротекторного действия. Мы вполне согласны с мнением K.S. Bhullar и H.P. Rupasinghe [99] в отношении того, что природные антиоксиданты – полифенолы ягод, фруктов и ряда других растений – способны проявлять цитопротективное действие. Таким образом, есть основания считать цитопротекторный эффект частью механизма действия полифенольных экстрактов северных ягод клюквы, брусники, черники.

В экспериментах по выявлению возможности проявления противовоспалительного эффекта в культуре клеток *in vitro* мы использовали клеточную линию мышинных макрофагов RAW 264.7 (ATCC TIB-71, полученную из ATTC (American Type Culture Collection; Livingstone, MT, USA) в Dulbecco's modified Eagle's среде (DMEM, Life Technologies, NY, USA) с добавлением 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10 %-ной фетальной бычьей сыворотки при плотности, не превышающей 5×10^5 клеток/мл выдерживали при 37 °C в инкубаторе с CO₂ (5 %). Клетки высевали в 96-луночный планшет для анализа жизнеспособности. Исследуемые субстанции вносили в питательную в объеме 0,1 мл на лунку. До эксперимента концентрацию полифенолов в экстрактах ягод выравнивали по общему содержанию полифенолов в 10 мкг/мл. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью МТТ-теста ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]) спектрофотометрически при 550 нм.

Количественную ПЦР проводили на аппарате ABI 7500 Fast real time PCR (Life Technologies), используя 1 цикл при 50 °C в течение 2 мин и 1 цикл при 95 °C в течение 10 мин, затем 40 циклов по 15 сек при 95 °C и 1 мин при 60 °C. Экспрессию мРНК анализировали с использованием метода $\Delta\Delta CT$ 7 500 Fast System SDS Software v1.3.0 (Life Technologies). Считали, что значения <1,0 указывают на ингибирование экспрессии генов по сравнению с липополисахаридом (ЛПС), который дает максимальную индукцию (1.0). Таким

образом, более низкие значения свидетельствуют о более высокой противовоспалительной активности. Значения $>1,0$ означают экспрессию определенного гена при избыточной стимуляции ЛПС.

Среди генов макрофагов, участвующих в острой фазе воспалительной реакции и иммунном ответе, выделяют гены, контролирующие продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 [221]. Нами были определены изменения в экспрессии генов путем сравнения количества мРНК при стимуляции клеток бактериальным липополисахаридом (ЛПС) и в присутствии исследуемых экстрактов ягод. Считали, что значение $<1,0$ при внесении в систему инкубации клеток экстрактов ягод указывает на изменение транскрипционной регуляции и ингибирование экспрессии генов по сравнению с вариантом внесения только ЛПС, который дает максимальную генетическую индукцию (1.0). Таким образом, более низкие значения свидетельствуют о более высокой противовоспалительной активности. Дексаметазон в концентрации 10 μ M использовали как положительный контроль. Результаты исследования противовоспалительной активности экстрактов северных ягод приведены в таблицах 14–16.

Таблица 14 – 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, Me [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.

Таблица 15 – 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, Me [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.

Таблица 16 — 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).

Как видно, присутствие экстрактов ягод рода *Vaccinium* в среде культивирования макрофагов на фоне стимуляции ЛПС в условиях нашего

эксперимента проявлялось 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 Сибири. Наибольшую концентрацию полифенольных компонентов определили для экстракта черники. Для всех экстрактов ягод рода *Vaccinium* в экспериментах *in vitro* выявлен антиоксидантный, цитопротекторный и противовоспалительный потенциал, зависимый от концентрации полифенолов.

Результаты нашего исследования клюквы и черники на содержание в них полифенолов, оказывающих влияние на антиоксидантную активность, в целом сопоставимы с результатами исследований этих ягод из региона Аляски [119]. При этом показатели несущественно отличаются 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) [199]. Принято считать, что именно концентрация полифенольных компонентов определяет выраженность антирадикальных, антиоксидантных свойств [180]. Полученные нами данные подтверждают это положение. Дополнительно результаты проведенных нами исследований проявлений цитопротекторного эффекта и возможности экспрессии генов провоспалительных цитокинов позволяют гипотетически распространить зависимость между уровнем полифенолов и величиной как цитопротекторного, так и противовоспалительного потенциала [2, 17].

ГЛАВА 5. ОСНОВНЫЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТОВ КЛЮКВЫ, БРУСНИКИ И ЧЕРНИКИ НА МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

В данной главе работы описываются результаты исследования основных фармакодинамических эффектов экстрактов клюквы, брусники, черники на модели метаболического синдрома. Вероятность влияния исследуемых водно-спиртовых полифенольных экстрактов северных ягод на выраженность проявлений МС оценивалась по изменению некоторых показателей биохимии крови и морфологии тканей.

В качестве объекта исследования была использована патофизиологическая модель МС у крыс, вызванная овариэктомией и специальной углеводно-жировой диетой.

В эксперимент было взято 100 крыс Wistar, самок массой тела 180–200 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария (12-часовые периоды освещенности и темноты) и пищевом режиме, рекомендованном для данного вида животных. Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с международными правилами работы с экспериментальными животными European Communities Council Directive (86/609/EEC) [125]. Контрольную группу составили 10 интактных крыс-самок, находившихся на стандартной диете вивария и не подвергавшихся каким-либо воздействиям. Группу для моделирования МС составили 90 крыс, которым под наркозом (внутрибрюшинно кетамин 8 мг/100 массы) была проведена овариэктомия, а через неделю была назначена диета с повышенным содержанием углеводов и жиров на протяжении 16 недель. В качестве источника избыточного количества углеводов использовали 10 %-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды. В качестве диеты с повышенным содержанием жиров использовали коммерческий вариант корма с повышенным содержанием жиров (El-Gomhoria Company, Cairo). За период наблюдения по случайным причинам из группы интактных животных выбыла 1 крыса, из опытной группы выбыло 4 крысы.

При проверке основных параметров МС (за кардинальные показатели считали триглицеридемию более 100 мг/дл и инсулинорезистентность по AUC более 1 000) оказалось, что 17 животных не соответствуют этим критериям, и они были выведены из эксперимента. Для остальных крыс исследование было продолжено.

В таблице 17 представлены результаты определения метаболических показателей у крыс на фоне моделирования метаболического синдрома.

Таблица 17 – Маркеры ожирения через 8 недель на фоне специальной диеты у овариэктомированных крыс с моделью метаболического синдрома (МС), Me[Q1;Q3]

Показатели	Крысы контрольной группа (n = 8)	Крысы с моделью МС (n = 69)
% набора массы	32,71 [31,69;33,73]	69,44[68,63;70,25]*
Индекс массы тела, г/см ²	0,71 [0,62;0,80]	0,99[0,95;1,03]*
Окружность живота, см	13,5 [13,26;13,74]	31,4 [30,98;31,82]*
Брюшной жир, мг/мм	178,90[163,54;194,26]	488,27[456,85;519,69]*
Периренальный жир, г	3.54 [3,03;4,05]	14.8[13,73;15,87]*
Масса тела, г	285,3 [270,0;300,6]	302,0 [285,0;319,0]

Примечание: * p < 0,05

Как видно из результатов, представленных в таблице 18, параметры, характеризующие жировой метаболизм у крыс, подвергавшихся моделированию, выражены в соответствии с общими представлениями о картине ожирения. Липидный обмен характеризуется выраженными нарушениями, типичными для метаболического синдрома (гипертриглицеридемия), но добавочно присутствует и гиперхолестеринемия (повышение общего холестерина и ЛПНП, снижение ЛПВП). Изменения уровня концентрации билирубина, АЛТ, ЩФ и креатинина свидетельствуют о вероятной жировой дистрофии и стеатозе печени и возможном повреждении функции почек (таблица 19).

Таблица 18 – Биомаркеры липидного обмена через 8 недель на фоне специальной диеты у овариэктомированных крыс с моделью метаболического синдрома (МС), Me[Q1;Q3]

Показатели	Крысы контрольной группа (n = 8)	Крысы с моделью МС (n = 69)
Общий холестерин, мг/дл	95,29 [90,25;92,31]	145,7[143,14;149,26]*
Холестерин ЛПНП, мг/дл	12,48 [9,48;13,48]	40,06[38,95;42,25]*
Холестерин ЛПВП, мг/дл	70,97 [67,08;70,86]	49,34 [46,82;51,86]*
Индекс атерогенности	0,34	1,95
Триглицериды, мг/дл	63,94 [61,55;65,83]	151,6 [149,9;153,3]*

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

Таблица 19 – Биомаркеры общетоксической реакции через 8 недель на фоне специальной диеты у овариэктомированных крыс с моделью метаболического синдрома (МС), Me[Q1;Q3]

Показатели	Крысы контрольной группа (n = 8)	Крысы с моделью МС (n = 69)
Глюкоза, ммоль/л	5,6 [4,9;6,3]	7,80[7, 4;8,2]
Билирубин, мкмоль/л	3,2 [2,5;4,7]	5,8[5,4;6,9]*
АЛТ, ед/л	31 [27; 35]	54 [49; 53]*
ЩФ, ед/л	166 [144;191]	238 [218;339]*
ЛДГ, ед/л	1751 [1498; 2012]	2353 [2072; 2634]*
Мочевина, мМ/л	4,5 [4,3;4,7]	4,8 [4,54;5,1]
Креатинин, мкМ/л	46 [44;48]	64 [60;68]*
Общий белок, г/л	85,4 [84,6;86,2]	83,8 [83,2;84,4]

Примечание: * $p < 0,05$

Тест толерантности к инсулину подтверждает развитие инсулинорезистентности у крыс (таблица 20).

Таблица 20 – Результаты теста толерантности к инсулину (n = 6), Me[Q1;Q3]

Группы экспериментальных животных	AUC
Контроль	838,5 [794,7;882,3]
Опыт	1680,2 [1605,9;1754,5] $p < 0,05$

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

После получения свидетельств формирования метаболического синдрома животных случайным образом делили на следующие группы: группа животных, ежедневно получавших исследуемую субстанцию «экстракт полифенолов клюквы» внутрь по 0,5 мл через катетер – 18 голов; группа животных, получавших исследуемую субстанцию «экстракт полифенолов брусники» внутрь 0,5 мл – 17 голов; группа животных, получавших исследуемую субстанцию «экстракт полифенолов черники» внутрь 0,5 мл – 17 голов; группа животных, получавших ежедневно внутрь 0,5 мл физиологического раствора (плацебо) – 17 голов. Исследуемые препараты вводили в течение двух недель.

Изменения лабораторных показателей и неспецифических общих характеристик, под влиянием введения крысам с МС экстрактов плодов клюквы, брусники, черники в течение 2 недель, представленные в таблицах 21–23, вероятно, могут считаться коррекцией характеристик метаболического синдрома. Результаты воздействия вводимых экстрактов клюквы, брусники и черники на показатели липидного обмена у крыс с метаболическим синдромом представлены в таблице 21.

Таблица 21 – 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: * $p < 0,05$; индекс атерогенности = (общий ХС – ЛПВП)/ЛПВП

В таблице 22 приведены данные по изменению показателей общетоксического действия под влиянием исследуемых экстрактов клюквы, брусники, черники.

Таблица 22 – 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: * $p < 0,05$

В таблице 23 можно видеть, как меняются маркеры, характеризующие собственно ожирение при введении крысам с МС исследуемых экстрактов.

Таблица 23 – Маркеры ожирения 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)
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]

В условиях нашего эксперимента нам не удалось зафиксировать изменение массы тела и массы периренального жира под влиянием исследуемых экстрактов северных ягод, назначаемых внутрь крысам с моделью МС. Достоверно не меняется и уровень концентрации общего холестерина. Однако повышение концентрации холестерина ЛПВП было обнаружено для всех вариантов использования экстрактов клюквы, брусники и черники, а для варианта использования экстракта черники также зафиксировано снижение уровня ЛПНП. 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. Индекс атерогенности снижают все исследованные экстракты ягод рода *Vaccinium*.

Выраженное влияние исследуемых экстрактов на показатели липидного обмена наиболее наглядно проявляется в результатах определения изменений уровня триглицеридов в сыворотке крови. Триглицеридемия, как известно [69], является ключевым звеном развития МС. Снижение уровня триглицеридов в крови крыс с моделью МС под влиянием экстрактов клюквы, брусники и черники, установленное в условиях нашего эксперимента, можно считать кардинальным

признаком вмешательства использованных экстрактов ягод в патофизиологию МС.

Кроме того, как следует из данных таблицы 22, общим эффектом для полифенольных экстрактов клюквы, брусники и черники при развитии метаболического синдрома является снижение уровня активности АЛТ и ЩФ. Если повышение уровня трансаминазы при моделировании МС может быть отражением избыточного цитолиза печеночных клеток, то повышение активности фермента щелочной фосфатазы обычно считается свидетельством повреждения печени, сопровождающегося явлениями холестаза, оба феномена являются типичными проявлениями неалкогольной жировой дистрофии печени, присущими патофизиологии МС [22]. Полученные данные относительно зафиксированного нами снижения уровня АЛТ и ЩФ при применении экстрактов клюквы, брусники и черники позволяют предполагать потенциальный терапевтический эффект экстрактов ягод рода *Vaccinium* в отношении проявлений жировой дистрофии печени при МС.

Наряду с ожирением и нарушениями липидного обмена гипертензия также считается кардинальным признаком МС. Спонтанной гипертензии в условиях избранной нами модели МС нам в полной мере получить не удалось, поэтому был выбран путь дополнительной стимуляции гипертензии. В продолжение эксперимента по моделированию МС у крыс из каждой группы случайным образом выбрали по 8 голов крыс и в течение 10 дней поили их вместо питьевой воды 0,8 %-ным раствором натрия хлорида с целью провокации гипертензивного синдрома [91, 266]. Одновременно крысам продолжали давать экстракты клюквы, брусники и черники. Результаты представлены на рисунке 22.

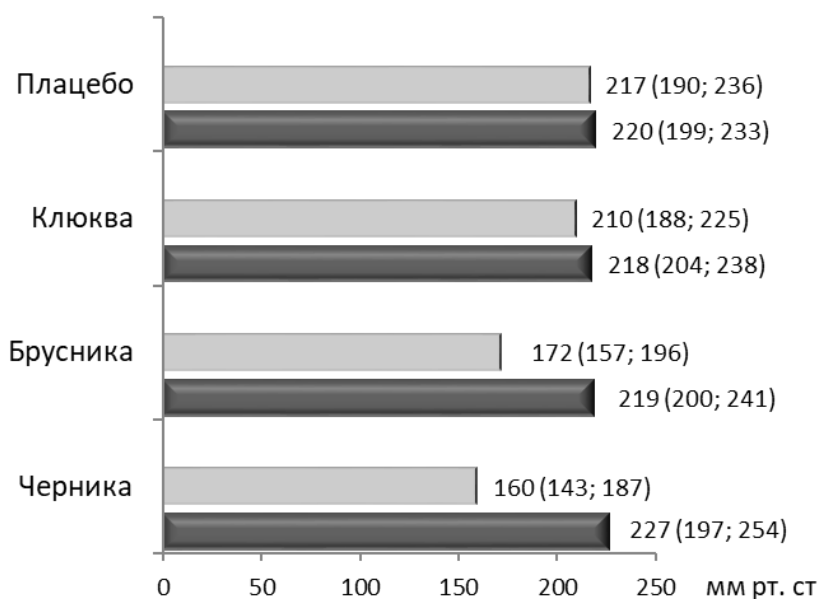


Рисунок 22. Результаты исследования влияния экстрактов черники, брусники и клюквы на систолическое артериальное давление у крыс при моделировании гипертензивного синдрома (n=8)

Примечание: систолическое артериальное давление (мм рт. ст) исходный уровень / уровень через 10 дней на фоне введения исследуемых субстанций – плацебо 220 (199–233) /217 (190–236); экстракт плодов черники 227 (197–254) /160 (143–187); экстракт плодов клюквы 218 (204–238) / 210 (188–225); экстракт плодов брусники 219 (200; 241) / 172 (157; 196).

Как видно из представленных результатов, нагрузка организма животных избытком натрия хлорида, неизбежно приводит к существенному повышению систолического артериального давления. Если же использование натрия хлорида происходит на фоне введения крысам экстрактов клюквы, брусники и черники, то наблюдается меньший рост артериального давления, а в случае экстракта черники и экстракта брусники, снижение уровня систолического артериального давления статистически достоверно.

Полученные данные позволяют предполагать, что экстракты брусники и черники либо препятствуют возникновению гипертензивного синдрома у крыс, провоцируемого избыточным введением натрия хлорида, что более соответствует условиям эксперимента, либо эти экстракты обладают гипотензивным эффектом.

Принято считать, что развитие толерантности к инсулину при метаболическом синдроме также является одним из наиболее важных признаков типичного течения этого синдрома [82]. В условиях модели, воспроизведенной в

нашем эксперименте, при отсутствии выраженного повышения уровня сахара крови инсулинорезистентность была зафиксирована практически у всех животных. После двухнедельного применения экстрактов ягод рода *Vaccinium* выраженность инсулинорезистентности была вновь проверена в тесте толерантности к инсулину, результаты приведены на рисунке 23.

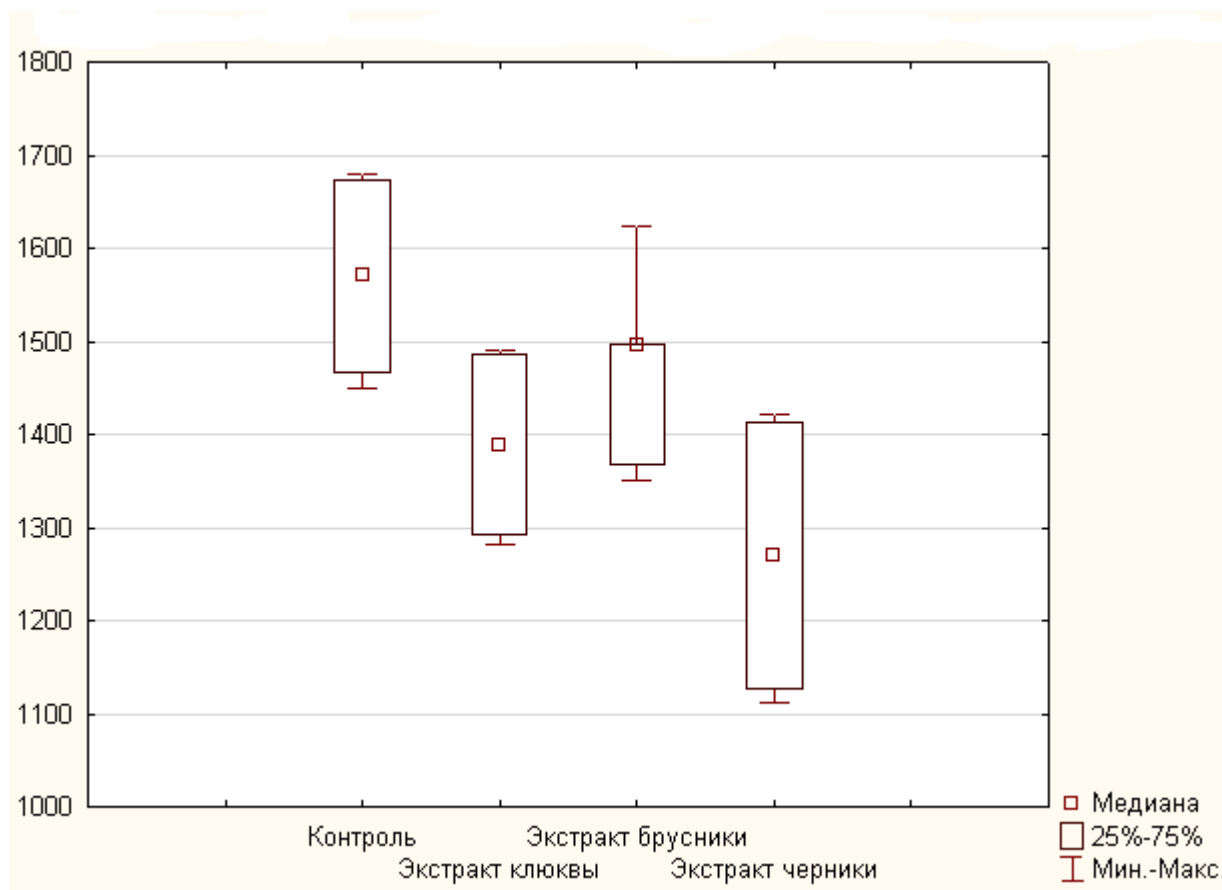


Рисунок 23. Результаты теста толерантности к инсулину у крыс, получавших экстракты ягод рода *Vaccinium* в виде AUC – площадь фармакокинетической под кривой 0–120 мин

Примечание: AUC, Me[Q1;Q3] для контроля (n = 5) составляет 1570,4 [1466,6;1674,2]; для экстракта клюквы (n = 5) 1389,0 [1292,8;1485,2]; для экстракта брусники (n = 5) 1495,9 [1368,5;1623,3]; для экстракта черники (n = 6) 1270,6 [1128,0;1413,2]

Результаты эксперимента свидетельствуют, что при проведении теста на толерантность к инсулину у крыс, которым давали внутрь в течение двух недель экстракты северных ягод, площадь под фармакокинетической кривой глюкозы несколько снизилась по сравнению с вариантом плацебо, но уровень этого снижения статистической достоверности не достигал, нам удалось лишь

зафиксировать тенденцию. При этом норма этого показателя AUC у интактных крыс в условиях нашего эксперимента составляет в среднем $862,5 \pm 80,1$. Можно считать, что полифенольные экстракты в некоторой степени тормозят развитие инсулинорезистентности, но получить эффект торможения этого признака МС в условиях настоящего эксперимента нам не удалось.

Для уточнения возможности влияния экстрактов северных ягод на углеводный обмен эксперимент был продолжен на стандартной модели сформированного сахарного диабета второго типа.

Часть животных с моделью МС получили дважды, через 3 дня, по 45 мг/кг стрептозоцина в 0,2 М растворе натрия фосфата (рН 4,5) [70]. Стрептозоцин вводили крысам после 12-часовой голодовки при свободном доступе к воде. Через 3 дня после последней инъекции стрептозоцина оценивали уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крысы, на приборе для измерения уровня глюкозы крови «Gamma Mini» (Gamma, Великобритания).

Результаты исследования влияния экстрактов черники, брусники и клюквы на содержание глюкозы в крови крыс с экспериментальным стрептозоциновым сахарным диабетом приведены в таблице 24.

Таблица 24 – Уровень глюкозы в крови крыс с экспериментальным стрептозоциновым сахарным диабетом на фоне метаболического синдрома

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

Примечание: * $p < 0,05$, 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 ягод рода *Vaccinium*, уровень глюкозы в крови после введения стрептозоцина не повышался так значительно, как в группе плацебо. Различие с плацебо было статистически достоверно в случаях применения экстракта черники и клюквы.

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

Результаты исследования остеопротекторных свойств концентрата полифенолов черники на модели недостаточности половых гормонов у крыс на фоне метаболического синдрома.

Результаты денситометрии костной ткани бедра крыс на томографе представлены на рисунках 24–26 и в таблице 25.

