

**Ковалева
Мария Александровна**

**ФАРМАКОЛОГИЯ ХИНОНОВ ПРИРОДНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ОЦЕНЕННАЯ В
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ НАРУШЕНИЙ
УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2015

Работа выполнена в ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации» и ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Шабанов Петр Дмитриевич

доктор медицинских наук,
профессор

Макарова Марина Николаевна

Официальные оппоненты:

Лесиовская Елена Евгеньевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», ведущий научный сотрудник.

Субботина Татьяна Федоровна, доктор медицинских наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» МЗ РФ, кафедра биохимии, профессор кафедры

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» МЗ РФ

Защита состоится «___» _____ 20__ г. в ___ часов на заседании Диссертационного Совета Д 001.022.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» и на сайте института <http://www.iemrams.spb.ru/russian/dissov03.htm>

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

Доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Метаболический синдром (МС) по-прежнему остается одной из самых изучаемых патологий в мире в связи с тем, что сходные нарушения метаболизма отмечаются при таких распространенных заболеваниях современного человека как атеросклероз, артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа), ожирение. Следует отметить, что и сам МС со временем может стать причиной инсульта, инфаркта и СД 2 типа (Берштейн Л.М., Коваленко И.Г., 2010; Fitchett D., 2014).

Выделение метаболического синдрома в отдельную нозологическую форму имеет большое клиническое значение, поскольку, с одной стороны, данное состояние обратимо, то есть при соответствующем лечении и изменении образа жизни можно добиться излечения или уменьшения выраженности основных его проявлений, а с другой стороны, МС предшествует возникновению заболеваний, являющихся в настоящее время основными причинами повышенной смертности (в том числе и сахарного диабета 2 типа). Диагностировать МС необходимо для решения вопроса о тактике ведения больного, поскольку среди лиц с МС риск развития ишемической болезни сердца и/или инсульта в 3 раза выше, при этом значительно увеличивается смертность (Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2001; Симоненко В.Б., 2006; Чибисов С.М., 2008; Гинсар Е.А., 2010; Национальные рекомендации ВНОК, 2010; Василькова Т.Н. и др., 2014).

Метаболический синдром характеризуется комплексом нарушений системной регуляции липидного, углеводного, белкового обмена веществ, под действием внешних и внутренних факторов (Строев Ю.И. и др. 20 07; Шилов А.М., 2010; Балева Е.С. и др. 2013), при этом происходит нарушение механизмов регуляции функции эндотелия, что в дальнейшем приводит к нарушению артериального давления. В основе данных процессов лежит снижение чувствительности тканей к инсулину – инсулинорезистентность (ИР) (Аминева Н.В., 2002; Дедов И.И., 2003).

В последние годы для коррекции МС, для развития которого важное значение имеет длительный и выраженный окислительный стресс, активно применяются антиоксидантные препараты природного и синтетического происхождения. Перспективными соединениями, широко распространенными в природном сырье являются хиноны, которые представляют большую группу химических соединений, для которых установлены антиоксидантный (Брюханов В.М., 2011), антигипоксический (Олейник С. А., 2008), гипотензивный и гипогликемические фармакологические эффекты (Tracy S. et al., 2006).

Степень разработанности темы исследования

Теоретические аспекты метаболических патологий, в развитии которых важное значение имеет длительный и выраженный окислительный стресс, изучались многими отечественными и зарубежными учеными (Шишкин А.Н.,

Ефимов А.С., Берштейн Л.М., Fitchett D., Jahromi M.M). На сегодняшний день для терапии метаболических патологий, в частности МС и СД 2 типа в большей степени используют комплексную терапию, в состав которой входят гипогликемические средства различных групп (бигуаниды, глиниды, инкретиномиметики и др.). На российском фармацевтическом рынке в ограниченном количестве представлены антиоксидантные препараты группы хинонов для терапии СД и МС (убихинон, кудесан и др.). Однако они в недостаточной степени решают задачи успешного лечения МС и СД 2 типа. Все вышесказанное определило цели и задачи данного исследования.

Цель исследования

Изучить фармакологические и биохимические свойства хинонов природного происхождения в экспериментальных моделях нарушений углеводного и липидного обмена.

Задачи исследования

1. Оценить антигипергликемический и антиоксидантный эффекты комплексного препарата из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ), убидекаренона, сухого экстракта бадана при моделировании экспериментального стрептозотоцин-индуцированного диабета (диабет смешанного типа) на мышцах самцах.