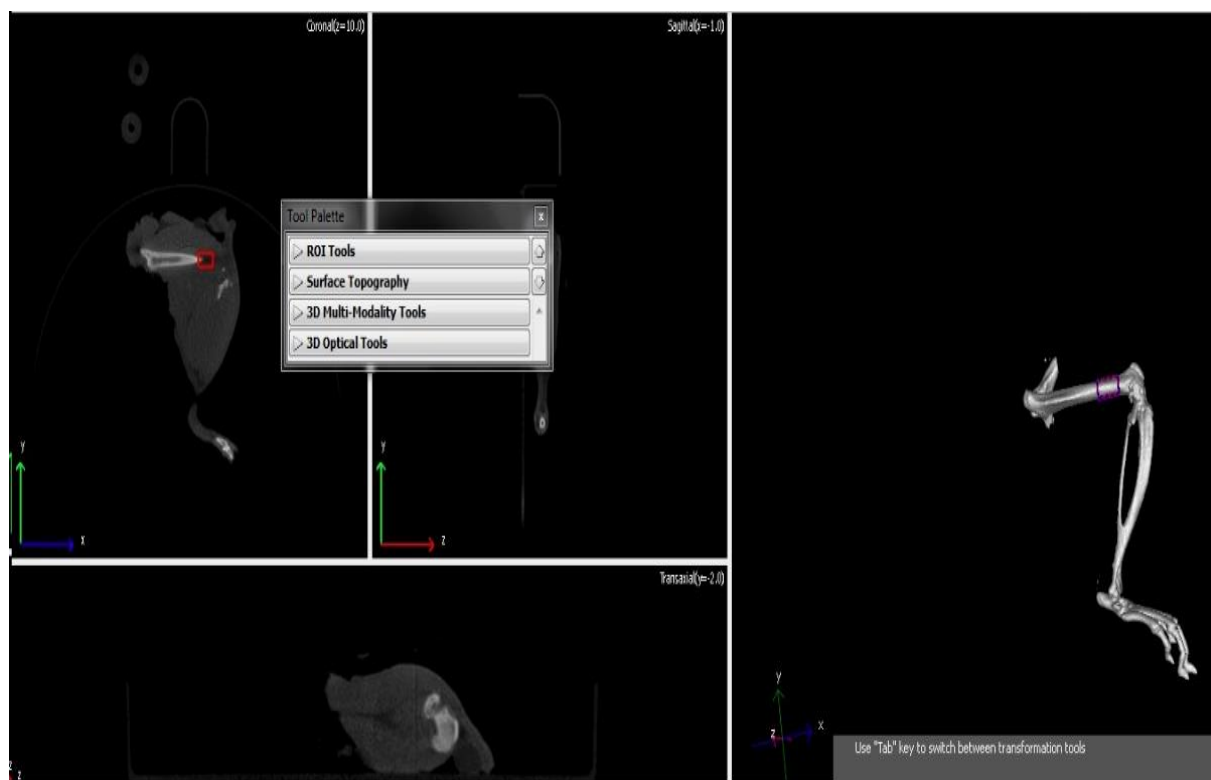


Рисунок 24. Томограмма костной ткани бедра интактной крысы

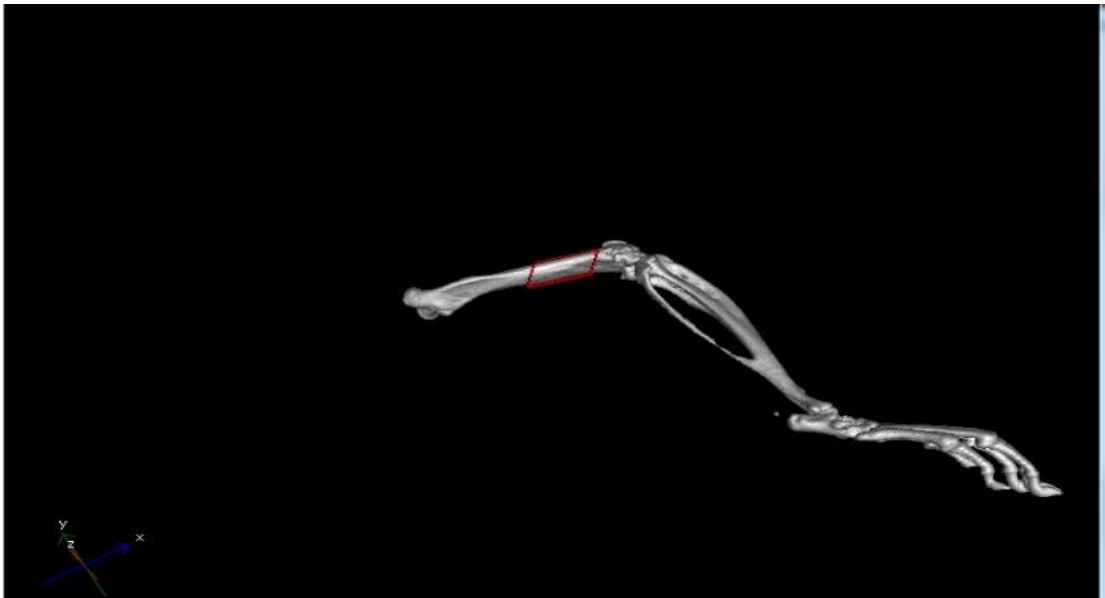


Рисунок 25. Томограмма костной ткани бедра крысы с остеопорозом на фоне метаболического синдрома, получавшей плацебо

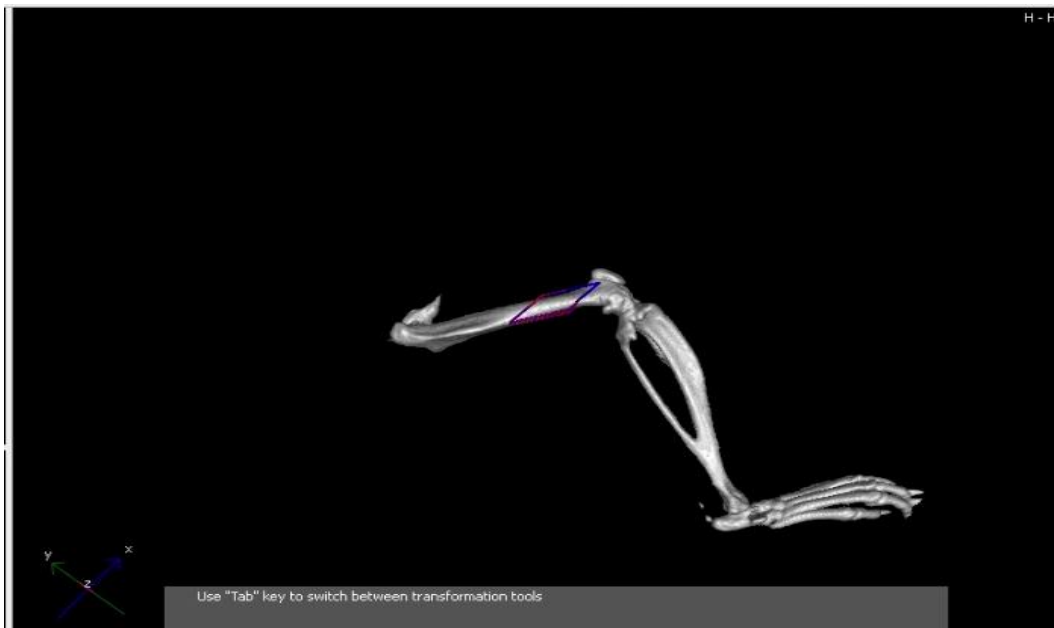


Рисунок 26. Томограмма костной ткани бедра крысы с остеопорозом при введении экстракта плодов черники

Таблица 25 – Изменения плотности костной ткани бедра крысы в условиях модели недостаточности половых гормонов при введении экстракта плодов черники, брусники, клюквы

Группы животных	Средняя плотность костной ткани, hounsfield, Me[Q1;Q3]
Интактные, n = 3	1651 [1603;1699]
Животные с овариэктомией, получавшие плацебо, n = 5	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, приведенных в таблице 25 и на рисунке 25, видно, что на фоне метаболического и посткастрационного синдрома формируется значительно выраженный остеопороз у тех животных, которые получали плацебо. Но двухнедельное применение экстракта черники несколько меняет картину развития остеопороза. В условиях нашего эксперимента статистически достоверно выглядит вариант применения экстракта черники: экстракт черники достоверно 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.

Поскольку в развитии остеопороза свободные радикалы крови имеют немаловажное значение [182, 211], 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 26.

Таблица 26 – Антиоксидантные эффекты экстрактов ягод рода *Vaccinium* в условиях модели недостаточности половых гормонов у крыс

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]
Интактные крысы, n = 3	311 [280;333]*	2636 [2599;2867]*
Крысы с овариэктомией, получавшие плацебо, n = 5	461 [611;522]	1256 [1112;1324]
Крысы с овариэктомией, получавшие экстракт клюквы, n = 6	388 [355;428]*	2480 [2156;2612]*
Крысы с овариэктомией, получавшие экстракт брусники, n = 5	421 [399;435]	2135 [1955;2214]*
Крысы с овариэктомией, 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 высока в группе животных, получавших плацебо. Применение экстрактов северных ягод обеспечивает снижение уровня свободных радикалов в крови крыс, достоверное в случае с экстрактами клюквы и черники и статистически недостоверное снижение АФК при использовании экстракта брусники.

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 ягод рода *Vaccinium*, степень снижения уровня антиоксидантных ферментов не столь велика, как в группе плацебо. Экстракты клюквы, брусники и черники при применении у крыс на фоне остеопороза и МС обеспечивают повышение уровня антиоксидантного потенциала, практически до нормы увеличивает потенциал антиоксидантной активности экстракт черники.

В результате биохимических исследований крови крыс с моделью МС нам удалось зафиксировать изменения липидного и углеводного обмена, а также определить вероятность коррекции уровня артериального давления и плотности костной ткани при введении экспериментальным животным полифенольных экстрактов северных ягод.

Результаты морфологических исследований, проведенных нами, были документировали предполагаемые изменения, развивающиеся под влиянием применения полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium* в тканях экспериментальных животных. Ниже приведены микрофотографии тканей крыс из группы, в которой животным в течение 2 недель вводили экстракты ягод клюквы, брусники, черники в сравнении с группой крыс, получавших плацебо.

Морфология костной ткани. Остеопороз гистологически подтвержден у всех крыс после овариэктомии с метаболическим синдромом, получавших плацебо (рисунки 27, 28). Доказательством является истончение решетчатой сети трабекул и микроперфорация костных пластинок. Можно видеть, что сеть трабекул местами прервана, горизонтальные трабекулы не просматриваются. Кроме того, в отдельных гистологических препаратах были найдены микропереломы костных трабекул. В сосудах среднего и мелкого калибра отмечаются артериальное, венозное полнокровие и умеренная пролиферация эндотелия. Определяются клеточные элементы костной ткани с уменьшением остеобластов и остеоцитов и увеличением остеокластов. Таким образом, у самок крыс развиваются явные признаки системного остеопороза, который характеризуется истончением костных трабекул и даже их исчезновением либо появлением микропереломов костных трабекул. Кроме того, у крыс на фоне остеопороза происходят нарушения эндотелия сосудов, повреждается микроциркуляторное русло костной ткани, свидетельством чего является умеренная пролиферация эндотелия.

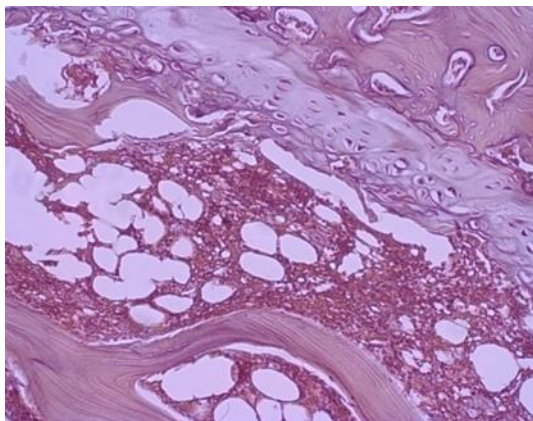


Рисунок 27. Костная ткань при МС (плацебо). Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

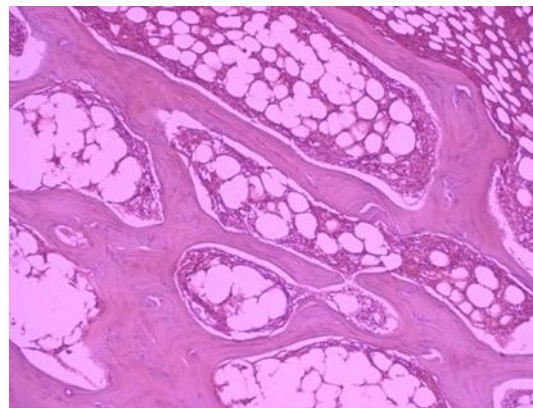


Рисунок 28. Костная ткань при МС (плацебо). Окраска гематоксилин/эозин. $\times 100$

Ниже приведены фотографии микроскопического исследования костной ткани крыс, которым вводили экстракт черники (рисунки 29–32). Экстракт черники в дозе 0,5 мл ежедневно, как можно судить по гистологии, обладает некоторыми эндотелиопротективными свойствами, что проявляется в сохранении средней ширины трабекул в костной ткани. При морфологическом сравнении с контролем отмечаются утолщение ширины трабекул в костной ткани в 1,5 раза, пролиферация эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла, усиление компенсаторно-приспособительных процессов (рисунки 29, 30). Определяются клеточные элементы костной ткани: остеобласты, остециты, остеокласты (рисунки 31, 32). Таким образом, в сравнении с контрольной группой отмечается остеопротективное действие экстракта плодов черники на костную ткань и усиление компенсаторно-приспособительных процессов. К этому же можно отнести и наблюдаемое сохранение функции эндотелия сосудов, питающих кость, а также удержание уровня микроциркуляции в кости. Вероятно, все эти процессы сдерживают развитие остеопороза.

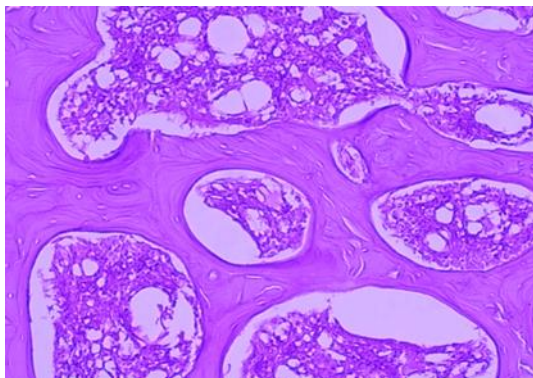


Рисунок 29. Костная ткань при МС (применение экстракта плодов черники). Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

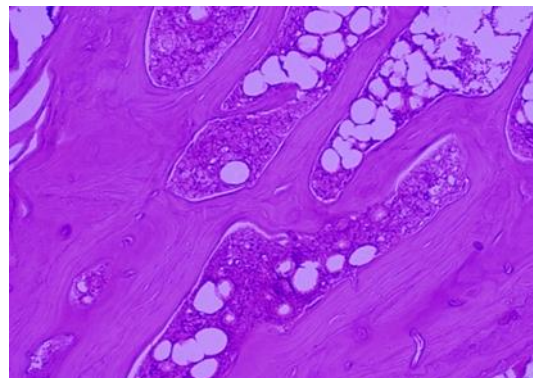


Рисунок 30. Костная ткань при МС (применение экстракта плодов черники). Окраска гематоксилин/эозин. $\times 100$

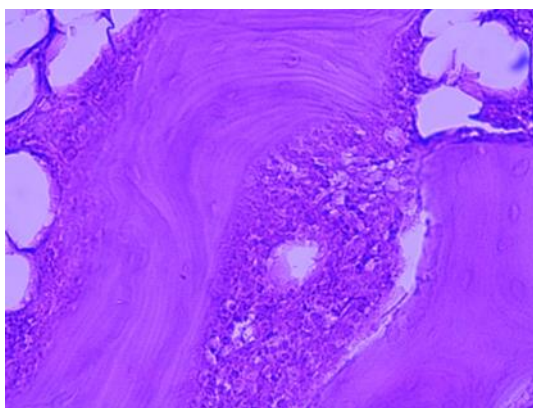


Рисунок 31. Костная ткань при МС (применение экстракта плодов черники). Окраска гематоксилин/эозин. $\times 400$

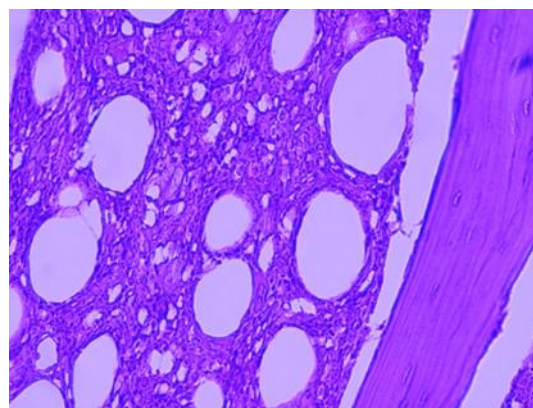


Рисунок 32. Костная ткань при МС (применение экстракта плодов черники). Окраска гематоксилин/эозин. $\times 400$

Ткань миокарда. Как видно структура ткани миокарда у крыс с моделью МС грубо не нарушена. На некоторых участках можно фиксировать межмышечный отек. Часть кардиомиоцитов увеличена в размерах, но при этом сохраняется нормальное ядерно-плазматическое соотношение. Сосуды, которые просматриваются в межуточной ткани, выглядят полнокровными. Отмечается сохраненная поперечнополосатая исчерченность кардиомиоцитов, но в межуточной ткани находятся крупноочаговые зоны кровоизлияния (рисунки 33, 34).

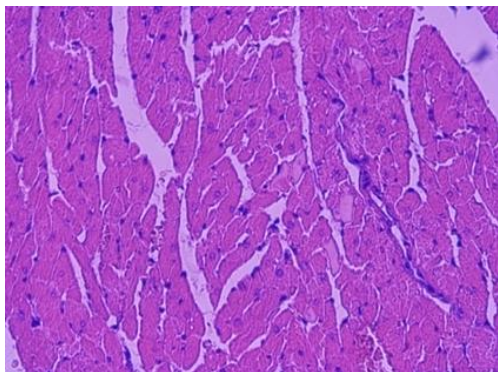


Рисунок 33. Ткань миокарда при МС (плацебо). Умеренный межуточный отек, белково-глиалиновая дистрофия кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 400$

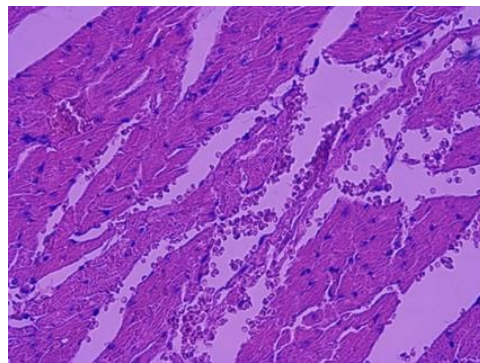


Рисунок 34. Ткань миокарда при МС (плацебо). Поперечнополосатая исчерченность кардиомиоцитов сохранена, отек стромы, скопление эритроцитов. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 400$

На срезах миокарда у крыс, которые получали экстракт плодов черники, по сравнению с группой плацебо видно меньшее количество полнокровных сосудов, полностью отсутствуют зоны кровоизлияния, т.е., реологии крови не нарушена. В препаратах при сравнении с контролем виден лишь небольшой отек интерстиция, не просматриваются признаки дистрофии кардиомиоцитов и, наоборот, можно отметить признаки компенсаторных процессов, в частности, повышение количества гипертрофированных кардиомиоцитов (рисунки 35, 36).

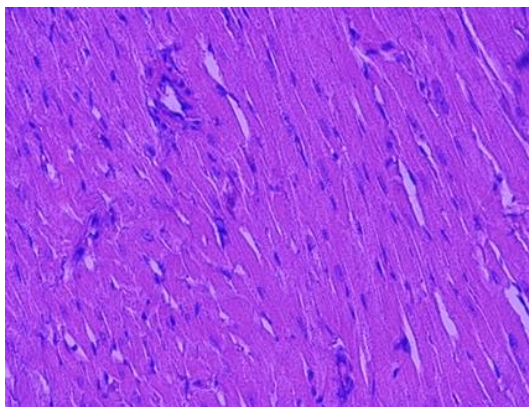


Рисунок 35. Ткань миокарда при МС (применение экстракта плодов черники). Умеренная гипертрофия кардиомиоцитов. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 400$

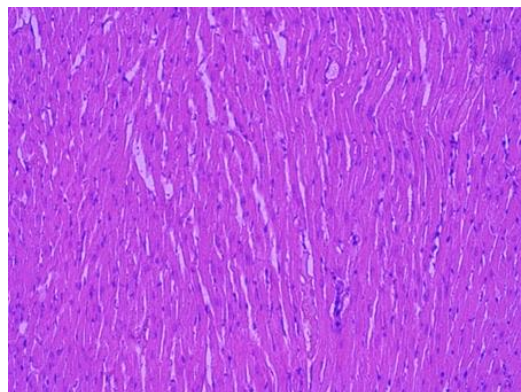


Рисунок 36. Ткань миокарда при МС (применение экстракта плодов черники). Незначительный отек межуточной ткани. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

Образец ткани миокарда крыс, получавших экстракт клюквы, в сравнении с группой крыс, получавших плацебо, изменен не принципиально, сохраняется разволокнение и отек стенки сосудов межучточной ткани, выраженное полнокровие и наличие белков плазмы крови. Отмечается незначительное уменьшение гипертрофированных кардиомиоцитов (рисунок 37).

При исследовании образцов тканей миокарда у крыс, получавших экстракт брусники, выявлено, что в ткани миокарда определяются межмышечный отек, полнокровие сосудов, белковая гиалиново-капельная дистрофия миоцитов, а также резко выраженное полнокровие и участки кровоизлияния (рисунок 38).