2. Установить возможное актопротекторное действие хинонсодержащих препаратов в тесте «принудительное плавание» и их влияния на углеводный обмен.

3. Оценить панкреопротекторный, антигипергликемический и гиполипидемический эффекты убидекаренона в широком диапазоне доз при моделировании экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета на детенышах (самцы и самки) крыс линии Вистар.

4. Изучить гиполипидемический и гипогликемический эффекты сухого экстракта бадана при моделировании экспериментального метаболического синдрома, вызванного высококалорийной диетой (рацион «диета кафетерия»).

Научная новизна исследования

Впервые с использованием батареи верифицированных методов метаболических нарушений (комбинация экспериментальных моделей) исследованы фармакологические эффекты препаратов, имеющих в основе хиноны природного происхождения. Для комплексного препарата из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ) установлены антиоксидантный и гипогликемический эффекты. Эти эффекты выявлены впервые для данного типа субстанций, что открывает перспективы их углубленного изучения в качестве антигипергликемических средств.

Впервые выявлено панкреопротекторное действие убидекаренона.

Установлено влияние сухого экстракта бадана на липидный и углеводный обмена. Несмотря на то, что листья бадана относятся к традиционному для народной медицины лекарственному сырью, доказательных исследований по идентификации основных типов действия (в первую очередь влияния на разные виды метаболизма) не проводилось. В настоящих исследованиях подтвержден выраженный гиполипидемический, гипогликемический и анорексигенный эффекты сухого экстракта бадана. Кроме того выявлена его актопротекторная активность, протекторная на фоне отсутствия лактоацидоза и гипогликемии в условиях предельной физической нагрузки (тест «принудительное плавание»). Полученные данные позволяют рекомендовать листья бадана для включения в перечень официальных растительных средств.

Научно-практическая значимость

Теоретическое значение работы определяется выявлением у хинонов природного происхождения фармакологических эффектов антиоксидантной направленности. В частности, доказано, что убидекаренон обладает антирадикальной активностью, антигиперлипидемическим и панкреопротекторным действием. Эти результаты стали предпосылкой к дальнейшему изучению его фармакологической активности и внедрению препарата Валеокор-Q10[®] (таблетка) в качестве кардиопротекторного метаболического средства (кардиотонического средства негликозидной структуры с антигипоксической и антиоксидантной активностью). У экстракта бадана установлены актопротекторное и гиполипидемическое действие. Данные использованы в российско-финском проекте SPECICROP, поддержанного Евросоюзом, как основа для проведения клинических исследований препарата в качестве растительного антигипоксанта и актопротектора. Полученные данные по комплексному препарату из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (шифр ПГНХМ) легли в основу получения госконтракта ФЦП «Фарма-2020», проект №14411.2049999.19.052 от 12.08.2014.

Методология и методы исследования

Методология исследования включала оценку биохимических показателей углеводного и липидного обменов, биометрических, патоморфологических и физиологических показателей в исследованиях «in vivo» после введения препаратов растительного и животного происхождения. Были использованы следующие экспериментальные модели: модель стрептозотоцин-индуцированного диабета на мышах, тест «Принудительное плавание», модель экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета на детенышах (самцы и самки) лабораторных крыс линии Wistar, модель экспериментального метаболического синдрома, вызванного высококалорийной диетой (рацион «Диета кафетерия»). Исследования выполнены с соблюдением всех принципов доказательной медицины.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Установлено антигипергликемическое и антиоксидантное действие препаратов, полученных на основе хинонов природного происхождения (комплексного препарата из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ), убидекаренона, сухого экстракта бадана) в модели стрептозотоцин-индуцированного диабета на мышах, а также в тесте «принудительное плавание».

2. Убидекаренон в диапазоне доз (2,6 мг/кг, 5,2 мг/кг, 7,4 мг/кг) проявил гипогликемическое, гиполипидемическое и панкреопротекторное действие на модели неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета.

3. В модели экспериментального метаболического синдрома, вызванного применением высококалорийного рациона «диета кафетерия» у спонтанно-гипертензивных крыс, установлено гипогликемическое и гиполипидемическое действие эффекта сухого экстракта бадана.