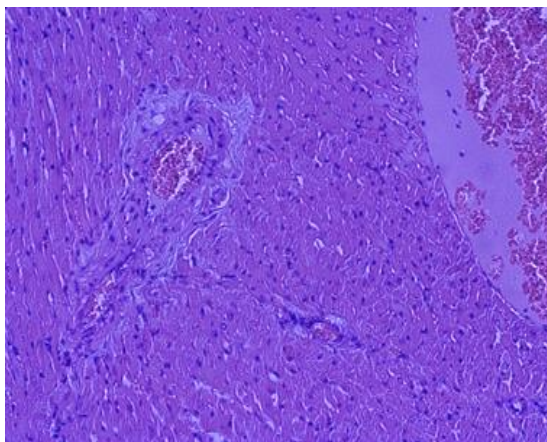


Рисунок 37. Ткань миокарда при МС (применение экстракта плодов клюквы). Разволокнение и отек стенки сосудов межучточной ткани, выраженное полнокровие и наличие белков плазмы крови. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

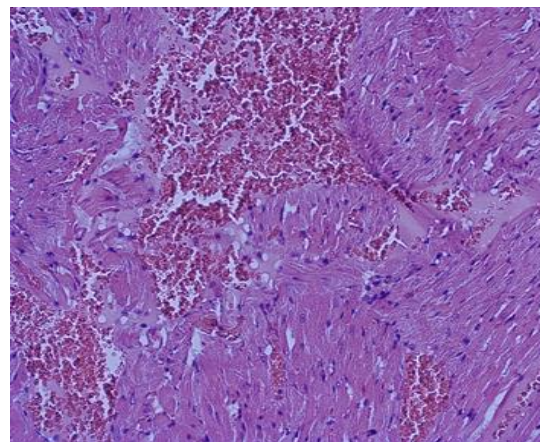


Рисунок 38. Ткань миокарда при МС (применение экстракта плодов брусники). Резко выраженное полнокровие и участки кровоизлияния. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

Ткань печени. На гистологических препаратах в группе крыс с моделью МС радиарная структура ткани сохранена, но портальные тракты фиброзированы, в них видны расширенные сосуды и желчные протоки. В каждом препарате просматриваются по 6–8 желчных протоков среднего и мелкого калибра. На микропрепаратах можно наблюдать гепатоциты в состоянии дистрофии, как белковой гиалиново-капельной, так и мелкокапельной жировой. Некоторые печеночные клетки имеют увеличенные ядра, некоторые из них не прокрашиваются. В цитоплазме печеночных клеток виден желчный пигмент

светло-коричневого цвета. Почти все сосуды портальных трактов и синусоиды расширены. Пролиферирующие звездчатые ретикулоэндотелиоциты видны по всему полю (рисунки 39, 40).

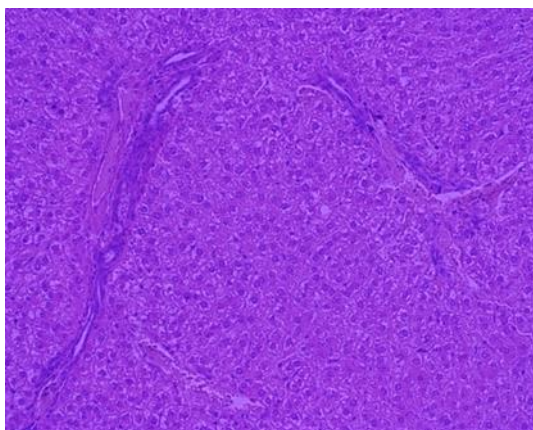


Рисунок 39. Ткань печени при МС (плацебо). Выраженная дистрофия гепатоцитов, полнокровие сосудов портального тракта и желчных протоков. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

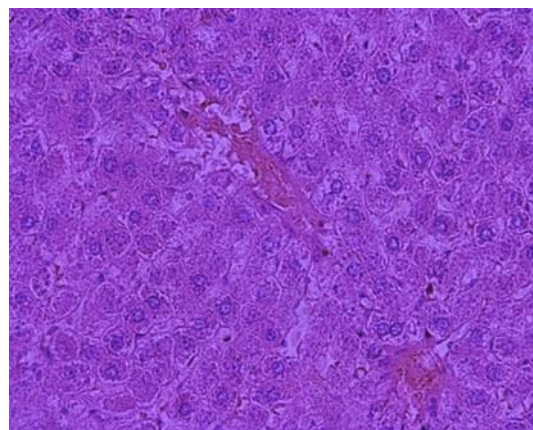


Рисунок 40. Ткань печени при МС (плацебо). Внутриклеточный холестаз, умеренно пролиферирующие клетки Купфера с желчным пигментом в просвете. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 400$

На гистологических препаратах, полученных у крыс с моделью МС, которым вводили экстракт черники, в целом, структура печени сохранена, хотя в фиброзированных портальных трактах можно видеть расширенные сосуды и желчные протоки. Максимальное количество пролиферирующих желчных протоков в портальном тракте доходит до 4–5. По сравнению с контрольной группой крыс можно видеть существенно меньшее количество признаков белковой гиалиново-капельной дистрофии. Большая часть печеночных клеток имеет увеличенные ядра. В сравнении с группой контроля в ткани печени уже нет признаков нарушения холестаза. Однако на срезах ткани продолжают оставаться изменения, указывающие на остаточные дистрофические изменения в гепатоцитах. Усиление компенсаторно-приспособительных процессов, отражает наблюдаемые признаки гипертрофии клеток и внутриклеточных структур, в отдельных участках можно видеть звездчатые ретикулоэндотелиоциты в гипертрофированном состоянии (рисунки 41, 42).

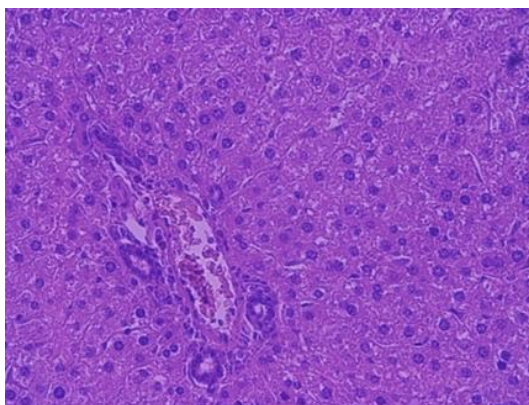


Рисунок 41. Ткань печени при МС (применение экстракта черники). Гиалиново-капельная дистрофия гепатоцитов, умеренная пролиферация желчных протоков. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

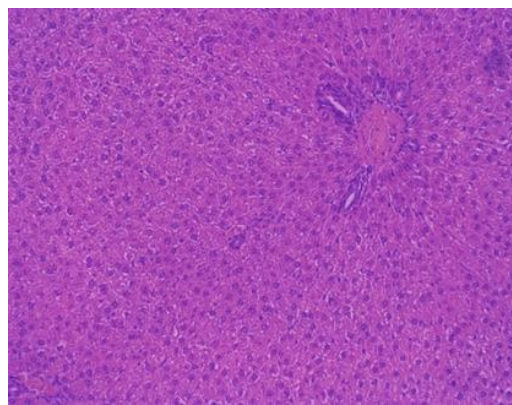


Рисунок 42. Ткань печени при МС (применение экстракта черники). Полнокровные сосуды портальных трактов. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

При исследовании образцов ткани печени крыс, получавших в течение двух недель экстракт брусники, отмечается умеренный фиброз портальных трактов, пролиферация желчных протоков, белковая гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Нарушение реологии крови в виде отмежевания эритроцитов и белков плазмы крови в сосудах венозного типа портального тракта (рисунки 43, 44).

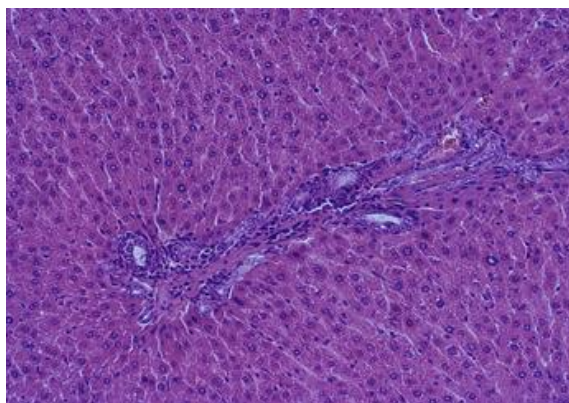


Рисунок 43. Ткань печени при МС (применение экстракта брусники). Умеренный фиброз портальных трактов, пролиферация желчных протоков, белковая гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

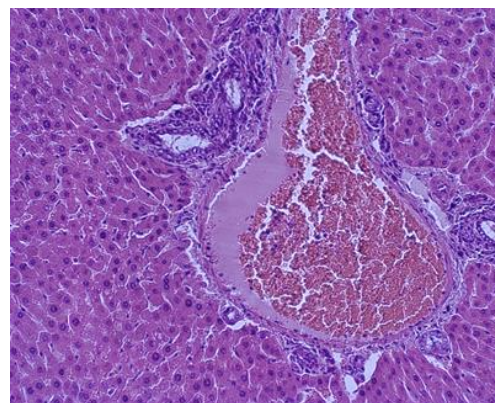


Рисунок 44. Ткань печени при МС (применение экстракта брусники). Нарушение реологии крови в виде отмежевания эритроцитов и белков плазмы крови в сосудах венозного типа портального тракта. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

При использовании экстракта клюквы в ткани печени, так же, как и в случае использования плацебо находятся признаки дистрофии гепатоцитов по белково-гиалиново-капельному типу. Сосуды межуточной ткани продолжают оставаться полнокровными, есть умеренная воспалительная инфильтрация в строме из лимфоцитов и гистиоцитов (рисунки 45, 46).

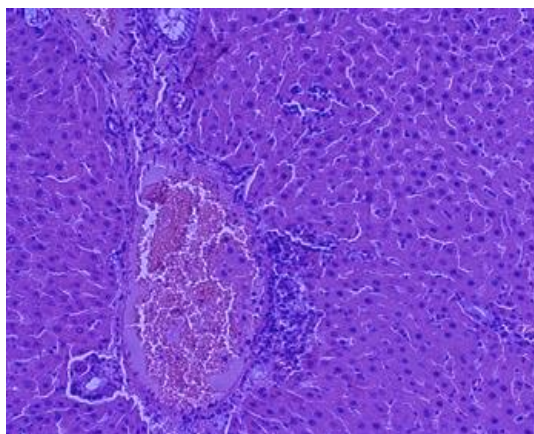


Рисунок 45. Ткань печени при МС (применение экстракта клюквы). Выраженное полнокровие сосудов межуточной ткани, отмежевание белков плазмы крови, умеренная воспалительная инфильтрация в строме из лимфоцитов и гистиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

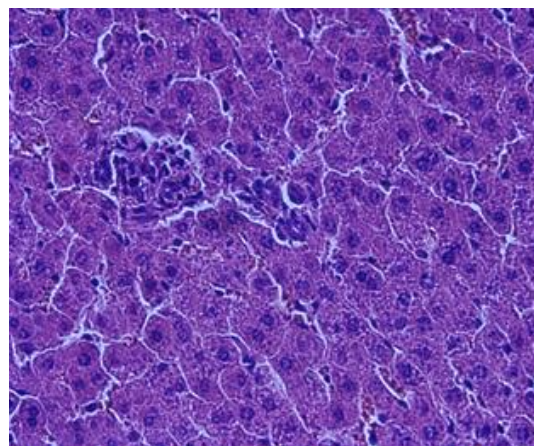


Рисунок 46. Ткань печени при МС (применение экстракта клюквы). Умеренное полнокровие синусоидов, белковая гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

Жировая ткань. Определяется скопление жировых вакуолей, окрашенных в розово-фиолетовый цвет во всех образцах жировой ткани. Строма жировой ткани отечна, есть признаки умеренного фиброза. В строме ткани видны полнокровные кровеносные сосуды (рисунки 47, 48).

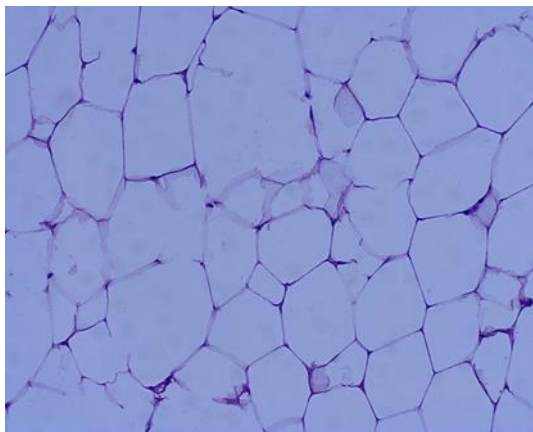


Рисунок 47. Жировая ткань при МС (плацебо). Крупные жировые вакуоли, разделенные соединительнотканными прослойками. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

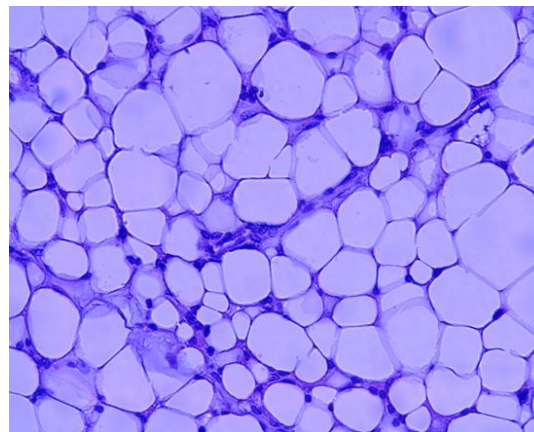


Рисунок 48. Жировая ткань при МС (плацебо). Крупно- и среднекапельные жировые вакуоли с ядром на периферии, строма очагово фиброзирована. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

У крыс, которые получали экстракт черники, морфология жировой ткани выглядит иначе, чем у контрольных крыс. Количество крупно- и среднекапельных жировых вакуолей заметно уменьшено, отмечается лишь незначительный отек стромы (рисунки 49, 50).

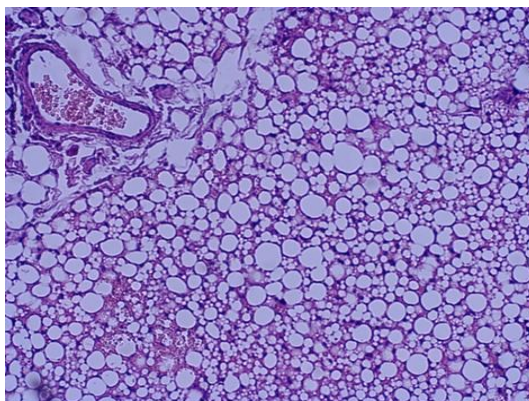


Рисунок 49. Жировая ткань при МС (применение экстракта черники). Жировые вакуоли, полнокровие сосудов умеренной степени. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

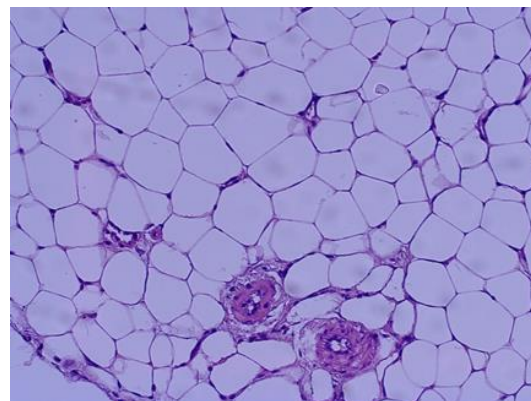


Рисунок 50. Жировая ткань при МС (применение экстракта черники). Единичные эритроциты в жировой ткани. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

При применении экстракта клюквы в жировой ткани были зафиксированы очагово крупнокапельные и диффузно мелкокапельные жировые вакуоли. Ядра расположены на периферии вакуолей (рисунки 51, 52).

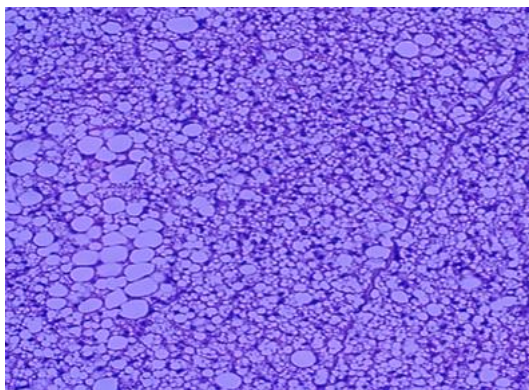


Рисунок 51. Жировая ткань при МС (применение экстракта плодов клюквы). Очагово крупнокапельные жировые вакуоли и диффузно мелкокапельные жировые вакуоли. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

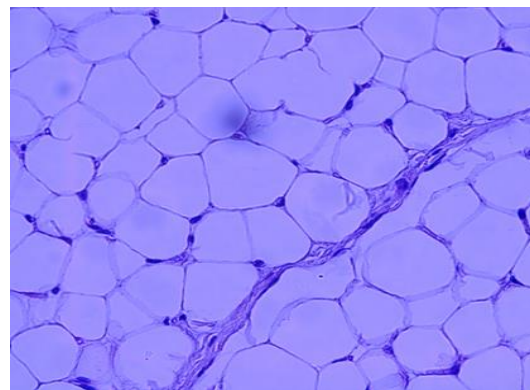


Рисунок 52. Жировая ткань при МС (применение экстракта плодов клюквы). Крупнокапельные жировые вакуоли. Ядра расположены на периферии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

Применение экстракта брусники также не принципиально меняло морфологическую картину жировой ткани. В препаратах преобладали крупно-, средне- и мелкокапельные жировые вакуоли. Были видны очаговый фиброз стромы, участки кровоизлияния. Присутствовали крупно- и среднекапельные жировые вакуоли с изменением их формы, большое количество сосудов межуточной ткани с признаками полнокровия (рисунки 53, 54).

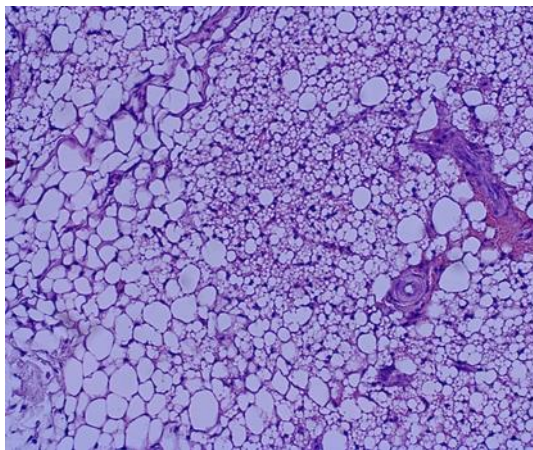


Рисунок 53. Жировая ткань при МС (применение экстракта брусники). Крупно-, средне- и мелкокапельные жировые вакуоли. Очаговый фиброз стромы, участки кровоизлияния. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

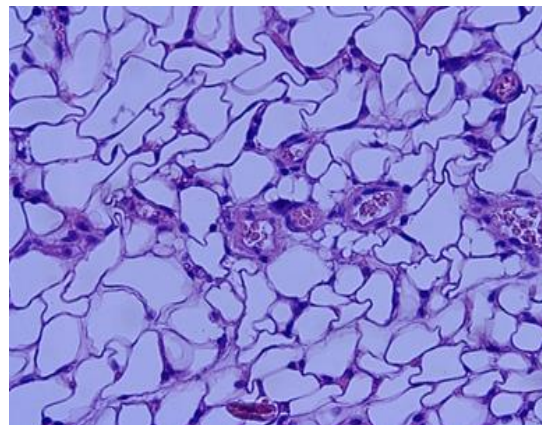


Рисунок 54. Жировая ткань при МС (применение экстракта брусники). Крупно- и среднекапельные жировые вакуоли с изменением их формы, большое количество сосудов межуточной ткани с признаками полнокровия. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

Ткань почек. В образцах ткани почек у крыс с моделью МС (контрольная группы) корковый и мозговой слои почек отчетливо видимы. Но в корковом слое видны как сосудистые клубочки с выраженной мезангиальной пролиферацией, так и сосудистые клубочки уменьшенного размера. Просматриваются сосудистые клубочки с расщеплением базальной мембраны. Отчетливо видно полнокровие сосудистых петель. В препаратах присутствуют признаки лимфогистиоцитарной инфильтрации. В некоторых дистальных канальцах виден эпителий с выраженной инфильтрацией, эпителий сплошь набухший, можно предполагать, что это связано с присутствием гликогена. Эпителиальные клетки проксимальных и дистальных канальцев имеют признаки дистрофии, различного типа – белковой гиалиново-капельной, гидропической, жировой, повсеместно – признаки отека эпителия. В нескольких местах в просвете канальцев видны белковые массы. На всех препаратах – полнокровие сосудов межуточной ткани, а также отек стромы (рисунки 55, 56).

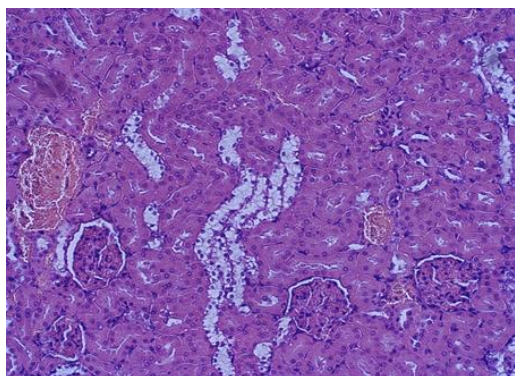


Рисунок 55. Ткань почки при МС (плацебо). Лобулярность сосудистых петель клубочков. В эпителии проксимальных канальцев признаки белковой дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

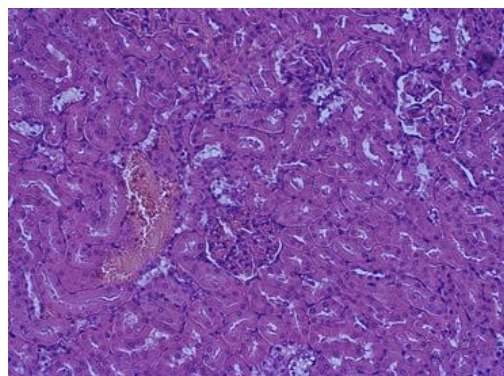


Рисунок 56. Ткань почки при МС (плацебо). Межуточная ткань избыточно полнокровна, сосуды расширены. В просвете проксимальных канальцев белковые массы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

На гистологических препаратах почек крыс, получавших экстракт черники в сравнении с контрольной группой, наблюдается существенная динамика морфологической картины. Большинство морфологических признаков повреждения отсутствует, остаются в небольшом количестве полнокровные сосудистые петли клубочков и определяется некоторая мезангиальная пролиферация и воспалительная лимфогистиоцитарная инфильтрация. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев имеет незначительные проявления дистрофических изменений (рисунки 57, 58).

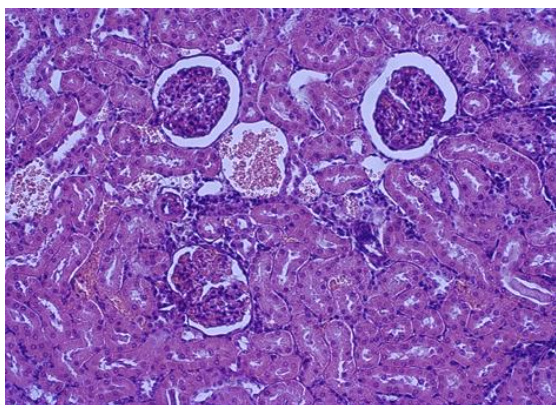


Рисунок 57. Ткань почки при МС (применение экстракта плодов черники). Сосудистые петли клубочков умеренно расширены. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

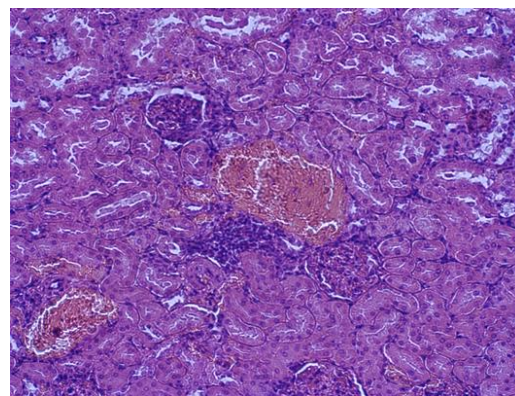


Рисунок 58. Ткань почки при МС (применение экстракта плодов черники). Воспалительная инфильтрация межуточной ткани частично сохраняется. Эпителий канальцев имеет признаки дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Экстракт клюквы менял морфологическую картину в несколько меньшей степени. В сравнении с группой плацебо сохраняются лобулярность сосудистых петель клубочков, гиалиново-капельная дистрофия эпителия проксимальных канальцев, очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация в межуточной ткани. Отмечается значительная воспалительная лимфогистиоцитарная инфильтрация вокруг клубочков, а также в интерстициальной ткани. Полнокровие сосудистых петель клубочков. Эпителий дистальных канальцев – с выраженной белковой гиалиново-капельной и гидропической дистрофией. В прилежащей ткани – выраженная воспалительная инфильтрация (рисунок 59, 60).

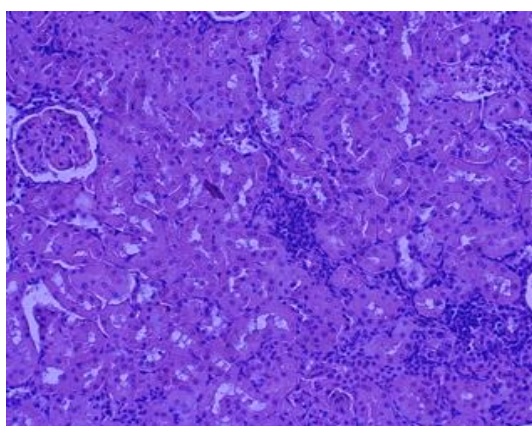


Рисунок 59. Ткань почки при МС (применение экстракта клюквы). Лобулярность сосудистых петель клубочков, гиалиново-капельная дистрофия эпителия проксимальных канальцев, очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

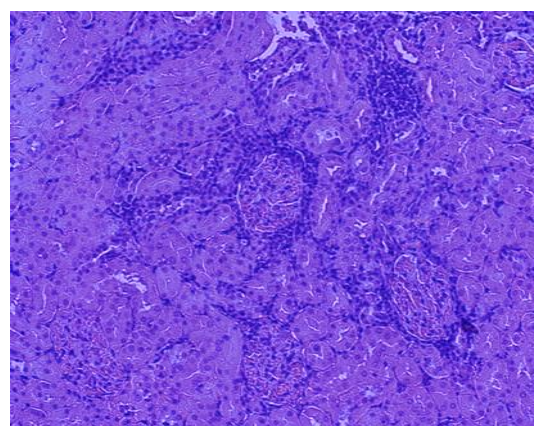


Рисунок 60. Ткань почки при МС (применение экстракта клюквы). Воспалительная лимфогистиоцитарная инфильтрация вокруг клубочков, а также в интерстициальной ткани. Полнокровие сосудистых петель клубочков. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

При исследовании результатов влияния введения экстракта брусники на морфологические признаки метаболического синдрома найдена выраженная гидропическая дистрофия, скопление гликогена в дистальных канальцах. Лобулярность сосудистых петель клубочков, полнокровие сосудов, участки кровоизлияния (рисунки 61, 62).

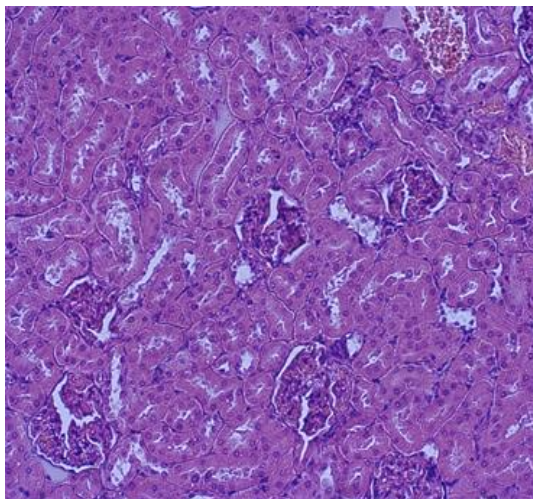


Рисунок 61. Ткань почки при МС (применение экстракта брусники). Лобулярность сосудистых петель клубочков, полнокровие сосудов, участки кровоизлияния. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

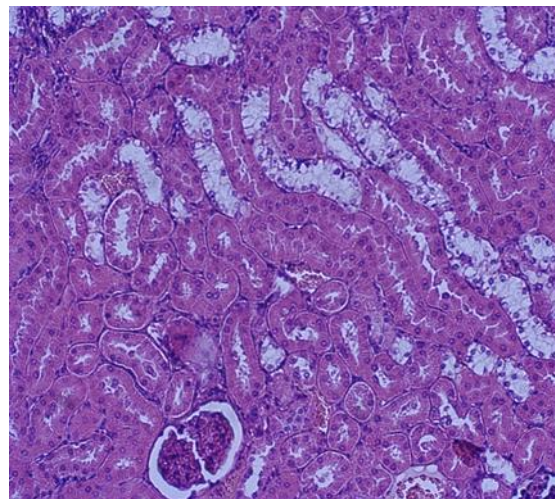


Рисунок 62. Ткань почки при МС (применение экстракта брусники). Выраженная гидропическая дистрофия проксимальных и дистальных канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Поджелудочная железа. Морфологическая картина срезов ткани поджелудочной железы крыс с моделью МС, характеризуется атрофией клеток на фоне избыточного развития межуточной соединительной ткани, имеются признаки гиалиноза и склероза стенок кровеносных сосудов. По всему препарату есть зоны дистрофии, захватывающие островковый аппарат. Островки Лангерганса уменьшены в количестве. Ацинарная структура прослеживается, но просматриваются отдельные эпителиоциты с признаками дистрофических повреждений (рисунок 63).

При введении крысам с МС экстракта черники морфология ткани поджелудочной железы характеризуется лишь признаками некоторого полнокровия межуточной ткани и остаточными явлениями жировой дистрофии. Ацинарные структуры остаются сохранными (рисунок 64).

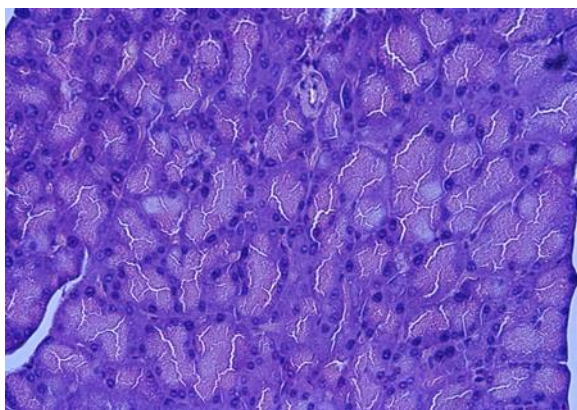


Рисунок 63. Поджелудочная железа при МС (плацебо). Ацинарная структура сохранена. Белковая гиалиново-капельная дистрофия эпителиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. x Увеличение $\times 400$

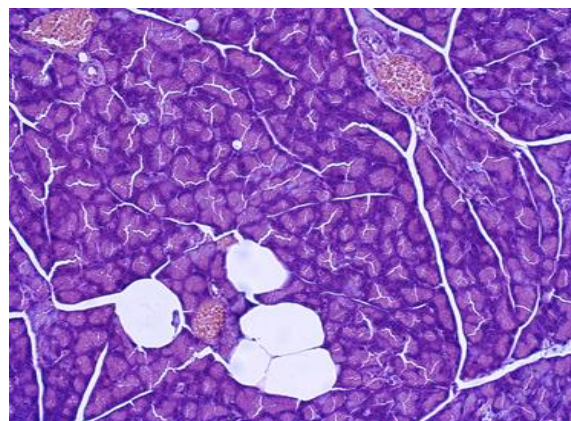


Рисунок 64. Поджелудочная железа при МС (применение экстракта черники). Очаговая крупнокапельная жировая дистрофия. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$

Введение крысам экстракта брусники морфологически проявлялось в присутствии очаговых крупно- и среднекапельных жировых вакуолей в паренхиме, отеке межуточной ткани. Белковая гиалиново-капельная и единичная гидропическая дистрофия эпителиоцитов ацинарных структур (рисунок 65).

В случае применения экстракта клюквы морфологическое исследование выявило полнокровие сосудов межуточной ткани, отмечается единичная крупнокапельная дистрофия паренхимы, умеренная дистрофия ацинарных структур (рисунок 66).

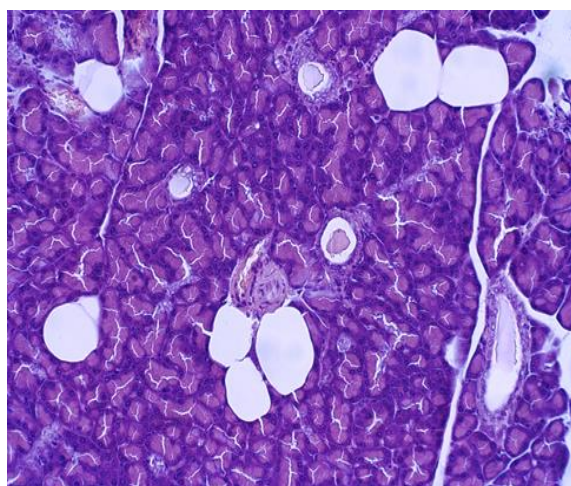


Рисунок 65. Поджелудочная железа при МС (применение экстракта брусники). Жировые вакуоли в паренхиме, признаки отека ткани. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

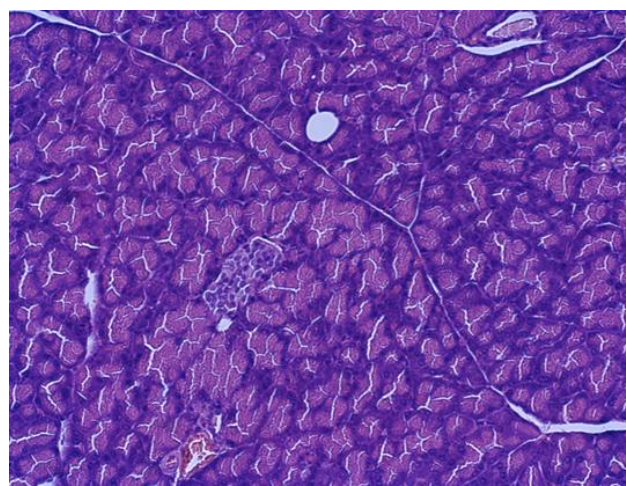


Рисунок 66. Поджелудочная железа при МС (применение экстракта клюквы). Единичная крупнокапельная жировая дистрофия. Окраска гематоксилин/эозин. $\times 200$

Анализ морфологических признаков воздействия исследуемых экстрактов ягод рода *Vaccinium* на организм крыс с моделью метаболического синдрома, приведенный в данном фрагменте исследования, позволяет подытожить полученные данные следующим образом.

Использование экстракта ягод черники у крыс с метаболическим синдромом вызывает ряд следующих признаков:

а) в ткани сердца отмечается значительное улучшение морфологических процессов, что выражается в уменьшении отека межуточной ткани, реологических процессов микроциркуляторного русла, исчезновении зон кровоизлияний, значительном уменьшении признаков дистрофических процессов;

б) морфологическая картина улучшается в печеночных дольках. Так, определяются лишь гепатоциты с признаками гиалиново-капельной дистрофии и умеренным полнокровием сосудов портальных трактов, другие морфологические признаки гепатоза нивелируются. Типичные для морфологической картины МС признаки в виде венозного застоя и холестаза практически исчезают или минимизируются. Проявления дистрофического процесса в гепатоцитах продолжают прослеживаться, но их интенсивность снижается. Компенсаторно-приспособительные процессы гепатоцитов и внутриклеточных структур выражены в полной мере;

в) некоторое улучшение морфологических процессов отмечено на срезах ткани почек, хотя сохраняются признаки мезангиальной пролиферации, остаются признаки полнокровия сосудов и некоторые признаки инфильтрации межуточной ткани. Нет гидропической дистрофии дистальных канальцев;

г) в ткани поджелудочной железы экстракт черники модифицирует морфологию, остаются лишь единичные признаки крупнокапельной дистрофии паренхимы и умеренная дистрофия ацинарных структур;

д) при применении экстракта черники выявляются признаки некоторого восстановления морфологических нарушений, типичных для метаболического синдрома. Так, на фоне средне- и мелкокапельных жировых вакуолей, часть из которых – со светлой цитоплазмой, часть – с темной фиолетовой цитоплазмой,

представленной мелкими каплями жира, видны крупные жировые вакуоли без разрывов соединительнотканых структур;

е) зафиксировано остеопротективное действие на костную ткань и усиление компенсаторно-приспособительных процессов. Морфологическая картина отражает развитие процессов костного ремоделирования.

Результаты введения экстракта ягод клюквы крысам с метаболическим синдромом при морфологическом исследовании проявляются следующим образом:

а) в ткани сердца – незначительным уменьшением числа гипертрофированных кардиомиоцитов. Однако при этом сохраняется разволокнение стенки сосудов и отек, в межуточной ткани присутствуют белки плазмы крови;

б) в ткани печени – снижением проявлений фиброза и уменьшением пролиферации желчных протоков. При этом сохраняются признаки дистрофических изменений в гепатоцитах;

в) в ткани почек при использовании экстракта клюквы изменения морфологии незначительны: сохраняется лобулярность сосудистых петель клубочков, гиалиново-капельная дистрофия эпителия проксимальных канальцев, очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация в межуточной ткани, значительная воспалительная лимфогистиоцитарная инфильтрация вокруг клубочков, а также в интерстициальной ткани, полнокровие сосудистых петель клубочков;

г) морфологическая картина ткани поджелудочной железы изменяется незначительно: сохраняется расширение сосудов межуточной ткани, есть признаки очаговой крупнокапельной жировой дистрофии, сохраняется частичная атрофия ацинарных структур;

д) в жировой ткани под воздействием экстракта клюквы происходят изменения, свидетельствующие о вероятности коррекции морфологической картины: уменьшаются признаки полнокровия, меньше разрывов соединительнотканых структур в крупных вакуолях.

Применение экстракта ягод брусники реализуется следующими морфологическими признаками:

а) при исследовании образцов ткани миокарда крыс, у которых применяли экстракт брусники, обнаружено: сохраняется межмышечный отек, полнокровие сосудов, белковая гиалиново-капельная дистрофия миоцитов, резко выраженное полнокровие и участки кровоизлияния;

б) в печени сохраняется умеренный фиброз портальных трактов, пролиферация желчных протоков, но менее выражена белковая гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов;

в) при исследовании состояния морфологии ткани почек после использования экстракта брусники обнаружено, что в целом морфологическая картина изменилась незначительно: выявлена выраженная гидропическая дистрофия, скопление гликогена в дистальных канальцах, лобулярность сосудистых петель клубочков, полнокровие сосудов, участки кровоизлияния;

г) в ткани поджелудочной железы сохраняются вакуоли в паренхиме и отек межуточной ткани;

д) использование экстракта брусники практически не отражается на морфологической картине жировой ткани.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

О том, что функциональные пищевые продукты из ягод могут выполнять вспомогательную роль и иметь значение не только в комплементарной или альтернативной медицине (Complementary and Alternative Medicine, по определению FDA, – все виды альтернативных направлений медицины, которые применяются в практике здравоохранения совместно с официально признанными методами), но и в медицине традиционной, известно давно и много. Среди ягод, которые наиболее интенсивно исследуются, важно выделить ягоды рода *Vaccinium*, а именно: клюкву, чернику, бруснику, поскольку именно они имеют перспективы стать источниками биологически активных пищевых добавок и даже лекарственных препаратов [9, 15]. При поиске в PubMed, по ключевым словам, обнаружено «northern berries» 2139 сообщений на декабрь 2021 года, среди которых с использованием ограничителя «clinical trials» 38 сообщений о рандомизированных клинических исследованиях и 4 мета-анализа.

Предположения о терапевтическом потенциале ягод рода *Vaccinium* – клюквы, черники, брусники – в большинстве случаев опираются на положение о высоком содержании в них полифенольных субстанций [152]. Известно, что полифенолы синтезируются растениями как вторичные метаболиты и предназначены служить их защитным механизмом против внешних воздействий и внутренних причин хронического стресса [277]. Исходя из количества фенольных колец, полифенолы подразделяют на четыре категории: фенольные кислоты, флавоноиды, стильбены и лигнаны, причем флавоноиды далее подразделяются на шесть подклассов (флавонолы, флаваны, изофлавоны, флаваноны, антоцианидины и проантоцианы) [137]. Понятно, что содержание полифенолов и компонентный состав субстрата ягод рода *Vaccinium* меняются в значительных пределах в зависимости от места произрастания ягод. В подавляющем большинстве случаев исследуется состав культивируемых ягод (в основном клюквы), для диких видов предполагается широкий спектр отличий, но достоверных данных недостаточно [145]. К настоящему времени сложилась ситуация, когда описан состав

американских ягод Аляски и Канады [93, 214], а также Польши и Белоруссии (в минимальной степени) [89]. Состав ягод Северо-Западной Сибири изучен недостаточно. В данной работе описан полифенольный состав водно-спиртовых экстрактов ягод клюквы, брусники и черники, собранных в 2015–2018 годах в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре Тюменской области России. Водно-спиртовые экстракты, приготовленные из ягод, имеют различное содержание фенольных компонентов, наибольшая их концентрация определена в экстракте черники (17610 ± 811 мг/л), несколько меньшая – в экстракте клюквы (8723 ± 304 мг/л) и наименьшая – в экстракте брусники (4930 ± 152 мг/л). В экстракте клюквы преобладает хлорогеновая кислота, а также изомеры кверцетина, флавонолы и флаваны. Среди антоцианов клюквы в наибольшей концентрации найдены Peonidin и Cyanidin галактазидазы и арабинозидазы. В экстракте брусники наибольшее значение имеют катехин, процианидины и флаваны, а из антоцианов – Cyanidin-3-O-galactoside. В экстракте черники найдены наиболее высокие концентрации антоцианов, а также эпикатехина, кверцетина, флавонолов и флаванов. По содержанию антоцианов исследуемые экстракты располагаются следующим образом: черника > клюква > брусника. Особо следует отметить, что именно антоцианы, водорастворимые цветные пигменты, окрашивающие ягоды в темно-красные и фиолетовые оттенки, обладают наиболее мощными антиоксидантными свойствами среди полифенолов [179]. Сравнивая концентрации общих фенолов, процианидинов и антоцианов, определенных в экстрактах черники, клюквы и брусники, использованных в наших экспериментах, с данными, приведенными в доступных публикациях, считаем необходимым указать, что для черники и клюквы приведены сведения, относящиеся к культивируемым сортам. Тем не менее, мы считали возможным провести сравнение концентрации антоцианов в экстрактах клюквы, брусники, черники – 489, 1026, 11842 мг/л – с опубликованными данными по экстрактам клюквы [39, 56, 255], брусники [4, 244], черники [175], мг/л: 89-230; 380-1050; 4840-5118. Как видно, концентрация антоцианов в экстрактах дикорастущих сибирских ягод черники и клюквы вдвое выше, чем в культивируемых

американских сортах черники и клюквы. При этом многие исследователи указывают на вероятность существенных различий по полифенольным компонентам у культивируемых видов по сравнению с дикорастущими ягодами [100], что подтверждается и нашими данными. В отношении дикорастущих ягод клюквы и черники на Аляске [145] значительного различия в уровнях концентрации полифенолов мы не нашли.

Таким образом, высокое содержание всех фенольных компонентов и особенно высокое содержание процианидинов и антоцианов, потенциально обеспечивающих антирадикальную активность, можно считать характерной особенностью экстрактов клюквы, брусники и черники, использованных в данной работе.

На основании анализа доступных литературных данных относительно полифенольного состава северо-американских и европейских ягод клюквы, брусники, черники, а также доступных единичных сообщений относительно фенольного состава ягод Северо-Западной Сибири, логично предполагать высокую степень вероятности высокого антиоксидативного потенциала.

Эти обстоятельства в совокупности позволили нам сформулировать рабочую гипотезу: экстракты северных ягод (клюквы, брусники, черники), содержащие относительно высокие концентрации полифенолов, могут проявлять антирадикальный и антиоксидантный эффект в организме и тем самым ограничивать негативные последствия хронического оксидативного стресса, являющегося ведущим патофизиологическим звеном метаболического синдрома. Выявленный потенциал экстрактов северных ягод в процессе коррекции основных звеньев метаболического синдрома на модели у крыс может экстраполироваться на ситуацию с метаболическим синдромом у человека

Далее описываются результаты экспериментов, подтверждающие и доказывающие данную гипотезу.

Доказательства наличия у экстрактов клюквы, брусники, черники способности связывать свободные радикалы в DPPH-тесте и ABTS-тесте были получены нами в условиях *in vitro*. Результаты экспериментов демонстрируют

выраженную антирадикальную активность в отношении DPPH-радикала и ABTS+ радикала водно-спиртовых экстрактов из черники, брусники, клюквы, причем выраженность антирадикального эффекта экстракта черники в условиях нашего эксперимента была наибольшей. Считается, что антиоксидантная активность черники зависит от ее фитохимического комплекса, в основном представленного антоцианинами, процианидинами и другими флавоноидными соединениями [272]. Предполагается, что основными участниками антиоксидантной активности являются именно антоцианы, ответственные за примерно 80 % антирадикального эффекта [255].

Также *in vitro* по МТТ-тесту оценивали и вероятные цитопротекторные свойства экстрактов ягод рода *Vaccinium* на двух вариантах клеток: на изолированных альвеолярных макрофагах кролика и коллекционной культуре клеток HEK293 (human embryonic kidney, ATCC® CRL-1573™). При инкубации изолированных клеток с исследуемыми экстрактами ягод выявлена способность полифенольных экстрактов клюквы, брусники, черники стимулировать жизнеспособность клеток и предотвращать цитотоксическое действие доксорубина.

Считаем, что эти результаты дают нам основания для предположения о наличии цитопротекторного потенциала у полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium*. Предполагаем, что входящие в состав экстрактов клюквы, брусники, черники полифенольные соединения (в основном антоцианы и проантоцианидины) как антиоксиданты способны защищать клетки от оксидативного повреждения, присутствующего в механизме цитотоксичности доксорубина.

В ряде предшествующих работ также установлено, что полифенолы некоторых темно-окрашенных северных ягод могут проявлять существенный антиоксидативный эффект, особенно это относится к экстрактам черники [32, 70, 242, 256]. Некоторое преимущество экстракта черники по выраженности антирадикального действия получено и в наших экспериментах.

Полученные в условиях наших экспериментов данные на клеточных культурах *vitro* в МТТ-тесте дают основание предполагать, что антирадикальный, антиоксидантный эффект, установленный для экстрактов клюквы, брусники, черники, вероятно, может являться основой цитопротекторного действия. Аналогичное мнение высказывали K.S. Bhullar и H.P. Rupasinghe [99] в отношении того, что вообще полифенолы ягод, фруктов и некоторых других растений, за счет антиоксидативного действия способны защищать клетки организма животных от повреждающего действия внешних и внутренних факторов. Таким образом, полагаем, есть основания считать, что цитопротекторный эффект *in vitro* является основой механизма действия полифенольных экстрактов северных ягод: клюквы, брусники, черники.