4. На основании полученных экспериментальных данных обосновано практическое применение (фармакотерапевтическая группа) природных соединений на основе хинонов в качестве антиоксидантов, антигипоксантов, метаболических средств, оказывающих гипогликемическое, гиполипидемическое и панкреопротекторное действие.

Степень достоверности и апробация материалов исследования

Степень достоверности определяется достаточным для статистической обработки данных опытов, выполненными на экспериментальных животных (132 крысы и 160 мышей) в экспериментах *in vivo*.

Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на международном конгрессе «Фитофарм-2012» (Санкт-Петербург, 2012), Международной интернет-конференции «Современные проблемы анатомии, гистологии и эмбриологии животных (Казань, 2012), Всероссийской молодежной конференции «Фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности. Доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов» (Уфа, 2012), IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012), Второй ежегодной школы-конференции Rus-LASA «Наука о лабораторных животных: современные подходы» (Санкт-Петербург, 2012), международном конгрессе «Фитофарм-2013» (Вена, 2013).

Апробация диссертации прошла на межкафедральном заседании в ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ.

Личное участие автора в выполнении исследования

Личный вклад соискателя заключается в самостоятельном проведении всех экспериментальных исследований (95%), включая работу с экспериментальными животными, проведение лабораторных тестов, статистическую обработку и

анализ полученных результатов (90%), в подготовку основных публикаций по теме работы (90%), написании диссертации и автореферата (95%).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов и выводов, заключения и практических рекомендаций, списка литературы. Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, включает в себя 36 таблиц, 31 рисунок. Список литературы содержит 173 источника, из них 120 иностранных авторов.

Основное содержание работы

Глава 1 представляет собой обзор литературы, посвященный метаболическим нарушениям: сахарному диабету 2 типа, метаболическому синдрому и подходам к их терапии (С. 9 – 41).

В **главе 2** отражены основные методы и экспериментальные модели исследования, которые были использованы при выполнении диссертационной работы (С. 41 – 61).

Глава 3 объединяет результаты собственных исследований (С. 61 – 106).

В **главе 4** представлено обсуждение полученных результатов.

В заключении представлены **выводы** (С. 110), **научно-практические рекомендации** (С. 111) и **список использованной литературы** (С.114).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий дизайн исследования

Объект исследования. В качестве объектов, содержащих хиноны, были использованы: 1) комплексный препарат из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ). Действующими веществами являются полигидроксинафтохиноны, в том числе спинохромы В и D, а так же биснафтохиноны. Препарат стандартизован по сумме полигидроксинафтохинонов с содержанием 0,02%; 2) убидекаренон (субстанция убидекаренона, содержание убидекаренона 99,2%; Lot № 1-091105, производитель QuimDis, Япония); 3) сухой экстракт Бадана (водный экстракт). Сухой экстракт Бадана, полученный по оригинальной методике.

Исследование гипогликемического и антиоксидантного действия тестируемых объектов на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного диабета 2 типа у мышей. Исследование выполнено на 110 нелинейных половозрелых мышцах-самцах весом 29-31 г. Продолжительность эксперимента составила 20 дней. Животным всех групп (кроме интактной) однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин (СТЗ; Sigma, США) в дозе 60 мг/кг с предварительным (за 15 мин) введением никотинамида

(интраперитонеально – 210 мг/кг) (Islam S., Choi H., 2007). В течение 10 дней животные находились под наблюдением. Начиная с 10-го дня после индукции патологии, мышам 6 групп ежедневно вводили тестируемые объекты по лечебной схеме в течение 10 дней: 1) интактная (животные без модельной патологии, без введения носителя); 2) контроль (модельная патология без лечения, введение носителя); 3) с введением комплекса ПГНХМ (модельная патология и терапия комплексом ПГНХМ, полученного из панциря морского ежа в дозе 1,8 мг/кг); 4) убидекаринона (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 11,4 мг/кг); 5) экстракта бадана (модельная патология и терапия экстрактом бадана в дозе 50 мг/кг); 6) метформина (модельная патология и терапия препаратом сравнения метформин в дозе 176 мг/кг).

В ходе исследования проводили определение концентрации глюкозы (методами сухой химии) в периферической крови на 10-й день – для оценки развития патологии и на 15-й и 20-й дни для оценки фармакологической активности тестируемых объектов. Также было проведено определение антиоксидантного статуса животных и влияние на него тестируемых объектов, для этого на 20-й день определяли концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ) в лизате эритроцитов, малонового диальдегида (МДА) в плазме крови и стабильных метаболитов оксида азота (СМОА) в плазме крови. После этого проводили эвтаназию животных в CO₂-камере с дальнейшим обескровливанием из полостей сердца.

Исследование актопротекторного действия тестируемых объектов в модели субмаксимальной нагрузки. Тест «принудительное плавание». Исследование актопротекторной активности было проведено на модели субмаксимальной физической нагрузки с использованием теста «принудительного плавания» (Porsolt R.D. 1977). Продолжительность эксперимента составила 8 дней. Исследование выполнено на 50 аутбредных мышах-самцах весом 19-22 г, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово РАМН». После адаптационного периода животные были распределены на 6 групп: 1) интактная (животные без модельной патологии, животные без модельной патологии, без введения носителя); 2) контроль (модельная патология без лечения, введение носителя); 3) с введением комплекса ПГНХМ (модельная патология и терапия комплексом ПГНХМ, полученного из панциря морского ежа в дозе 1,8 мг/кг); 4) убидекаренона (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 5,2 мг/кг); 5) экстракта бадана (модельная патология и терапия экстрактом бадана в дозе 3 мг/кг); 6) экстракта родиолы розовой (модельная патология и терапия препаратом сравнения экстракт родиолы розовой в дозе 9 мг/кг).

С 1-го по 7-й дни эксперимента животным (кроме интактной группы) ежедневно вводили тестируемые объекты по профилактической схеме. На 4 день исследования, через 4 ч после введения тестируемых объектов, животных (кроме интактной группы) подвергали субмаксимальной нагрузке. Тест «принудительное плавание» выполнен в цилиндрах высотой 25 см и диаметром 10 см с температурой воды 22±2⁰С. Окончанием теста считали погружение животного под воду не менее, чем на 7 секунд. После выполнения теста у животных

проводили измерение концентрации глюкозы и лактата в периферической крови (методом сухой химии). После этого животные были этаназированы в CO₂-камере.

Дизайн оценки панкреопротекторного и гиполипидемического действия тестируемых объектов на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного диабета. Исследование панкреопротекторной и гиполипидемической активности исследуемых субстанций было проведено в модели экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного СД2. Продолжительность эксперимента составила 60-т дней. Исследование выполнено на 72-х (36 крыс-самок и 36 крыс-самцов) детенышах крыс линии Wistar, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово РАМН». Крысятам в возрасте 3-5-ти дней (кроме интактной) однократно внутрибрюшинно вводили СТЗ (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг. Контроль развития патологии выполняли в 1-й день 4-ой недели. В эксперимент включали животных с концентрацией глюкозы в крови более 6,5 ммоль/л. Спустя 4 недели после введения СТЗ, животные были распределены на 6 групп: 1) интактная (животные без модельной патологии); 2) контроль (модельная патология без лечения); 3) с введением убидекаренона 7,4 мг/кг (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 7,4 мг/кг); 4) убидекаренона 5,2 мг/кг (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 5,2 мг/кг); 5) убидекаренона 2,6 мг/кг (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 2,6 мг/кг); 6) Янувии[®] (модельная патология и терапия препаратом сравнения Янувия[®] в дозе 10,7 мг/кг). После формирования групп крысам ежедневно вводили исследуемые субстанции по лечебной схеме в течение 4-х недель. Еженедельно у животных всех групп оценивали массу тела и концентрацию глюкозы в цельной крови, концентрацию инсулина в плазме крови определяли на 4-ой и 7-ой неделях. Определение концентрации триглицеридов и холестерина в плазме крови проводили на 7-ой неделе. После чего проводили этаназию животных в CO₂-камере с дальнейшим обескровливанием из полостей сердца и осуществляли забор поджелудочной железы для дальнейшего гистологического исследования.