Кроме того, также в условиях *in vitro* исследовали возможность проявления противовоспалительного эффекта полифенольных экстрактов ягод клюквы, брусники и черники в культуре мышинных макрофагов RAW 264.7 (ATCC TIB-71). Присутствие экстрактов северных ягод в среде культивирования макрофагов в условиях нашего эксперимента проявилось 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. Эти результаты позволяют говорить о наличии у экстрактов северных ягод противовоспалительного потенциала.

Для всех экстрактов ягод рода *Vaccinium* в экспериментах *in vitro* выявлен антиоксидантный, цитопротекторный и противовоспалительный потенциал, зависимый от концентрации полифенолов.

Выбирая объект исследования для дальнейшего доказательства основной гипотезы исследования, учитывали, что модель метаболического синдрома разработана во множестве вариантов, но ни один из вариантов модели не позволяет имитировать одновременно кардинальные признаки метаболического синдрома.

В соответствии с определением, согласованным на сегодняшний день международными обществами специалистов (International Diabetes Federation Task

Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity), МС должен характеризоваться одновременным появлением по крайней мере трех из следующих состояний: ожирения, инсулинорезистентности или гипергликемии, гипертензии, дислипидемии (триглицеридемии) [80].

Модель метаболического синдрома на крысах путем назначения диеты с высоким избытком углеводов (20 %-ный раствор фруктозы вместо питьевой воды), полученная в условиях нашего эксперимента, включавшая ожирение, инсулинорезистентность, гипертензию, триглицеридемию соответствует описанию классической модели, известной из доступной литературы [115]. Но данная модель была расценена нами как избыточно тяжелая, поскольку в экспериментальной группе наблюдалась гибель животных при продолжении введения 20 % сахарозы на протяжении 4 недель. Поскольку ряд задач был связан с изучением влияния экстрактов ягод на течение возраст-ассоциированной патологии, а это требовало длительного периода наблюдения, то мы могли воспользоваться первым вариантом модели и разработали еще один вариант, с уменьшенной до 10 % концентрацией вводимой фруктозы. Эксперименты по созданию диет-индуцированной модели МС проводили на овариэктомированных крысах-самках, что позволило зафиксировать у них остеопороз. Введение крысам с уже сформированным состоянием инсулинорезистентности небольших доз стрептозоцина дополнительно спровоцировало сахарный диабет II типа. Нагрузка NaCl дала возможность получить высокую артериальную гипертензию [11, 39]. Таким образом, модель МС в условиях нашего эксперимента включала следующие состояния: ожирение, инсулинорезистентность, триглицеридемию, остеопороз, диабет II типа, артериальную гипертензию. Кроме того, судя по описанию патоморфологии печени, получено состояние, моделирующее состояние НЖБП, которое также считается патологией, связанной с возрастом [16, 25, 68]. На данной модели, сочетающей в себе признаки МС и возраст-ассоциированной патологии, проведены основные эксперименты.

Использованный вариант модели следует признать оригинальным, так как найти полное соответствие ему в литературе не удалось. Принципиальные отличия модифицированной модели: воспроизведены практически все маркеры МС, включая артериальную гипертензию и сахарный диабет II типа за счет дополнения кафетерийной диеты на поздних этапах перегрузкой NaCl и добавлением минидоз стрептозоцина. Модификация модели МС, заключающаяся в использовании самок крыс (вместо принятого использования самцов) и проведении овариэктомии позволила получить принципиально важную деталь МС – остеопороза, что усилило степень имитации МС у женщин.

После получения свидетельств формирования адекватной модели метаболического синдрома исследуемых животных случайным образом делили на следующие группы: группа животных, ежедневно получавших экстракт плодов клюквы; группа животных, получавших экстракт плодов брусники; группа животных, получавших экстракт плодов черники; группа животных, ежедневно получавших внутрь физиологический раствор (плацебо). Во всех случаях концентрация полифенолов в экстрактах составляла 10 мг/мл. Объем вводимой внутрь субстанции был 0,5 мл в каждом случае. Исследуемые субстанции вводили в течение двух недель.

В условиях нашего эксперимента нам не удалось зафиксировать изменение массы тела или массы жировой ткани у крыс при кормлении их экстрактами ягод рода *Vaccinium*. Однако были определены существенные изменения других критериев МС. Изменения биохимических параметров сыворотки крови крыс с моделью МС, происходящие при использовании экстрактов ягод клюквы, брусники, черники, дают основание предполагать активную корректирующую роль исследуемых экстрактов в развитии типичных признаков этой патологии. Так, нами установлено достоверное снижение уровня триглицеридов в крови крыс с моделью МС под влиянием экстрактов клюквы (на 28 %), брусники (на 30 %) и черники (на 32 %). Этот факт, учитывая значение триглицеридемии как ключевого признака МС [5, 63, 66], можно считать кардинальным признаком вмешательства использованных экстрактов ягод в патофизиологию МС. На

сходной модели МС эффект снижения триглицеридов под влиянием кормления крыс концентратом (выжимкой) черники удалось показать и другим исследователям [223, 258].

При неизменности уровня общего холестерина нам удалось зафиксировать повышение уровня ЛПВП при применении всех исследуемых экстрактов северных ягод, при этом снижение концентрации ЛПНП было обнаружено в случае применения экстракта ягод черники (эффект экстракта клюквы или брусники проявляется тенденцией к снижению).

Достоверность полученных нами изменений в липидном обмене под влиянием экстрактов ягод клюквы, брусники и черники подтверждается результатами исследования других авторов, которые изучали механизмы корректирующего действия черники. Так, S. Vendrame и соавт. [290] нашли, что после потребления экстракта черники найдено увеличение экспрессии транскрипционных факторов PPAR α и PPAR γ в жировой ткани крыс с метаболическим синдромом, в то время как экспрессия стирол-регулирующего белка (SREBP-1) и синтетазы жирных кислот в печени и жировой ткани уменьшалась под влиянием экстракта черники.

Общим эффектом для полифенольных экстрактов клюквы, брусники и черники из выявленных на модели МС является снижение уровня активности АЛТ и ЩФ. Повышение уровня трансаминазы при моделировании МС может быть отражением ускоренного цитолиза печеночных клеток, а повышение активности фермента щелочной фосфатазы – свидетельствовать о повреждениях печени, сопровождающихся явлениями холестаза, что является типичными проявлениями неалкогольной жировой дистрофии печени при метаболическом синдроме [18]. Полученные данные относительно зафиксированного нами снижения уровня АЛТ и ЩФ при применении экстрактов клюквы, брусники и черники позволяют предполагать потенциальный терапевтический эффект экстрактов ягод рода *Vaccinium* в отношении проявлений жировой дистрофии печени при метаболическом синдроме.

При моделировании МС инсулинорезистентность была зафиксирована у всех животных. Толерантность к инсулину у крыс, которым давали внутрь в течение 2 недель экстракты северных ягод, уменьшалась по сравнению с вариантом плацебо, но это снижение уровня достоверности не достигло, нам удалось лишь зафиксировать тенденцию. Можно полагать, что полифенольные экстракты в некоторой степени тормозят развитие инсулинорезистентности. Для уточнения возможности влияния экстрактов северных ягод на углеводный обмен эксперимент был продолжен на стандартной модели сформированного сахарного диабета второго типа. При введении стрептозоцина (агент, провоцирующий рост уровня сахара) животным мы получали стандартную, многократно описанную модель сахарного диабета. Основное, что удалось определить на данной модели, сводится к тому, что у экспериментальных животных, которым вводили экстракты ягод клюквы, брусники, черники, уровень сахара в крови не повышался так значительно, как в группе животных, которым вводили плацебо. Различие с плацебо было статистически достоверно в случаях применения экстракта черники и клюквы. Полученные данные позволяют констатировать, что введение экстрактов черники и клюквы ограничивает повреждающее действие стрептозоцина в отношении поджелудочной железы и препятствует развитию гипергликемии. И другие авторы для препаратов черники также установили вероятность уменьшения степени инсулинорезистентности при длительном применении у крыс с ожирением [165]. Это согласуется с нашими данными.

Поскольку некоторые полифенольные соединения (например, процианидины и катехины) предотвращают увеличение экспрессии субстрата NADPH-оксидазы gp91phox, происходящее под влиянием стрептозоцина, мы предполагаем, что экстракт черники, содержащий высокие концентрации и процианидинов, и катехинов в условиях нашего эксперимента демонстрирует антидиабетические свойства и защиту панкреатических β -клеток от окислительного стресса.

Известно, что инсулинорезистентность обычно сопровождает метаболический синдром или является стадией преддиабета, т.е. обычно

характеризует состояние до постановки клинического диагноза сахарного диабета 2-го типа [284]. Полученные нами данные о возможности снижения инсулинорезистентности при применении экстракта черники на модели МС у крыс могут быть положены в основу системы профилактики диабета. Эффект экстракта черники, зафиксированный в условиях нашего эксперимента, согласуется с данными исследований других авторов, полученными после потребления черники при ожирении и инсулинорезистентности грызунов [203].

Прием экстракта черники мог бы стать ключевым звеном первичной профилактики диабета до фактического возникновения заболевания, при этом, конечно, должны быть проведены эпидемиологические и клинические исследования.

При моделировании МС нам не удалось получить у крыс спонтанное повышение артериального давления, и поэтому мы инициировали развитие гипертензивного синдрома перегрузкой NaCl. В группе, где крысам вводили плацебо типичный гипертензивный синдром сохранялся на протяжении всего эксперимента. В группах крыс, которым вводили исследуемые экстракты клюквы, брусники или черники, систолическое артериальное давление было ниже, чем в группе плацебо. В случае использования экстрактов плодов черники и брусники в наших экспериментах найдено некоторое статистически достоверное снижение уровня систолического артериального давления. Это обстоятельство позволяет полагать, что экстракт плодов брусники и экстракт плодов черники каким-то образом противодействуют развитию гипертензивного синдрома у крыс при введении больших концентраций натрия хлорида, либо можно предполагать, что у экстрактов плодов черники и брусники есть гипотензивный эффект. Возможность снижения уровня АД у крыс под влиянием черники подтверждается и результатами экспериментов других авторов [28, 242]. Хотя результаты клинических исследований были неоднозначными [111], все же тенденция снижения АД под влиянием черники выявлена [301]. Полученные нами статистически достоверные данные о возможности снижения АД при гипертензивном синдроме крыс могут быть стимулом для новой проверки связи

между применением черники и уровнем АД у человека при гипертензии, но, очевидно, что требует крупных РКИ.

Еще одним дополнением модели МС в наших условиях был гормонодефицитный остеопороз, вызванный кастрацией крыс (овариэктомия).

На фоне сформированного остеопороза двухнедельное применение экстрактов северных ягод несколько меняет томографическую картину развития остеопороза. В условиях нашего эксперимента статистически достоверно выглядит вариант применения экстракта черники: экстракт черники достоверно снижает степень остеопороза у крыс, оказывает положительное влияние на плотность костной ткани, повышая ее в сравнении с плацебо, что может указывать на вероятные остеопротекторные свойства. Высказывалось предположение, что черника, ввиду высокого содержания проантоцианидинов, антоцианов и флавонолов, может быть полезна для защиты костей при развитии остеопороза [132]. Можно считать, что это предположение, высказанное по результатам клинических наблюдений, нашло экспериментальное подтверждение в данной работе.

Поскольку в развитии всех проявлений МС свободные радикалы крови имеют немаловажное значение, мы специально определяли уровень свободных радикалов крови (АФК) и уровень ферментов антиоксидантной защиты в крови крыс с метаболическим синдромом при применении исследуемых экстрактов северных ягод.

Установлено, что концентрация АФК наиболее высока в группе животных, получавших плацебо. Применение экстрактов ягод рода *Vaccinium* обеспечивает снижение уровня свободных радикалов в крови крыс, достоверное в случае с экстрактами клюквы и черники и статистически недостоверное снижение АФК при использовании экстракта брусники. На фоне МС антиоксидантный потенциал значительно падает при применении плацебо, но во всех исследуемых группах крыс, получавших экстракты ягод рода *Vaccinium*, степень снижения уровня антиоксидантных ферментов не столь велика, как в группе плацебо. Экстракты клюквы, брусники и черники при применении у крыс на фоне МС обеспечивают

повышение уровня антиоксидантного потенциала, а экстракт черники практически до нормы увеличивает потенциал антиоксидантной активности.

Результаты морфологических исследований, проведенных нами, документировали изменения, развивающиеся под влиянием применения полифенольных экстрактов ягод рода *Vaccinium* в тканях экспериментальных животных.

Использование экстракта черники у крыс с метаболическим синдромом обусловило проявление ряда признаков: а) значительное уменьшение признаков дистрофических процессов в ткани сердца; б) улучшение морфологической картины в печеночных дольках, признаки гепатоза нивелируются; в) некоторое улучшение морфологических процессов в ткани почек, исчезает гидропическая дистрофия дистальных канальцев; г) в ткани поджелудочной остаются лишь единичные признаки крупнокапельной дистрофии паренхимы и умеренная дистрофия ацинарных структур; д) выявляются признаки некоторого восстановления морфологических нарушений, типичных для МС в жировой ткани; е) остеопротективное действие на костную ткань и усиление компенсаторно-приспособительных процессов.

Результаты введения экстракта клюквы крысам с метаболическим синдромом при морфологическом исследовании проявляются: а) в ткани сердца – незначительным уменьшением числа гипертрофированных кардиомиоцитов; б) в ткани печени – снижением проявлений фиброза, при сохранении признаков дистрофии гепатоцитов; в) в ткани почек изменения морфологии незначительны, сохраняется гиалиново-капельная дистрофия; г) морфологическая картина ткани поджелудочной железы изменяется незначительно: крупнокапельная жировая дистрофия сохраняется; д) в жировой ткани уменьшаются признаки полнокровия, меньше разрывов соединительнотканых структур в крупных вакуолях.

Применение экстракта брусники реализуется следующими морфологическими признаками: а) сохраняется межмышечный отек, полнокровие сосудов, белковая гиалиново-капельная дистрофия миоцитов, резко выраженное полнокровие и участки кровоизлияния; б) в печени сохраняется умеренный

фиброз портальных трактов, но менее выражена белковая гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов; в) в ткани почек морфологическая картина изменяется незначительно; г) в ткани поджелудочной железы сохраняются жировые вакуоли и отек межуточной ткани; д) использование экстракта брусники практически не отражается на морфологической картине жировой ткани.

Таким образом, экстракты черники, клюквы и брусники способны корректировать течение патофизиологических процессов на модели МС. Это проявляется уменьшением уровня нарушений липидного и углеводного обмена, препятствием для развития гипертензивного синдрома и сахарного диабета, снижением риска развития жировой дистрофии печени и остеопороза. Указанные эффекты, зафиксированные нами в экспериментальных условиях на модели МС, мы склонны связывать с антиоксидантным и антирадикальным эффектами полифенольных компонентов экстрактов ягод клюквы, брусники и черники. Мы предполагаем, что в механизме столь разносторонних эффектов ключевым может быть воздействие исследованных экстрактов на регуляцию путей метаболизма PI3K/PTEN/Akt / mTORC1 / GSK-3 по аналогии с принципиально близкими по структуре полифенолами ресвератролом, берберинном или кверцетинном [207]. К настоящему времени воздействие на экспрессию mTOR может быть признано универсальным механизмом торможения возраст-ассоциированных патологических состояний, и наши данные в целом не противоречат данной гипотезе.

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 возраст-ассоциированной патологии.

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 натрия 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 в 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 уровню 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

АД – артериальное давление

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

БАД – биологически активные пищевые добавки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМТ – индекс массы тела

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПС – липополисахарид

МС – метаболический синдром

МТТ – тест для оценки метаболической активности клеток

НЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

ОС – окислительный стресс

ПАЦ – проантоцианидины

ПФ – производные флавонолов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СД – сахарный диабет

СОД – супероксиддисмутаза

СТЗ – стрептозоцин

ТГ – триглицериды

Тролокс – 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновой кислоты

ХМАО – Югра – Ханты-Мансийский автономный округ – Югра

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭГКК – эфиры гидроксикоричных кислот

ААРН – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид

ABTS – 2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) соль диамония

AUC – интегральная площадь под фармакокинетической кривой

DMAC – 4-диметиламиноциннамальдегид

DPNH – 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил

FL – флуоресцеин натриевая соль

NaCl – хлорид натрия

PAC – проантоцианидины

PAC-A2 – процианидин A2

PAC-B2 – процианидин B2

PAT – определение антиоксидантного потенциала плазмы

TPTZ – 2,4,6-три(2-пиридил)-с-триазин

UVA – ультрафиолетовое излучение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксидантные и цитопротекторные свойства концентратов полифенолов / Л. В. Коваленко, Л. Д. Белоцерковцева, Е. А. Кривых [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы здоровьесбережения человека на Севере : сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции, Сургут, 29 октября 2016 г. – Сургут : Сургутский государственный университет, 2016. – С. 386–394.
2. 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 [и др.] // Астана Биотех 2018 : материалы Международного Симпозиума, Астана, 12–13 июня 2018 г. – Астана : НЦБ, 2018. – С. 193.
3. 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.
4. Астафьева, А. Н. Физико-химические свойства экстрактов ягод брусники / А. Н. Астафьева, В. В. Сорокопуд // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – № 2 (25). – С. 11–14.
5. Беленький, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – Ленинград : Наука, 1963. – 151 с.
6. Белова, Е. А. Создание модели метаболического синдрома у крыс / Е. А. Белова // Актуальные проблемы биомедицины – 2018 : материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 12–13 апреля 2018 г. – Санкт-Петербург : РИЦ ПСПбГМУ, 2018. – С. 38–39.
7. Бериханова, Р. Р. Маркеры сердечно-сосудистого риска у женщин с метаболическим синдромом в периоде менопаузального перехода на фоне

применения мультимодальных нелекарственных терапевтических стратегий / Р. Р. Бериханова, И. А. Миненко, С. А. Бондарев. – DOI 10.15829/1560-4071-2020-3804 // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Т. 25, № 6. – С. 125–134.

8. Биологическая ценность плодов и ягод российского производства / М. Ю. Акимов, В. В. Бессонов, В. М. Коденцова [и др.]. – DOI 10.24411/0042-8833-2020-10055 // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89, № 4. – С. 220–232.

9. Ботиров, Э. Х. Химический состав и практическое применение ягод брусники и клюквы / Э. Х. Ботиров, М. Н. Лютикова. – DOI 10.14258/jcprtm.201502429 // Химия растительного сырья. – 2015. – № 2. – С. 5–27.

10. Вербовой, А. Ф. Ожирение – основа метаболического синдрома / А. Ф. Вербовой, Н. И. Вербовая, Ю. А. Долгих. – DOI 10.14341/omet12707 // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т. 18, № 2. – С. 142–149.

11. Влияние биофлавоноидов на интенсивность свободнорадикального окисления и активность Na^+/H^+ обменника у больных сахарным диабетом типа 2 / М. И. Балаболкин, М. Ф. Белоярцева, Л. В. Недосугова, В. С. Орлов [и др.] // Сахарный диабет. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 43–51.

12. Дигидрокверцетин в комплексном лечении ожирения у детей / Т. В. Строкова, Е. В. Павловская, А. Г. Сурков [и др.] // Лечащий врач. – 2012. – № 6. – С. 92–95.

13. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj> (дата обращения: 12.11.2021).

14. Еремеева, Н. Б. Изучение содержания антиоксидантов и их активности в концентрированных экстрактах из ягод клюквы (*Vaccinium Oxuscoccus*), облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.), ежевики (*Rubus fruticosus*), калины (*Viburnum opulus* L.) и рябины (*Sorbus aucuparia* L.) / Н. Б. Еремеева, Н. В. Макарова. – DOI 10.14258/jcprtm.2021049365 // Химия растительного сырья. – 2021. – № 4. – С. 157–164.

15. Замбулаева, Н. Д. Исследование антиоксидантных и антимикробных

свойств биопротекторов из отходов соковых производств как ингредиентов для обогащения продуктов питания / Н. Д. Замбулаева, С. Д. Жамсаранова. – DOI 10.21285/2227-2925-2018-8-1-51-58 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т. 8, № 1 (24). – С. 51–58.

16. Зверев, Я. Ф. Флавоноиды глазами фармаколога. Антиоксидантная и противовоспалительная активность / Я. Ф. Зверев. – DOI 10.17816/RCF1545-13 // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15, № 4. – С. 5–13.

17. Изучение фенольных соединений ягод трех видов растений рода *Vaccinium*, произрастающих в Ханты - Мансийском автономном округе / Е. А. Белова, В. С. Тритэк, З. Т. Шульгау [и др.] // Химия растительного сырья. – 2020. – № 1. – С. 107–116.

18. Инчина, В. И. Изменение показателей периферической крови белых крыс при остром токсическом гепатите на фоне введения водных экстрактов трав *symborogon proximus*, *асасia nilotica* и *trigonella foenumgraescum* / В. И. Инчина, М. А. Абдалхамид Хусейн. – DOI 10.24411/2075-4094-2018-16047 // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2018. – № 3. – С. 168–174.

19. Использование продуктов природного происхождения для коррекции абдоминального ожирения при экспериментальном метаболическом синдроме / А. В. Кубышкин, Ю. И. Шрамко, Е. Ю. Зяблицкая [и др.]. – DOI 10.14300/mnnc.2020.15133 // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 563–566.

20. Исследование коррекции метаболического синдрома полифенолами винограда / Ю. И. Шрамко, И. И. Фомочкина, А. В. Кубышкин [и др.] // Виноградарство и виноделие. – 2020. – Т. 49. – С. 264–266.

21. Исследование противовоспалительного и антидиабетического действия полифенолов винограда на экспериментальной модели метаболического синдрома / В. И. Петренко, А. В. Кубышкин, И. И. Фомочкина [и др.] // Виноградарство и виноделие. – 2020. – Т. 49. – С. 243–245.

22. Киселева, Е. В. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный

диабет 2 типа: проблема сопряженности и этапности развития / Е. В. Киселева, Т. Ю. Демидова. – DOI 10.14341/omet12758 // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т. 18, № 3. – С. 313-319.

23. Клёсов, Р. А. Генетические биомодели метаболического синдрома / Р. А. Клёсов, О. И. Степанова // Биомедицина. – 2018. – № 1. – С. 50–58.

24. Конобеева, А. Б. Хозяйственно-биологическая оценка голубики, черники, брусники и клюквы в условиях Центрально-Черноземного региона : автореферат диссертации кандидата сельскохозяйственных наук / А. Б. Конобеева. – Мичуринск, 2002. – 19 с.

25. Коррекция процессов свободнорадикального окисления на фоне применения биофлавоноида дигидрокверцетина при сахарном диабете типа 2 / Л. В. Недосугова, М. С. Никишова, А. К. Волкова [и др.] // Вестник восстановительной медицины. – 2006. – № 4 (18). – С. 51–54.

26. Корчин, В. И. Актуальные проблемы адаптации населения, проживающего в условиях урбанизированного Севера / В. И. Корчин, Ю. С. Макаева // Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18, № 12. – С. 98–101.

27. Котенко, К. В. Динамика липидного и метаболического дисбаланса на фоне комплексных программ реабилитации при метаболическом синдроме / К. В. Котенко, Б. Ю. Слонимский // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 912–917.

28. Кравчук, Е. Н. Экспериментальные модели метаболического синдрома / Е. Н. Кравчук, М. М. Галагудза // Артериальная гипертензия. – 2014. – № 5. – С. 377–383.

29. Кузнецова, И. В. Эндотелиальная дисфункция как связующее звено климактерического синдрома и сердечно-сосудистых заболеваний / И. В. Кузнецова. – DOI 10.33978/2307-3586-2019-15-32-32-40 // Эффективная фармакотерапия. – 2019. – Т. 15, № 32. – С. 32–40.

30. Лопаткина, Л. В. К вопросу о влиянии немедикаментозных методах лечения на снижение массы тела при метаболическом синдроме / Л. В. Лопаткина // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 975–979.

31. Лютикова, М. Н. Изучение состава биологически активных компонентов дикорастущих ягод *Vaccinium vitis-idaea* и *Oxycoccus palustris* в зависимости от степени их зрелости и условий хранения : специальность 02.00.10 "Биоорганическая химия" : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Лютикова Марина Николаевна. – Сургут, 2013. – 124 с.

32. Лютикова, М. Н. Исследование компонентного состава ягод местной дикорастущей брусники (*Vaccinium vitis-idaea* L.) / М. Н. Лютикова, Ю. П. Туров // Химия растительного сырья. – 2011. – № 1. – С. 145–149.

33. Лютикова, М. Н. Химические компоненты плодов дикорастущей *Oxycoccus palustris* севера Тюменской области / М. Н. Лютикова, Ю. П. Туров // Химия природных соединений. – 2010. – № 6. – С. 720–722.

34. Междисциплинарные клинические рекомендации «Лечение ожирения и коморбидных заболеваний» / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, Г. А. Мельниченко [и др.]. – DOI 10.14341/omet12714 // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т. 18, № 1. – С. 5–99.

35. Метаболический синдром. Актуальные вопросы диагностики, патогенеза и восстановительного лечения / М. В. Антонюк, Т. П. Новгородцева, Ю. К. Денисенко [и др.]. – Владивосток : Дальневосточный федеральный университет, 2018. – 211 с. – ISBN 978-5-7444-4364-1. – DOI 10.24866/7444-4364-1.

36. Метаболический синдром и его ассоциации с социально-демографическими и поведенческими факторами риска в российской популяции 25-64 лет / Ю. А. Баланова, А. Э. Имаева, В. А. Куценко [и др.]. – DOI 10.15829/1728-8800-2020-2600 // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 45–57.

37. Метаболический синдром : учебное пособие / Ю. П. Успенский, Ю. В. Петренко, З. Х. Гулунов [и др.]. – Санкт-Петербург, 2017. – 60 с.

38. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для коррекции сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома / составители: В. Г. Макаров, М. Н. Макарова, И. А.

Проскурина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – Москва : Гриф и К, 2012. – С. 685–699.

39. Методические рекомендации по изучению гипополипидемического и антиатеросклеротического действия лекарственных средств / составители: В. Е. Рыженков, В. Г. Макаров, О. В. Ремезова, М. Н. Макарова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – Москва : Гриф и К, 2012. – С. 445–452.

40. Модификация образа жизни и диетическое питание больных артериальной гипертензией с сахарным диабетом: рекомендации европейских консенсусов и реалии жизни (обзор литературы) / Д. К. Милославский, С. Н. Коваль, И. А. Снегурская [и др.]. – DOI 10.22141/2224-0721.14.2.2018.130565 // Международный эндокринологический журнал. – 2018. – № 2. – С. 182–193.

41. Никитин, Ю. П. Сахарный диабет и метаболический синдром в Сибири и на Дальнем Востоке / Ю. П. Никитин, М. И. Воевода, Г. И. Симонова. – DOI 10.15690/vgramn.v67i1.113 // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 67, № 1. – С. 66–74.

42. Новиков, В. С. Популярный атлас-определитель / В. С. Новиков, И. А. Губанов // Дикорастущие растения. – 5-е изд., стер. – Москва : Дрофа, 2008. – 415 с.

43. Об утверждении правил лабораторной практики : приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н // ГАРАНТ.РУ : информационно-правовой портал. – URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/12079613/> (дата обращения: 01.12.2021).

44. Патогенетическая коррекция оксидативного стресса природными концентратами полифенолов / А. В. Кубышкин, И. И. Фомочкина, Ю. И. Шрамко [и др.] // Госпитальная медицина: наука и практика. – 2019. – Т. 1, № 2. – С. 54–61.

45. Патофизиология метаболического синдрома : монография / Е. В. Корнеева, Л. Д. Белоцерковцева, Л. В. Коваленко [и др.]. – Москва : Издательский дом «Высшее Образование и Наука», 2012. – 136 с.

46. Петренко, В. И. Молекулярно-генетические аспекты в патогенезе метаболического синдрома / В. И. Петренко, И. И. Фомочкина, А. В. Кубышкин // Клиническая патофизиология. – 2017. – Т. 23, № 1. – С. 19–31.

47. Покровская, Е. В. Новые взгляды на состояние кишечной микробиоты при ожирении и сахарном диабете 2 типа / Е. В. Покровская, М. Ш. Шамхалова, М. В. Шестакова. – DOI 10.14341/DM10194 // Сахарный диабет. – 2019. – Т. 22, № 3. – С. 253–262.

48. Полифенолы винограда красных сортов в вине и концентратах для применения в реабилитационных технологиях / А. В. Кубышкин, А. М. Авидзба, В. С. Борисюк [и др.]. – DOI 10.15389/agrobiology.2017.3.622rus // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52, № 3. – С. 622–630.

49. Разработка модели метаболического синдрома у крыс / А. Е. Гуляев, Ш. Д. Сергазы, З. Т. Шульгау [и др.] // 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.

50. Распространенность и биомаркеры метаболического синдрома / О. Ю. Кытикова, М. В. Антонюк, Т. А. Кантур [и др.]. – DOI 10.14341/omet12704 // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 302–312.

51. Распространённость метаболического синдрома и его компонентов в Сибири / Г. И. Симонова, Е. А. Печенкина, Л. В. Щербакова, Ю. П. Никитин // Актуальные вопросы диагностики и лечения метаболического синдрома : тезисы докладов конференции. – Москва, 2006. – С. 17.

52. Расщепкина, Е. А. Исследование химического состава брусники / Е. А. Расщепкина, М. А. Субботина, А. Н. Расщепкин // Технология и продукты здорового питания. – 2008. – № 8. – С. 117–118.

53. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (второй пересмотр) // Практическая медицина. – 2010. – № 5 (44). – С. 81–101.

54. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых

фармакологических веществ / под редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва : ОАО Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.

55. Свирид, В. Д. Эндокринология : практикум / В. Д. Свирид. – Минск : ИВЦ Минфина, 2020. – 47 с.

56. Сирусина, Ад. В. Латентные факторы качества жизни у пациентов с метаболическим синдромом, проживающих в Северном регионе / Ад. В. Сирусина, Аэ. В. Сирусина, О. Н. Рагозин // Здоровье и образование в XXI веке. – 2013. – Т. 15, № 1–4. – С. 345–349.

57. Сорокопуд, В. В. Теплофизические характеристики водных и водно-спиртовых экстрактов ягод клюквы и голубики / В. В. Сорокопуд, И. Б. Плотников, Л. В. Плотникова // Химия растительного сырья. – 2014. – № 3. – С. 255–258.

58. Сравнительный анализ коррекции морфофункциональных нарушений в сердечно-сосудистой системе при моделированном метаболическом синдроме / К. О. Таримов, М. В. Субботкин, А. А. Куланова [и др.]. – DOI 10.14341/omet12296 // Ожирение и метаболизм. – 2020. – Т. 17, № 2. – С. 208–219.

59. Стрелкова, С. Н. Роль немедикаментозных методов лечения метаболического синдрома: трудности и перспективы / С. Н. Стрелкова, К. В. Овсянников, Н. И. Уткина. – DOI 10.20996/1819-6446-2016-12-6-725-732 // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2016. – Т. 12, № 6. – С. 725–732.

60. Суменков, М. В. Физико-химические свойства экстрактов ягод клюквы / М. В. Суменков, А. Ф. Сорокопуд. – DOI 10.17586/2310-1164-2016-9-1-118-125 // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия: Процессы и аппараты пищевых производств. – 2016. – № 1. – С. 118–125.

61. Терентьева, В. М. Биохимическая оценка высушенных ягод брусники Центральной Якутии / В. М. Терентьева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – № 10 (190). – С. 113–116.

62. Тусупбекова, М. М. Основы гистологической техники и методы гистологического исследования аутопсийного, операционно-биопсийного и

экспериментального материала : методические рекомендации / М. М. Тусупбекова. – Караганда, 2007. – 44 с.

63. Учамрина, В. А. Комплексный подход в лечении метаболического синдрома / В. А. Учамрина, Т. И. Романцова, М. Ф. Калашникова. – DOI 10.14341/ОМЕТ2014132-37 // Ожирение и метаболизм. – 2014. – Т. 11, № 1. – С. 32–37.

64. Фенольные соединения ягод трех видов растений рода *Vaccinium* L. / Е. А. Белова, В. С. Тритэк, З. Т. Шульгау [и др.] // 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.

65. Филатова, Г. А. Ожирение: спорные вопросы, определяющие метаболическое здоровье / Г. А. Филатова, Т. И. Дэпюи, Т. И. Гришина // Эндокринология. Новости. Мнения. Обучение. – 2018. – Т. 7, № 1 (22). – С. 58–67.

66. Фомичева, П. К. Содержание флавоноидов в ягодах клюквы, брусники, культивируемых на опытных участках Костромской области / П. К. Фомичева, Е. В. Батура // Актуальные проблемы науки в агропромышленном комплексе. – 2007. – Т. 2. – С. 64–64.

67. Цитопротекторный потенциал полифенольных экстрактов плодов рода *Vaccinium*, произрастающих на территории Югры, в условиях *in vitro* / Е. А. Белова, Е. А. Кривых, Н. С. Кавушевская [и др.] // Вестник СурГУ. Медицина. – 2020. – № 1. – С. 86–93.

68. Цуканов, В. В. Новые аспекты неалкогольной жировой болезни печени / В. В. Цуканов, А. В. Васютин, Ю. Л. Тонких. – DOI 10.31550/1727-2378-2021-20-4-33-39 // Доктор.Ру. – 2021. – № 20 (4). – № 33–39.

69. Чазова, И. Е. Метаболический синдром / И. Е. Чазова, В. Б. Мычка // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 32–38.

70. Чугунова, О. В. Исследование антиоксидантной активности и ее изменения при хранении плодово-ягодного сырья Свердловской области / О. В. Чугунова, Н. В. Заворохина, А. В. Вяткин. – DOI

10.32417/article_5dcd861e8e0053.57240026 // Аграрный вестник Урала. – 2019. – № 11 (190). – С. 59–65.

71. Шагина, В. Н. Понятие метаболического синдрома, его терапия и профилактика / В. Н. Шагина, И. И. Блохина, И. С. Серов // Молодой ученый. – 2019. – № 37 (275). – С. 114–116.

72. Шемеровский, К. А. Неалкогольная жировая болезнь печени / К. А. Шемеровский // Русский медицинский журнал. – 2015. – Т. 23, № 26. – С. 1528–1530.

73. Шепель, Р. Н. Новые векторы в диагностике метаболического синдрома: оценка уровня сосудистого эндотелиального фактора роста, пентраксина-3 и трансформирующего фактора роста бета / Р. Н. Шепель, О. М. Драпкина. – DOI 10.15829/1728-8800-2019-6-57-61 // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2019. – Т. 18, № 6. – С. 57–63.

74. Эффективность использования насыщенных полифенолами продуктов переработки винограда для профилактики метаболических нарушений в эксперименте / А. В. Кубышкин, А. М. Авидзба, И. И. Фомочкина [и др.] // Вопросы питания. – 2017. – Т. 86, № 1. – С. 100–107.

75. Югория : энциклопедия Ханты-Мансийского автономного округа / Ханты-Мансийск НИИ региональных энциклопедий ТюмГУ. – Ханты-Мансийск, 2000. – 400 с.

76. A CONSORT-compliant, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial of purified anthocyanin in patients with nonalcoholic fatty liver disease / P. W. Zhang, F. X. Chen, D. Li [et al.]. – DOI 10.1097/MD.0000000000000758 // Medicine (Baltimore). – 2015. – Vol. 94, № 20. – P. e758.

77. A diet high in fatty fish, bilberries, and whole grain products improves markers of endothelial function and inflammation in individuals with impaired glucose metabolism – the SYSDIET study / V. D. De Mello, U. Schwab, M. Kolehmainen [et al.] // Diabetologia. – 2011. – Vol. 54. – P. 2755–2767.

78. A multi-omics investigation of the molecular characteristics and classification of six metabolic syndrome relevant diseases / D. Chen, X. Zhao, Z. Sui [et al.]. – DOI

10.7150/thno.41106 // Theranostics. – 2020. – Vol. 10, № 5. – P. 2029–2046.

79. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice / F. F. Anhê, D. Roy, G. Pilon [et al.] // Gut. – 2014. – Vol. 64. – P. 872–883.

80. Alberti, K. G. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group The metabolic syndrome – A new worldwide definition / K. G. Alberti, P. Zimmet, J. Shaw. – DOI 10.1016/S0140-6736(05)67402-8 // Lancet. – 2005. – Vol. 366. – P. 1059–1062.

81. Amiot, M. J. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: a systematic review / M. J. Amiot, C. Riva, A. Vinet. – DOI 10.1111/obr.12409 // Obesity Reviews. – 2016. – Vol. 17, № 7. – P. 573–586.

82. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome / N. B. Ruderman, D. Carling, M. Prentki, J. M. Cacicedo // Journal of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123, № 7. – P. 2764–2772.

83. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan / S. Alavez, M. C. Vantipalli, D. J. Zucker [et al.]. – DOI 10.1038/nature09873 // Nature. – 2011. – Vol. 472. – P. 226–229.

84. An oxidative stress-based mechanism of doxorubicin cytotoxicity suggests new therapeutic strategies in ABC-DLBCL / Y. Mai, J. J. Yu, B. Bartholdy [et al.] // Blood. – 2016. – Vol. 128, № 24. – P. 2797–2807.

85. Animal models of metabolic syndrome: a review / S. K. Wong, K. Y. Chin, F. H. Suhaimi [et al.]. – DOI 10.1186/s12986-016-0123-9 // Nutrition and Metabolism. – 2016. – Vol. 13. – P. 65.

86. Anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts of berries in food supplements--analysis with problems / L. Krenn, M. Steitz, C. Schlicht [et al.]. – DOI 10.1691/ph.2007.11.7621 // Pharmazie. – 2007. – Vol. 62, № 11. – P. 803–812.

87. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats / E. L. B. Novelli, Y. S. Diniz, C. M. Galhardi [et al.]. – DOI 10.1258/00236770779399518 // Laboratory Animals. – 2007. – Vol. 41, № 1. – P. 111–119.

88. Anti-inflammatory and antidiabetic effects of grape-derived stilbene

concentrate in the experimental metabolic syndrome / A. Kubyshkin, A. Shevandova, V. Petrenko [et al.]. – DOI 10.1007/s40200-020-00626-w // Journal of Diabetes and Metabolic Disorders. – 2020. – Vol. 19, № 2. – P. 1205–1214.

89. Anti-inflammatory effects of anthocyanins-rich extract from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on croton oil-induced ear edema and *Propionibacterium acnes* plus LPS-induced liver damage in mice / H. Luo, X. D. Lv, G. E. Wang [et al.]. – DOI 10.3109/09637486.2014.886184 // International Journal of Food Sciences and Nutrition – 2014. – Vol. 65, № 5. – P. 594–601.

90. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente [et al.]. – DOI 10.1016/S0891-5849(98)00315-3 // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26. – P. 1231–1237.

91. Antioxydant treatment prevent renal damage and dysfunction and reduce arterial pressure in salt-sensitive hypertension / N. Tian, K. D. Thrasker, P. D. Gundy, M. Hudhson. – DOI 10.1161/01.HYP.0000160404.08866.5a // Hypertension. – 2005. – Vol. 45. – P. 934–939.

92. Autophagy in liver diseases: time for translation? / M. Allaire, P. E. Rautou, P. Codogno, S. Lotersztajn. – 10.1016/j.jhep.2019.01.026 // Journal Hepatology. – 2019. – Vol. 70, № 5. – P. 985–998.

93. Autophagy in major human diseases / D. J. Klionsky, G. Petroni, R. K. Amaravadi [et al.]. – DOI 10.15252/emboj.2021108863 // EMBO Journal. – 2021. – Vol. 40, № 19. – P. e108863.

94. Benedict, M. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review / M. Benedict, X. Zhang. – DOI 10.4254/wjh.v9.i16.715 // World Journal of Hepatology. – 2017. – Vol. 9, № 16. – P. 715–732.

95. Berries containing anthocyanins with enhanced methylation profiles are more effective at ameliorating high fat diet-induced metabolic damage / E. Skates, J. Overall, K. DeZego [et al.] // Food and Chemical Toxicology. – 2018. – Vol. 111. – P. 445–453.

96. Berries Reduce Postprandial Insulin Responses to Wheat and Rye Breads in Healthy Women / R. Törrönen, M. Kolehmainen, E. Sarkkinen [et al.]. – DOI

10.3945/jn.112.169771 // Journal of Nutrition. – 2013. – Vol. 143, № 4. – P. 430–436.

97. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention / S. Zafra-Stone, T. Yasmin, M. Bagchi [et al.]. – DOI 10.1002/mnfr.200700002 // Molecular Nutrition and Food Research. – 2007. – Vol. 51, № 6. – P. 675–683.

98. Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects / N. Pap, M. Fidelis, L. Azevedo [et al.]. – DOI 10.1016/j.cofs.2021.06.003 // Current Opinion in Food Science. – 2021. – Vol. 42. – P. 167–186.

99. Bhullar, K. S. Antioxidant and cytoprotective properties of partridgeberry polyphenols / K. S. Bhullar, H. P. Rupasinghe // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 168. – P. 595–605.

100. Bilberries reduce low-grade inflammation and subacute endotoxemia in individuals with features of metabolic syndrome / M. Kolehmainen, O. Mykkänen, P. Kirjavainen [et al.] // Molecular Nutrition and Food Research. – 2012. – Vol. 56. – P. 1501–1510.

101. Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells / P. E. Milbury, B. Graf, J. M. Curran-Celentano, J. B. Blumberg // Investigative Ophthalmology and Visual Science. – 2007. – Vol. 48, № 5. – P. 2343–2349.

102. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Small Berries / M. Zorzi, F. Gai, C. Medana [et al.]. – DOI 10.3390/foods9050623 // Foods. – 2020. – Vol. 9, № 5. – P. 623.

103. Bioavailability of intact proanthocyanidins in the rat colon after ingestion of grape seed extract / Y. Y. Choy, G. K. Jaggers, P. I. Oteiza, A. L. Waterhouse. – DOI 10.1021/jf301939e // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2013. – Vol. 61. – P. 121–127.

104. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? / E. Rodríguez-Correa, I. González-Pérez, P. I. Clavel-Pérez [et al.]. – DOI 10.1038/s41387-020-0127-4 // Nutrition and Diabetes. –

2020. – Vol. 10, № 1. – P. 24.

105. Biological effects of grape polyphenols processing products in experimental metabolic syndrome / A. V. Kubyshkin, I. I. Fomochkina, Y. A. Ogai [et al.]. – DOI 10.15275/rusomj.2018.0405 // Russian Open Medical Journal. – 2018. – Vol. 7, № 4. – P. 405.

106. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro / N. P. Seeram, L. S. Adams, Y. Zhang [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Vol. 54, № 25. – P. 9329–9339.

107. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster* / C. Peng, Y. Zuo, K. M. Kwan [et al.]. – DOI 10.1016/j.exger.2011.12.001 // Experimental Gerontology. – 2012. – Vol. 47. – P. 170–178.

108. Bog bilberry phenolics, antioxidant capacity and nutrient profile / N. Colak, H. Torun, J. Gruz [et al.]. – DOI 10.1016/j.foodchem.2016.01.062 // Food Chemistry. – 2016. – Vol. 201. – P. 339–349.

109. Bray, G. A. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity / G. A. Bray, S. J. Nielsen, B. M. Popkin. – DOI 10.1093/ajcn/79.4.537 // American Journal of Clinical Nutrition. – 2004. – № 79 (4). – P. 537–543.

110. Brown, R. E. Consequences of obesity and weight loss: a devil's advocate position / R. E. Brown, J. L. Kuk. – DOI 10.1111/obr.12232 // Obesity Reviews. – 2015. – Vol. 16, № 1. – P. 77–87.

111. Caprara, G. Mediterranean-Type Dietary Pattern and Physical Activity: The Winning Combination to Counteract the Rising Burden of Non-Communicable Diseases (NCDs) / G. Caprara. – DOI 10.3390/nu13020429 // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 429.

112. Cardiovascular function in male and female JCR:LA-cp rats: effect of high-fat/high-sucrose diet / I. Hunter, A. Soler, G. Joseph [et al.]. – DOI 10.1152/ajpheart.00535.2016 // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2017. – Vol. 312, № 4. – P. H742–H751.

113. Chandrasekera, P. C. Of rodents and men: species-specific glucose regulation and type 2 diabetes research / P. C. Chandrasekera, J. J. Pippin. – DOI 10.14573/1309231 // ALTEX. – 2014. – Vol. 31, № 2. – P. 157–176.

114. Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats / G. M. Reaven, T. R. Risser, Y. D. Chen, E. P. Reaven // Journal of Lipid Research. – 1979. – Vol. 20, № 3. – P. 371–378.

115. Characterization of liver changes in ZSF1 rats, an animal model of metabolic syndrome / M. Borges Canha, J. P. Portela-Cidade, G. Conceição [et al.] // Revista espanola de enfermedades digestivas. – 2017. – № 109 (7). – P. 491–497.

116. Chiva-Blanch, G. Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials / G. Chiva-Blanch, L. Badimon. – DOI 10.1155/2017/5812401 // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – P. 5812401.

117. Circulating HMGB1 Levels Are Associated With Glucose Clamp-Derived Measures of Insulin Resistance in Women With PCOS / M. Migazzi, M. Dauriz, F. Cirillo [et al.]. – DOI 10.1210/jendso/bvab048.1502 // Journal of the Endocrine Society. – 2021. – Vol. 5, Supplement 1. – P. 738–739.

118. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening / K. Srinivasan, B. Viswanad, L. Asrat [et al.]. – DOI 10.1016/j.phrs.2005.05.004 // Pharmacological Research. – 2005. – Vol. 52, № 4. – P. 313–320.

119. Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity, and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries / M. H. Grace, D. Esposito, K. L. Dunlap, M. A. Lila. – DOI 10.1021/jf403810y // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2014. – Vol. 62, № 18. – P. 4007–4017.

120. Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits / D. Burdulis, A. Sarkinas, I. Jasutienė [et al.] // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2009. – № 66, № 4. – P. 399–408.

121. Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: potential impact on colonic health / E. M. Brown, S. Nitecki, G. Pereira-Caro [et al.]. – DOI 10.1002/biof.1173 // *Biofactors*. – 2014. – Vol. 40, № 6. – P. 611–623.

122. Composition of fatty acids in plasma and erythrocytes and eicosanoids level in patients with metabolic syndrome / T. P. Novgorodtseva, Y. K. Karaman, N. V. Zhukova [et al.]. – DOI 10.1186/1476-511X-10-82 // *Lipids in Health and Disease*. – 2011. – Vol. 10. – P. 82.

123. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice / H. Jürgens, W. Haass, T. R. Castañeda [et al.]. – DOI 10.1038/oby.2005.136 // *Obesity Research*. – 2005. – Vol. 13, № 7. – P. 1146–1156.

124. Consumption of cranberry as adjuvant therapy for urinary tract infections in susceptible populations: A systematic review and meta-analysis with trial sequential analysis / J. Y. Xia, C. Yang, D. F. Xu [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0256992 // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16, № 9. – P. e0256992.

125. Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes // *Official Journal L*. – 1986. – № 358. – P. 1–28.

126. Cranberry-Containing Products for Prevention of Urinary Tract Infections in Susceptible Populations A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials / C. Wang, C. Fang, N. Chen [et al.]. – DOI 10.1001/archinternmed.2012.3004 // *Archives of Internal Medicine*. – 2012. – Vol. 172, № 13. – P. 988–996.

127. Cranberry Extract Standardized for Proanthocyanidins Alleviates β -Amyloid Peptide Toxicity by Improving Proteostasis Through HSF-1 in *Caenorhabditis elegans* Model of Alzheimer's Disease / H. Guo, M. Cao, S. Zou [et al.]. – DOI 10.1093/gerona/glv165 // *Journals Of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 71, № 12. – P. 1564–1573.

128. Cranberry extract standardized for proanthocyanidins promotes the immune

response of *Caenorhabditis elegans* to *Vibrio cholerae* through the p38 MAPK pathway and HSF-1 / J. Dinh, J. T. Angeloni, D. B. Pederson [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0103290 // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 7.

129. Cranberry interacts with dietary macronutrients to promote healthy aging in *Drosophila* / C. Wang, J. Yolitz, T. Alberico [et al.]. – DOI 10.1093/gerona/glt161 // Journals of Gerontology: Series A. – 2014. – Vol. 69, № 8. – P. 945–954.

130. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults / J. A. Novotny, D. J. Baer, C. Khoo [et al.]. – DOI 10.3945/jn.114.203190 // Journal of Nutrition. – 2015. – Vol. 145, № 6. – P. 1185–1193.

131. Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *Drosophila melanogaster* / K. S. Lee, B. S. Lee, S. Semnani [et al.] // Rejuvenation Research. – 2010. – Vol. 13. – P. 561–570.

132. Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila* / L. R. Shen, F. Xiao, P. Yuan [et al.] // Age (Dordr). – 2013. – Vol. 35. – P. 1133–1142.

133. Current perspectives between metabolic syndrome and cancer / C. Micucci, D. Valli, G. Matakchione, A. Catalano // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – P. 38959–38972.

134. Development of rat metabolic syndrome models: A review / S. Gunawan, A. Aulia, V. Soetikno. – DOI 10.14202/vetworld.2021.1774-1783 // Veterinary World. – 2021. – Vol. 14, № 7. – P. 1774–1783.

135. Dietary composition and nutrient content of the New Nordic Diet / C. Mithril, L. O. Dragsted, C. Meyer [et al.]. – DOI 10.1017/S1368980012004521 // Public Health Nutrition. – 2012. – Vol. 16. – P. 777–85.

136. Dietary Management of Heart Failure: DASH Diet and Precision Nutrition Perspectives / B. E. Wickman, B. Enkhmaa, R. Ridberg [et al.]. – DOI 10.3390/nu13124424 // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, № 12. – P. 4424.

137. Dietary patterns and risk for metabolic syndrome in Korean women: a cross-

sectional study / J. H. Choi, H. D. Woo, J. H. Lee, J. Kim. – DOI 10.1097/MD.0000000000001424 // *Medicine (Baltimore)*. – 2015. – Vol. 94, № 34. – P. e1424.

138. Dietary polyphenols increase fecal mucin and immunoglobulin A and ameliorate the disturbance in gut microbiota caused by a high fat diet / T. Taira, S. Yamaguchi, A. Takahashi [et al.]. – DOI 10.3164/jcbrn.15-15 // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2015. – Vol. 57, № 3. – P. 212–216.

139. Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium *Akkermansia muciniphila* and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome / D. E. Roopchand, R. N. Carmody, P. Kuhn [et al.] // *Gut*. – 2015. – Vol. 64, № 6. – P. 872–883.

140. Dietary Strategies for Management of Metabolic Syndrome: Role of Gut Microbiota Metabolites / S. Croci, L. I. D'Apollito, V. Gasperi [et al.]. – DOI 10.3390/nu13051389 // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13, № 5. – P. 1389.

141. Dissecting the Mechanisms of Doxorubicin and Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity: The Involvement of Actin Cytoskeleton and ROCK1 / L. Wei, M. Surma, G. Gough [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0131763 // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 7.

142. Dizaji, B. F. The investigations of genetic determinants of the metabolic syndrome / B. F. Dizaji. – DOI 10.1016/j.dsx.2018.04.009 // *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. – 2018. – Vol. 12, № 5. – P. 783–789.

143. Dose-dependent effects of walnuts on motor and cognitive function in aged rats / L. M. Willis, B. Shukitt-Hale, V. Cheng, J. A. Joseph. – DOI 10.1017/S0007114508059369 // *British Journal of Nutrition*. – 2009. – Vol. 101, № 8. – P. 1140–1144.

144. Doxorubicin-transferrin conjugate triggers pro-oxidative disorders in solid tumor cells / M. Szwed, D. Wrona, K. D. Kania [et al.]. – DOI 10.1016/j.tiv.2015.11.009 // *Toxicology in Vitro*. – 2016. – Vol. 31. – P. 60–71.

145. Drózdź, P. Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries / P. Drózdź, V. Šežienė, K. Pyrzynska. – DOI

10.1007/s11130-017-0640-3 // Plant Foods for Human Nutrition. – 2017. – Vol. 72, № 4. – P. 360–364.

146. Dziegielewska-Gesiak, S. Metabolic Syndrome in an Aging Society - Role of Oxidant-Antioxidant Imbalance and Inflammation Markers in Disentangling Atherosclerosis / S. Dziegielewska-Gesiak. – DOI 10.2147/CIA.S306982 // Clinical Interventions in Aging. – 2021. – Vol. 16. – P. 1057–1070.

147. Effect of Bilberry Extract on Development of Form-Deprivation Myopia in the Guinea Pig / H. W. Deng, Y. Tian, X. J. Zhou [et al.]. – DOI 10.1089/jop.2015.0053 // Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. – 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 196–202.

148. Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with Type 2 diabetes / I. T. Lee, Y. C. Chan, C. W. Lin [et al.]. – DOI 10.1111/j.1464-5491.2008.02588.x // Diabetic Medicine. – 2008. – Vol. 25, № 12. – P. 1473–1477.

149. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat / J. H. Kim, D. H. Hahm, D. C. Yang [et al.]. – DOI 10.1254/jphs.FP0040184 // Journal of Pharmacological Sciences. – 2005. – Vol. 97, № 1. – P. 124–131.

150. Effect of Extracts of Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) on Amyloglucosidase and α -Glucosidase Activity / D. P. Karcheva-Bahchevanska, P. K. Lukova, M. M. Nikolova [et al.]. – DOI 10.1515/folmed-2017-0028 // Folia Medica. – 2017. – Vol. 59, № 2. – P. 197–202.

151. Effect of the Aged Garlic Extract on Cardiovascular Function in Metabolic Syndrome Rats / I. Pérez-Torres, J. C. Torres-Narváez, J. Pedraza-Chaverri [et al.] // Molecules. – 2016. – Vol. 21, № 11.

152. Effects of healthy dietary pattern and other lifestyle factors on incidence of diabetes in a rural Japanese population / A. Morimoto, Y. Ohno, Y. Tatsumi [et al.]. – DOI 10.3316/ielapa.806182376196630 // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. – 2012. – Vol. 1. – P. 601–608.

153. Effects of isocaloric healthy Nordic diet on glucose tolerance, lipid profile and inflammatory markers in people with metabolic syndrome – the randomized study

(SYSDIET) / M. Uusitupa, K. Hermansen, M. J. Savolainen [et al.]. – DOI 10.1111/joim.12044 // Journal of Internal Medicine. – 2013. – Vol. 274, № 1. – P. 52–66.

154. Effects of lingonberry extraction on the mice cognitive function damaged by chronic stress / C. Zuo, W. Li, L. Wang [et al.] // Wei Sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research. – 2015. – Vol. 44, № 6. – P. 943–948.

155. Effects of long-term cranberry supplementation on endocrine pancreas in aging rats / M. Zhu, J. Hu, E. Perez [et al.]. – DOI 10.1093/gerona/glr105 // Journals of Gerontology: Series A. – 2011. – Vol. 66, № 11. – P. 1139–1151.

156. Effects of Vaccinium Berries on Serum Lipids: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials / Y. Zhu, Y. Miao, Z. Meng, Y. Zhong. – DOI 10.1155/2015/790329 // Evidence-Based Complementary Alternative Medicine. – 2015. – Vol. 2015. – P. 790329.

157. Epidemiology of metabolic syndrome and its components in Chinese patients with a range of thyroid-stimulating hormone concentrations / K. Tang, Q. Zhang, N. C. Peng [et al.]. – DOI 10.1177/0300060520966878 // Journal of International Medical Research. – 2020. – Vol. 48, № 11.

158. Esteve, M. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional / M. Esteve. – DOI 10.1016/j.endonu.2013.03.011 // Endocrinología y Nutrición. – 2014. – Vol. 61, № 2. – P.100–112.

159. Eugenia uniflora fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management / P. S. Oliveira, V. C. Chaves, N. P. Bona [et al.]. – DOI 10.1016/j.biopha.2017.05.131 // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2017. – Vol. 92. – P. 935–941.

160. Fasting serum hippuric acid is elevated after bilberry (*Vaccinium myrtillus*) consumption and associates with improvement of fasting glucose levels and insulin secretion in persons at high risk of developing type 2 diabetes / V. D. De Mello, M. A. Lankinen, J. Lindström [et al.]. – DOI 10.1002/mnfr.201700019 // Molecular Nutrition & Food Research. – 2017. – Vol. 61, № 9.

161. Flavanol plasma bioavailability is affected by metabolic syndrome in rats /

M. Margalef, Z. Pons, L. Iglesias-Carres [et al.] // Food Chemistry. – 2017. – Vol. 231. – P. 287–294.

162. Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults / D. L. McKay, C. Y. Chen, C. A. Zampariello, J. B. Blumberg. – DOI 10.1016/j.foodchem.2014.07.062 // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 168. – P. 233–240.

163. Fractionation of an anthocyanin-rich bilberry extract and in vitro antioxidative activity testing / A. Juadjur, C. Mohn, M. Schantz [et al.] // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 167. – P. 418–424.

164. Frisardi, V. Metabolic Syndrome and Autophagy: Focus on HMGB1 Protein / V. Frisardi, C. Matrone, M. E. Street. – DOI 10.3389/fcell.2021.654913 // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9.

165. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome / M. J. Dekker, Q. Su, C. Baker, A. C. Rutledge, K. Adeli. – DOI 10.1152/ajpendo.00283.2010 // AJP - Endocrinology and Metabolism. – 2010. – Vol. 299, № 5. – P. E685–E694.

166. Fructose and metabolic diseases: too much to be good / Y. N. Shi, Y. J. Liu, Z. Xie, W. J. Zhang. – DOI 10.1097/CM9.0000000000001545 // Chinese Medical Journal. – 2021. – Vol. 134, № 11. – P. 1276–1285.

167. Fructose metabolism and metabolic disease / S. A. Hannou, D. E. Haslam, N. M. McKeown, M. A. Herman // Journal of Clinical Investigation. – 2018. – Vol. 128, № 2. – P. 545–555.

168. Fu, Z. X. Cranberry Reduces the Risk of Urinary Tract Infection Recurrence in Otherwise Healthy Women: A Systematic Review and Meta-Analysis / Z. X. Fu, D. Liska, D. Talan, M. Chung. – DOI 10.3945/jn.117.254961 // Journal of Nutrition. – 2017. – Vol. 147, № 12. – P. 2282–2288.

169. Gamage, G. C. V. Anthocyanins From Clitoria ternatea Flower: Biosynthesis, Extraction, Stability, Antioxidant Activity, and Applications / G. C. V. Gamage, Y. Y. Lim, W. S. Choo. – DOI 10.3389/fpls.2021.792303 // Frontiers in Plant Science. – 2021. – Vol. 12.

170. Gibas, M. K. Induced and controlled dietary ketosis as a regulator of obesity and metabolic syndrome pathologies / M. K. Gibas, K. J. Gibas. – DOI 10.1016/j.dsx.2017.03.022 // Diabetes and metabolic syndrome. – 2017. – Vol. 11, Suppl. 1. – P. S385–S390.

171. Golovinskaia, O. Review of Functional and Pharmacological Activities of Berries / O. Golovinskaia, C. K. Wang. – DOI 10.3390/molecules26133904 // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 13. – P. 3904.

172. Gunawan, S. Development of rat metabolic syndrome models: A review. / S. Gunawan, A. Aulia, V. Soetikno. – DOI 10.14202/vetworld.2021 // Veterinary world. – 2021. – Vol. 14, № 7. – P. 1774–1783.

173. Gut microbiota and metabolic syndrome / P.-X. Wang, X.-R. Deng, C.-H. Zhang, H.-J. Yuan. – DOI 10.1097/CM9.0000000000000696 // Chinese Medical Journal. – 2020. – Vol. 133. – P. 808–816.

174. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms / M. Neri, M. Scuto, M. L. Ontario [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 4. – P. 1250.

175. Heinonen, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective / M. Heinonen. – DOI 10.1002/mnfr.200700006 // Molecular Nutrition & Food Research. – 2007. – Vol. 51, № 6. – P. 684–691.

176. High-Mobility Group Box-1 Is Associated With Obesity, Inflammation, and Subclinical Cardiovascular Risk Among Young Adults / L. Chen, H. Zhu, S. Su [et al.]. – DOI 10.1161/atvbaha.120.314599 // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2020. – Vol. 40, № 11. – P. 2776–2784.

177. Highly Active Cranberry's Polyphenolic Fraction: New Advances in Processing and Clinical Applications / A. Colletti, L. Sangiorgio, A. Martelli [et al.]. – DOI 10.3390/nu13082546 // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, № 8. – P. 2546.

178. HMGB1-driven inflammation and intimal hyperplasia after arterial injury involves cell-specific actions mediated by TLR4 / J. Cal, H. Yuan, Q. Wang [et al.]. – DOI 10.1161/ATVBAHA.115.305789 // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2015. – Vol. 35, № 12. – P. 2579–2593.

179. How are your berries? Perspectives of Alaska's environmental managers on trends in wild berry abundance / J. Hupp, M. Brubaker, K. Wilkinson, J. Williamson. – DOI 10.3402/ijch.v74.28704 // International Journal of Circumpolar Health. – 2015. – Vol. 74. – P. 28704.

180. Hussain, T. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? / T. Hussain, B. Tan, Y. Yin. – DOI 10.1155/2016/7432797 // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2016. – Vol. 2016. – P. 7432797.

181. Impact Mineralization of Chokeberry and Cranberry Fruit Juices Using a New Functional Additive on the Protection of Bioactive Compounds and Antioxidative Properties / S. Lachowicz, J. Oszmiański, M. Wilczyńska [et al.]. – DOI 10.3390/molecules25030659 // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 3. – P. 659.

182. In Sickness and in Health: The Oxygen Reactive Species and the Bone / J. Reis, A. Ramos. – DOI 10.3389/fbioe.2021.745911 // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Vol. 9.

183. In vitro antiviral activity of a series of wild berry fruit extracts against representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae / L. Nikolaeva-Glomb, L. Mukova, N. Nikolova. – DOI 10.1177/1934578X1400900116 // Natural Product Communications. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 51–54.

184. In vitro studies on the relationship between the antioxidant activities of some berry extracts and their binding properties to serum albumin / J. Namiesnik, K. Vearasilp, A. Nemirovski [et al.] // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – Vol. 72, № 6. – P. 2849–2865.

185. Increase in liver cytosolic lipases activities and VLDL-TAG secretion rate do not prevent the non-alcoholic fatty liver disease in cafeteria diet-fed rats / A. F. de Melo, C. Moreira, C. Sales [et al.]. – DOI 10.1016/j.biochi.2018.04.021 // Biochimie. – 2018. – Vol. 150. – P. 16–22.

186. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics / K. Viljanen, P. Kylli, R. Kivikari, M. Heinonen. – DOI 10.1021/jf049198n // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – Vol. 52, № 24. – P. 7419–7424.

187. Inhibition of the adherence of P-fimbriated Escherichia coli to uroepithelial-

cell surfaces by pro- anthocyanidin extracts from cranberries / A. B. Howell, N. Vorsa, A. Der Marderosian, L. Y. Foo. – DOI 10.1056/NEJM199810083391516 // New England Journal of Medicine. – 1998. – Vol. 339, № 15. – P. 1085–1086.

188. Insulin Action, Glucose Homeostasis and Free Fatty Acid Metabolism: Insights From a Novel Model / D. Stefanovski, N. M. Punjabi, R. C. Boston, R. M. Watanabe – DOI 10.3389/fendo.2021.625701 // Frontiers in Endocrinology. – 2021. – Vol. 12. – P. 625701.

189. Jepson, R. G. Cranberries for preventing urinary tract infections / R. G. Jepson, G. Williams, J. C. Craig. – DOI 10.1002/14651858.CD001321.pub5 // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2012. – № 10. – P. CD130021.

190. Johnson, B. J. Genus vaccinium: medicine, cosmetics, and coatings / B. J. Johnson, B. Lin, J. E. Bongard. – DOI 10.2174/187220810791110732 // Recent Patents on Biotechnology. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P. 112–124.

191. Joseph, J. A. Fruit polyphenols and their effects on neuronal signaling and behavior in senescence / J. A. Joseph, B. Shukitt-Hale, F. C. Lau. – DOI 10.1196/annals.1395.052 // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2007. – Vol. 1100. – P. 470–485.

192. Kao, T. W. Recent Progress in Metabolic Syndrome Research and Therapeutics / T. W. Kao, C. C. Huang. – DOI 10.3390/ijms22136862 // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 6862.

193. Kershaw, E. E. Adipose tissue as an endocrine organ / E. E. Kershaw, J. S. Flier. – DOI 10.1210/jc.2004-0395 // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2004. – Vol. 89, № 6. – P. 2548–2556.

194. Kosuru, R. Pterostilbene ameliorates insulin sensitivity, glycemic control and oxidative stress in fructose-fed diabetic rats / R. Kosuru, S. Singh // Life Sciences. – 2017. – Vol. 182. – P. 112–121.

195. Koupý, D. Effectiveness of phytotherapy in supportive treatment of type 2 diabetes mellitus Billberry (*Vaccinium myrtillus*) / D. Koupý, H. Kotolová, J. Kučerová // Ceska a Slovenska Farmacie. – 2015. – Vol. 64, № 1–2. – P. 3–6.

196. Lätti, A. K. Phenolic compounds in berries and flowers of a natural hybrid

between bilberry and lingonberry (*Vaccinium × intermedium* Ruthe) / A. K. Lätti, K. R. Riihinen, L. Jaakola. – DOI 10.1016/j.phytochem.2011.02.015 // *Phytochemistry*. – 2011. – Vol. 72, № 8. – P. 810–815.

197. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population / R. N. Feng, S. S. Du, C. Wang [et al.]. – DOI 10.3748/wjg.v20.i47.17932 // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20. – P. 17932–17940.

198. Lee, J. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study / J. Lee, R. W. Durst, R. E. Wrolstad. – DOI 10.1093/jaoac/88.5.1269 // *Journal of AOAC International*. – 2005. – Vol. 88. – P. 1269–1278.

199. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) and European cranberry (*Vaccinium microcarpon*) proanthocyanidins: isolation, identification, and bioactivities / P. Kylli, L. Nohynek, R. Puupponen-Pimiä [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59, № 7. – P. 3373–3384.

200. Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Exhibits Antidiabetic Activities in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity / H. M. Eid, M. Ouchfoun, A. Brault [et al.]. – DOI 10.1155/2014/645812 // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 645812.

201. Liu, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals / R. H. Liu. – DOI 10.1093/ajcn/78.3.517S // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2003. – Vol. 78, № 3. – P. 517S–520S.

202. Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome / A. Basu, N. M. Betts, J. Ortiz [et al.]. – DOI 10.1016/j.nutres.2011.02.003 // *Nutrition Research*. – 2011. – Vol. 31, № 3. – P. 190–196.

203. Lucanic, M. Pharmacological lifespan extension of invertebrates / M. Lucanic, G. J. Lithgow, S. Alavez. – DOI 10.1016/j.arr.2012.06.006 // *Ageing Research Reviews*. – 2013. – Vol. 12, № 1. – P. 445–458.

204. Magnetic resonance imaging as a tool to image neuroinflammation in a rat model of Parkinson's disease – phagocyte influx to the brain is promoted by bilberry-enriched diet / A. Virel, A. Rehnmark, G. Orädd [et al.]. – DOI 10.1111/ejn.13044 // *European Journal of Neuroscience*. – 2015. – Vol. 42, № 10. – P. 2761–2771.

205. Manitoba Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) Bioactivities in Ischemia-Reperfusion Injury / C. K. Isaak, J. C. Petkau, S. C. Debnath, Y. L. Siow // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 63, № 23. – P. 5660–5669.

206. Martínez-González, M. A. The major European dietary patterns and metabolic syndrome / M. A. Martínez-González, N. Martín-Calvo. – DOI 10.1007/s11154-013-9264-6 // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* – 2013. – Vol. 14. – P. 265–271.

207. McKay, D. L. Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors / D. L. McKay, J. B. Blumberg. – DOI 10.1301/nr.2007.nov.490-502 // *Nutrition Reviews*. – 2007. – Vol. 65, № 11. – P. 490–502.

208. Mechanisms of Comorbidities Associated with the Metabolic Syndrome: Insights from the JCR:LA-cp Corpulent Rat Strain / A. Diane, W. D. Pierce, S. E. Kelly. [et al.]. – DOI 10.3389/fnut.2016.00044 // *Frontiers in Nutrition*. – 2016. – Vol. 3. – P. 44.

209. Mechanisms of obesity-induced hypertension / V. Kotsis, S. Stabouli, S. Papakatsika [et al.]. – DOI 10.1038/hr.2010.9 // *Hypertension Research*. – 2010. – Vol. 33, № 5. – P. 386–393.

210. Mediterranean products as promising source of multi-target agents in the treatment of metabolic syndrome / D. Bagetta, A. Maruca, A. Lupia [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2019.111903 // *European journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol. 186. – P. 111903.

211. Melough, M. M. The Role of AOPP in Age-Related Bone Loss and the Potential Benefits of Berry Anthocyanins / M. M. Melough, X. Sun, O. K. Chun. – DOI 10.3390/nu9070789 // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 9, № 7. – P. E789.

212. Metabolic aspects of the relationship of asthma and obesity / O. Y. Kytikova, M. V. Antonyuk, T. A. Gvozdenko, T. P. Novgorodtseva. – DOI

10.14341/omet9578 // Obesity and Metabolism. – 2019. – Vol. 15, № 4. – P. 9–14.

213. Metabolic Syndrome / S. Swarup, A. Goyal, Y. Grigorova, R. Zeltser. – USA : Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

214. Metabolic syndrome and the risk of mild cognitive impairment and progression to dementia: follow-up of the Singapore longitudinal ageing study cohort / T. P. Ng, L. Feng, M. S. Nyunt [et al.]. – DOI 10.1001/jamaneurol.2015.4899 // Jama Neurology. – 2016. – Vol. 73. – P. 456–463.

215. Metabolic syndrome criteria and its association with type 2 diabetes and cardiovascular diseases / D. Yadav, N. Puranik, A. Sen [et al.]. – DOI 10.23751/pn.v22i2.8316 // Progress in Nutrition. – 2020. – Vol. 22, № 2. – P. 361–369.

216. Metabolic Syndrome Fact Sheet 2021: Executive Report / J. H. Huh, D. R. Kang, J. Y. Kim, K. K. Koh. – DOI 10.51789/cmsj.2021.1.e15 // Journal of the Cardiometabolic Syndrome. – 2021. – Vol. 1, № 2. – P. 125–134.

217. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021 / G. Fahed, L. Aoun, M. B. Zerdan [et al.]. – DOI 10.3390/ijms23020786 // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 2. – P. 786.

218. Metformin prevents vascular prostanoid release alterations induced by a high-fat diet in rats / H. J. Lee, S. M. Cantú, A. S. Donoso [et al.]. – DOI 10.1111/aap.12057 // Autonomic and autacoid pharmacology. – 2017. – Vol. 37, № 3. – P. 37–43.

219. Mickelsen, O. Experimental obesity. I. Production of obesity in rats by feeding high-fat diets: three figures / O. Mickelsen, S. Takaiishi, C. Craig. – DOI 10.1093/jn/57.4.541 // Journal of Nutrition. – 1955. – Vol. 57, № 4. – P. 541–554.

220. Microbiota and metabolic diseases / A. Pascale, N. Marchesi, C. Marelli [et al.]. – DOI 10.1007/s12020-018-1605-5 // Endocrine. – 2018. – Vol. 61, № 3. – P. 357–371.

221. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats / X. Terra, V. Pallares, A. Ardevol [et al.]. – DOI 10.1016/j.jnutbio.2010.03.006 // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2011. – Vol. 22. – P. 380–387.

222. Moore, J. X. Metabolic Syndrome Prevalence by Race / Ethnicity and Sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-2012 / J. X. Moore, N. Chaudhary, T. Akinyemiju. – DOI 10.5888/pcd14.160287 // Preventing Chronic Disease. – 2017. – Vol. 14. – P. E24.

223. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.

224. Multi-laboratory validation of a standard method for quantifying proanthocyanidins in cranberry powders / R. L. Prior, E. Fan, H. Ji [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2010. – Vol. 90. – P. 1473–1478.

225. Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome / L. Fellmann, A. R. Nascimento, E. Tibiriça, P. Bousquet. – DOI 10.1016/j.pharmthera.2012.11.004 // Pharmacology & Therapeutics. – 2013. – Vol. 137, № 3. – P. 331–340.

226. Natural Bioactive Compounds Useful in Clinical Management of Metabolic Syndrome / A. Noce, M. Di Lauro, F. Di Daniele [et al.]. – DOI 10.3390/nu13020630 // Nutrients. – 2021. – Vol. 13, № 2. – P. 630.

227. Neto, C. C. Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update / C. C. Neto, J. W. Amoroso, A. M. Liberty. – DOI 10.1002/mnfr.200700433 // Molecular Nutrition and Food Research. – 2008. – Vol. 52. – P. S18–S27.

228. Nutraceutical interventions for promoting healthy aging in invertebrate models / Y. Dong, S. Guha, X. Sun [et al.]. – DOI 10.1155/2012/718491 // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – Vol. 2012. – P. 718491.

229. Obesity, type 2 diabetes, and the metabolic syndrome: pathophysiologic relationships and guidelines for surgical intervention / L. Genser, J. R. C. Mariolo, L. Castagneto-Gissey [et al.]. – DOI 10.1016/j.suc.2016.03.013 // Surgical Clinics of North America. – 2016. – Vol. 96. – P. 681–701.

230. Panchal, S. K. Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats / S. K. Panchal, L. Ward, L. Brown. – DOI 10.1007/s00394-012-0358-9 // European Journal of Nutrition. – 2013. – Vol. 52, № 2. –

P. 559–568.

231. Panchal, S. K. Rodent Models for Metabolic Syndrome / S. K. Panchal, L. Brown. – DOI 10.1155/2011/351982 // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2011. – Vol. 2011. – P. 351982.

232. Pandir, D. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on cisplatin induced ovarian damage in rat / D. Pandir, O. Kara, M. Kara // Cytotechnology. – 2014. – Vol. 66, № 4. – P. 677–685.

233. Pappas, E. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability / E. Pappas, K. M. Schaich // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2009. – Vol. 49. – P. 741–781.

234. Peckham, S. C. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat / S. C. Peckham, C. Entenman // Research and development technical report. – 1962. – № 5. – P. 23.

235. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits / J. A. Vinson, X. Su, L. Zubik, P. Bose. – DOI 10.1021/jf0009293 // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2010. – Vol. 49. – P. 5315–5321.

236. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars in the United States / V. D. Truong, R. F. McFeeters, R. T. Thompson [et al.]. – DOI10.1111/j.1750-3841.2007.00415.x // Journal of Food Science. – 2007. – Vol. 72, № 6. – P. 343–349.

237. Phenolic compounds from berries of three *vaccinium* species / E. A. Belova, A. E. Gulyaev, L. V. Kovalenko [et al.] // Chemistry of natural compounds. – 2016. – Vol. 52, № 2. – P. 329–330.

238. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways / M. Rebollo-Hernanz, Q. Zhang, Y. Aguilera [et al.]. – DOI 10.1016/j.fct.2019.110672 // Food and Chemical Toxicology. – 2019. – Vol. 132. – P. 110672.

239. Phytopharmacology and Clinical Updates of *Berberis* Species Against

Diabetes and Other Metabolic Diseases / T. Belwal, A. Bisht, H. Prasad [et al.]. – DOI 10.3389/fphar.2020.00041 // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 41.

240. Polyphenolic profiles and antioxidant and antiradical activity of Italian berries from *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium uliginosum* L. subsp. *gaultherioides* (Bigelow) S.B. Young / C. Ancillotti, L. Ciofi, D. Pucci [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016. – № 204. – P. 176–184.

241. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability / C. Di Lorenzo, F. Colombo, S. Biella, C. Stockley [et al.]. – DOI 10.3390/nu13010273 // *Nutrients*. – 2021. – Vol. 13, № 1.

242. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review / F. F. Anhê, Y. Desjardins, G. Pilon [et al.]. – DOI 10.1016/j.phanu.2013.07.004 // *Pharma Nutrition*. – 2013. – № 1. – P. 105–114.

243. Poor Sleep Is Related to Metabolic Syndrome Severity in Adolescents With PCOS and Obesity / S. Simon, H. Rahat, A. M. Carreau [et al.]. – DOI 10.1210/clinem/dgz285 // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2020. – V. 105, № 4. – P. 1827–1834.

244. Prasain, J. K. Cranberry anti-cancer compounds and their uptake and metabolism: An updated review / J. K. Prasaina, C. Grubbsb, S. Barnes. – DOI 10.3233/JBR-180370 // *Journal of Berry Research*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1–10.

245. Prenylated Flavonoids with Potential Antimicrobial Activity: Synthesis, Biological Activity, and In Silico Study / M. Osorio, M. Carvajal, A. Vergara [et al.]. – DOI 10.3390/ijms22115472 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 11.

246. Prevalence and associated factors of metabolic syndrome in adults: a population-based epidemiological survey in Jiangxi province, China / L. T. Wu, Y. F. Shen, L. Hu [et al.]. – DOI 10.1186/s12889-020-8207-x // *BMC Public Health*. – 2020. – Vol. 20, № 1. – P. 133.

247. Prevalence and trends of metabolic syndrome among adults in the asiapacific region: a systematic review / P. Ranasinghe, Y. Mathangasinghe, R. Jayawardena [et al.]. – DOI 10.1186/s12889-017-4041-1 // *BMC Public Health*. – 2017.

– Vol. 17. – P. 101.

248. Prevalence of Metabolic Syndrome among Iranian Population: A Systematic Review and Meta-analysis / S. Dalvand, S. H. Niksima, R. Meshkani [et al.] // *Iranian Journal of Public Health*. – 2017. – Vol. 46, № 4. – P. 456–467.

249. Prevalence of the metabolic syndrome and its components in Northwest Russia: The Arkhangelsk study / O. Sidorenkov, O. Nilssen, T. Brenn [et al.] // *BMC Public Health*. – 2010. – Vol. 10. – P. 23.

250. Prevention of urinary tract infections with vaccinium products / E. Davidson, B. F. Zimmermann, E. Jungfer, S. Chrubasik-Hausmann // *Phytotherapy Research*. – 2014. – Vol. 28, № 3. – P. 465–470.

251. Proanthocyanidins and Where to Find Them: A Meta-Analytic Approach to Investigate Their Chemistry, Biosynthesis, Distribution, and Effect on Human Health / G. Mannino, G. Chinigò, G. Serio [et al.]. – DOI 10.3390/antiox10081229 // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10, № 8. – P. 1229.

252. Quantitative endogenous peptidomics analysis of the type-2 diabetic clinical serum samples / H. Niu, H. Zhang, J. Peng [et al.]. – DOI 10.3724/SP.J.1123.2019.03012 // *Chinese Journal of Chromatography*. – 2019. – Vol. 37, № 8. – P. 853–862.

253. Radiolabelled cyanidin 3-O-glucoside is poorly absorbed in the mouse / C. Felgines, S. Krisa, A. Mauray [et al.]. – DOI 10.1017/S0007114510000061 // *British Journal of Nutrition*. – 2010. – Vol. 103, № 12. – P. 1738–1745.

254. Rastelli, M. Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders / M. Rastelli, C. Knauf, P. D. Cani. – DOI 10.1002/oby.22175 // *Obesity*. – 2018. – Vol. 26. – P. 792–800.

255. Redox changes in obesity, metabolic syndrome, and diabetes / B. Korac, A. Kalezić, V. Pekovic-Vaughan [et al.]. – DOI 10.1016/j.redox.2021.101887 // *Redox Biology*. – 2021. – Vol. 42. – P. 10887.

256. Reduced-energy cranberry juice increases folic acid and adiponectin and reduces homocysteine and oxidative stress in patients with the metabolic syndrome / T. N. Simão, M. A. Lozovoy, A. N. Simão [et al.] // *British Journal of Nutrition*. – 2013. –

Vol. 110, № 10. – P. 1885–1894.

257. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort / E. Org, Y. Blum, S. Kasela [et al.]. – DOI 10.1186/s13059-017-1194-2 // *Genome Biology*. – 2017. – Vol. 18. – P. 70.

258. Results of the use of antioxidant and angioprotective agents in type 2 diabetes patients with diabetic retinopathy and age-related macular degeneration / L. K. Moshetova, I. V. Vorob'eva, I. B. Alekseev, L. G. Mikhaleva // *Vestnik Oftalmologii*. – 2015. – Vol. 131, № 3. – P. 34–40.

259. Ricci, M. Laboratory animal diets: A critical part of your in vivo research / M. Ricci, E. A. Ulman // *Animal Lab News*. – 2005. – Vol. 4. – P. 1–6.

260. Rothwell, N. J. Reduced lipogenesis in cafeteria-fed rats exhibiting diet-induced thermogenesis / N. J. Rothwell, M. J. Stock, P. Trayhurn. – DOI 10.1007/BF01122453 // *Bioscience reports*. – 1983. – Vol. 3, № 3. – P. 217–224.

261. Saklayen, M. G. The global epidemic of the metabolic syndrome / M. G. Saklayen. – DOI 10.1007/s11906-018-0812-z // *Current Hypertension Reports*. – 2018. – Vol. 20, № 2. – P. 12.

262. Significance of Microbiota in Obesity and Metabolic Diseases and the Modulatory Potential by Medicinal Plant and Food Ingredients / H. M. Eid, M. L. Wright, N. V. Anil Kumar [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 387.

263. Singleton, V. L. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós // *Methods Enzymol*. – 1999. – Vol. 299. – P. 152–178.

264. Smeriglio, A. Health effects of *Vaccinium myrtillus* L.: evaluation of efficacy and technological strategies for preservation of active ingredients / A. Smeriglio, D. Monteleone, D. Trombetta // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 14, № 7. – P. 567–584.

265. Soft drink, 100% fruit juice, and vegetable juice intakes and risk of diabetes mellitus / E. S. Eshak, H. Iso, T. Mizoue [et al.]. – DOI 10.1016/j.clnu.2012.08.003 // *Clinical Nutrition*. – 2013. – Vol. 32. – P. 300–308.

266. Soleiumani, M. The role of salt in the pathogenesis of fructose-induced hypertension / M. Soleiumani, P. Alborzi. – DOI 10.4061/2011/392708 // International Journal of Nephrology. – 2011. – Vol. 2011. – P. 392708.

267. Statistical significance of quantitative PCR / Y. Karlen, A. McNair, S. Perseguers [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2007. – Vol. 8. – P. 131.

268. Stearidonic acid combined with alpha-linolenic acid improves lipemic and neurological markers in a rat model subject to a hypercaloric diet / C. Cardoso, J. P. Martinho, P. A. Lopes [et al.]. – DOI 10.1016/j.plefa.2018.07.010 // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2018. – Vol. 135. – P. 137–146.

269. Stefan, N. Causes, Characteristics, and Consequences of Metabolically Unhealthy Normal Weight in Humans / N. Stefan, F. Schick, H. U. Häring // Cell Metabolism. – 2017. – Vol. 26, № 2. – P. 292–300.

270. Study to Assess the Therapeutic Effect of Enalapril on Olanzapine Induced Metabolic Syndrome in Wistar Rats / A. Arivazhahan, L. K. Bairy, V. Nayak, S. K. Kunder. – DOI 10.7860/JCDR/2017/24049.9380 // Journal of Clinical and Diagnostic Research. – 2017. – Vol. 11, № 2. – P. FF1-FF6.

271. Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan / S. Guha, O. Natarajan, C. G. Murbach. [et al.]. – DOI 10.3390/nu6020911 // Nutrients. – 2014. – Vol. 6. – P. 911–921.

272. System-wide Benefits of Intermeal Fasting by Autophagy / N. Martinez-Lopez, E. Tarabra, M. Toledo [et al.]. – DOI 10.1016/j.cmet.2017.09.020 // Cell Metabolism. – 2017. – Vol. 26, № 6. – P. 856–871.

273. Table grape consumption reduces adiposity and markers of hepatic lipogenesis and alters gut microbiota in butter fat-fed mice / J. Baldwin, B. Collins, P. G. Wolf [et al.]. – DOI 10.1016/j.jnutbio.2015.08.027 // Journal of Nutritional Biochemistry. – 2016. – Vol. 27. – P. 123–135.

274. The effects of *Ficus carica* on the activity of enzymes related to metabolic syndrome / R. Mopuri, M. Ganjavi, B. Meriga [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2018. – Vol. 26, № 1. – P. 201–210.

275. The longevity effect of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is

modulated by daf-16 and osr-1 / S. Guha, M. Cao, R. M. Kane [et al.]. – DOI 10.1007/s11357-012-9459-x // *Age (Dordr)*. – 2013. – Vol. 35, № 5. – P. 1559–1574.

276. The metabolic syndrome / R. Kahn, J. Buse, E. Ferrannini, M. Stern. – DOI 10.1016/S0140-6736(05)67778-1 // *Lancet*. – 2005. – Vol. 366, № 9501. – P. 1921–1922.

277. The metabolic syndrome and cardiovascular risk: A systematic review and meta-analysis / S. Mottillo, K. B. Filion, J. Genest [et al.]. – DOI 10.1016/j.jacc.2010.05.034 // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2010. – Vol. 56, № 14. – P. 1113–1132.

278. The metabolic syndrome and risk of sudden cardiac death: The atherosclerosis risk in communities study / P. L. Hess, H. R. Al-Khalidi, D. J. Friedman [et al.]. – DOI 10.1161/JAHA.117.006103 // *Journal of the American Heart Association*. – 2017. – Vol. 6, № 8. – P. e006103.

279. The Prevalence of Metabolic Syndrome and its Related Factors among Adults in Palestine: A Meta-Analysis / A. H. Bilbeis, S. Shab-Bidar, D. Jackson, K. Djafarian. – DOI 10.4314/ejhs.v27i1.10 // *Ethiopian Journal of Health Sciences*. – 2017. – Vol. 27, № 1. – P. 77–84.

280. The prevalence of metabolic syndrome and metabolically healthy obesity in Europe: a collaborative analysis of ten large cohort studies / J. V. van Vliet-Ostaptchouk, M-L. Nuotio, S. N. Slagter [et al.]. – DOI 10.1186/1472-6823-14-9 // *BMC Endocrine Disorders*. – 2014. – Vol. 14. – P. 9.

281. The protective effects of bilberry and lingonberry extracts against UV light-induced retinal photoreceptor cell damage in vitro / K. Ogawa, K. Tsuruma, J. Tanaka [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, № 43. – P. 10345–53.

282. The Review of Anti-aging Mechanism of Polyphenols on *Caenorhabditis elegans* / L. Liu, P. Guo, P. Wang [et al.]. – DOI 10.3389/fbioe.2021.635768 // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – Vol. 9. – P. 635768.

283. Threat vigilance and socioeconomic disparities in metabolic health / C. E. Hostinar, K. M. Ross, M. Chan, E. Chen [et al.]. – DOI 10.1017/S0954579417001353 //

Development and Psychopathology. – 2017. – Vol. 29, № 5. – P. 1721–1733.

284. Tran, L. T. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension / L. T. Tran, V. G. Yuen, J. H. McNeill. – DOI 10.1007/s11010-009-0184-4 // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2009. – Vol. 332, № 1–2. – P. 145–159.

285. Trends in the prevalence of metabolic syndrome and its components in South Korea: Findings from the Korean National Health Insurance Service Database (2009–2013) / S. E. Lee, K. Han, Y. M. Kang [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0194490 // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 3. – P. e0194490.

286. Triggering Akkermansia with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? / F. F. Anhê, G. Pilon, D. Roy [et al.]. – DOI 10.1080/19490976.2016.1142036 // Gut Microbes. – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 146–153.

287. Trimethylamine N-Oxide: A Link among Diet, Gut Microbiota, Gene Regulation of Liver and Intestine Cholesterol Homeostasis and HDL Function / M. Canyelles, M. Tondo, L. Cedó [et al.]. – DOI 10.3390/ijms19103228 // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19, № 10. – P. 3228.

288. Understanding the Role of the Gut Microbiome and Microbial Metabolites in Obesity and Obesity-Associated Metabolic Disorders: Current Evidence and Perspectives / N. Vallianou, T. Stratigou, G. S. Christodoulatos, M. Dalamaga. – DOI 10.1007/s13679-019-00352-2 // Current Obesity Reports. – 2019. – № 8. – P. 317–332.

289. Vaccinium virgatum fruit extract as an important adjuvant in biochemical and behavioral alterations observed in animal model of metabolic syndrome / P. S. Oliveira, M. Gazal, N. P. Flores [et al.]. – DOI 10.1016/j.biopha.2017.01.121 // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2017. – Vol. 88. – P. 939–947.

290. Vendrame, S. Potential Factors Influencing the Effects of Anthocyanins on Blood Pressure Regulation in Humans: A Review / S. Vendrame, D. Klimis-Zacas. – DOI 10.3390/nu11061431 // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, № 6. – P. 1431.

291. Vinson, J. A. Cranberries and cranberry products: powerful in vitro, ex vivo, and in vivo sources of antioxidants / J. A. Vinson, P. Bose, J. Proch. – DOI 10.1021/jf073309b // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – Vol. 56. –

P. 5884–5891.

292. Vorob'eva, I. V. Current data on the role of anthocyanosides and flavonoids in the treatment of eye diseases / I. V. Vorob'eva. – DOI 10.17116/oftalma20151315104-108 // Vestnik Oftalmologii. – 2015. – Vol. 131, № 5. – P. 104–110.

293. Wang, H. H. Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome / H. H. Wang, D. K. Lee, M. Liu. – DOI 10.5223/pghn.2020.23.3.189 // Pediatric Gastroenterology Hepatology Nutrition. – 2020. – Vol. 23, № 3. – P. 189–230.

294. Watanabe, J. Metabolic Syndrome for Cardiovascular Disease Morbidity and Mortality Among General Japanese People: A Mini Review / J. Watanabe, K. Kotani. – DOI 10.2147/VHRM.S245829 // Vascular Health and Risk Management. – 2020. – Vol. 16. – P. 149–155.

295. White, B. L. Polyphenolic composition and antioxidant capacity of extruded cranberry pomace / B. L. White, L. R. Howard, R. L. Prior. – DOI 10.1021/jf902838b // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2010. – Vol. 58, № 7. – P. 4037–4042.

296. Whole Grain Products, Fish and Bilberries Alter Glucose and Lipid Metabolism in a Randomized, Controlled Trial: The Sysdimet Study / M. Lankinen, U. Schwab, M. Kolehmainen [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0022646 // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, № 8. – P. e22646.

297. Yamakawa, M. Y. Anthocyanin suppresses the toxicity of A β deposits through diversion of molecular forms in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease / M. Y. Yamakawa, K. Uchino, Y. Watanabe. – DOI 10.1179/1476830515Y.0000000042 // Nutritional Neuroscience. – 2016. – Vol. 19, № 1. – P. 32–42.

298. Yang, C. S. Studies on prevention of obesity, metabolic syndrome, diabetes, cardiovascular diseases and cancer by tea / C. S. Yang, H. Wang, Z. P. Sheridan. – DOI 10.1016/j.jfda.2017.10.010 // Journal of Food and Drug Analysis. – 2018. – Vol. 26, № 1. – P. 1–13.

299. Yao, Y. Protective activities of Vaccinium antioxidants with potential

relevance to mitochondrial dysfunction and neurotoxicity / Y. Yao, A. Vieira. – DOI 10.1016/j.neuro.2006.07.015 // *Neurotoxicology*. – 2007. – Vol. 28, № 1. – P. 93–100.

300. Yeo, R. The Association between Food Group Consumption Patterns and Early Metabolic Syndrome Risk in Non-Diabetic Healthy People / R. Yeo, S. R. Yoon, O. Y. Kim. – DOI 10.7762/cnr.2017.6.3.172 // *Clinical Nutrition Research*. – 2017. – Vol. 6, № 3. – P. 172–182.

301. Zheng, W. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries / W. Zheng, S. Y. Wang. – DOI 10.1021/jf020728u // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – № 51. – P. 502–509.