Метод анализа гиполипидемического гипогликемического действия тестируемых объектов на модели экспериментального метаболического синдрома вызванного применением рациона «диета кафетерия». Исследование гипогликемического и панкреопротекторного действий тестируемых объектов было проведено в модели экспериментального метаболического синдрома на фоне применения рациона «диета кафетерия». Данная экспериментальная модель приводит к развитию «добровольной» гиперфагии, так как животным наряду со стандартным рационом предлагают высококалорийные продукты. Смешанный рацион приводит к увеличению массы животных, увеличению площади адипоцитов и постепенному развитию гипергликемии на фоне инсулинорезистентности. В данном случае механизм инсулинорезистентности рассматривается как рецепторный, то есть, за счет увеличения площади адипоцитов происходит уменьшение количества инсулиновых рецепторов на единицу площади клетки (Rolls B.J., 1980; Morris M.J., 2008; Heyne A., 2009; Caimari A., 2010). Продолжительность эксперимента

составила 11 недель. Исследование выполнено на 60 крысах линии SHR (spontaneously hypertensive rat), полученных из питомника лабораторных животных Института физиологии им. И.П.Павлова РАН. После адаптационного периода животные были распределены на 4 группы: 1) интактная (животные на стандартном рационе вивария); 2) контроль (модельная патология, т.е. рацион «диета кафетерия»); 3) с введением экстракта бадана 50 мг/кг (модельная патология, т.е. рацион «диета кафетерия» и терапия экстрактом бадана 50 мг/кг); 4) сибутрамина гидрохлорида (модельная патология, т.е. рацион «диета кафетерия» и терапия сибутрамином гидрохлоридом в дозе 1,5 мг/кг). Животные всех групп, кроме интактной, с первого дня исследования получали наряду со стандартным рационом вивария (комбикормом ПК-120-1, приготовленным по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.), диету содержащую 25-35% жиров и 25-30% легкоусвояемых углеводов в дополнение к стандартному рациону грызунов. С 1-го дня 6-й недели животным вводили исследуемые препараты ежедневно на протяжении 5-ти недель по лечебной схеме. В ходе эксперимента проводили еженедельное определение концентрации глюкозы, холестерина и триглицеридов. Определение концентрации инсулина и глюкозо-толерантный тест проводили на 1-й, 6-й и 11-й неделях эксперимента. Эвтаназию животных проводили в CO₂-камере. Также посмертально было проведено морфометрическое исследование адипоцитов и парапанкреатической жировой клетчатки.

Биохимические методы исследования

Определение концентрации глюкозы в цельной крови методами сухой химии. Проводили экспресс-методом при помощи глюкометра OneTouch Ultra Easy фирмы «Lifescan», США. Для этого по ходу хвостовой вены животного делали прокол, подносили прибор со вставленной тест-полоской, автоматически прибор отбирал 1,5 мкл крови. Линейный диапазон измерения 1,1 – 33,3 ммоль/л.

Определение концентрации глюкозы в цельной крови при проведении теста на толерантность к глюкозе (ГТТ). ГТТ проводили натощак (после 12 ч голодания), оценивали начальный уровень глюкозы. Затем животным внутривенно вводили 60%-ный раствор глюкозы (ЗАО «Вектон», Россия). Далее концентрацию глюкозы в крови животных определяли через 30, 60 и 90 мин при помощи глюкометра OneTouch Ultra Easy («Lifescan», США).

Определение концентрации лактата в периферической крови. Проводили экспресс-методом при помощи портативного лактометра ACCUTREND® Lactate («Roche», Германия). Для этого из хвостовой вены животного отбирали 20 мкл крови (данный объем рекомендован фирмой производителем) и помещали на тест-полоску. Данный метод основан на принципе рефлексивной фотометрии (прибор измеряет поток оптического излучения, отраженного от тест-полоски) и отражает концентрацию лактата как в крови, так и в плазме. Линейный диапазон измерения 0,8 – 22 ммоль/л.

Определение концентрации инсулина в периферической крови. Проводили при помощи иммуноферментного анализа с использованием тест

набора Insulin rat EIA Kit (Cayman Chemical, США) на полуавтоматическом иммуноферментном анализаторе ImmunoChem – 2100 Microplate Reader (Intermedica, Inc США). Для этого из хвостовой вены забирали не менее 500 мкл крови. После чего пробы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин (ускорение около 1500g) на лабораторной медицинской центрифуге ОПН-8УХЛ4.2 Оптическую плотность измеряли в полученной плазме крови при 405 нм. Линейный диапазон измерения до 10 нг/мл.

Определение концентрации общего холестерина в плазме крови. Проводили при помощи биохимических методов с использованием соответствующих тест-наборов фирмы «Витал-Диагностик» (Россия) на биохимическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» (США). Оптическую плотность измеряли при 505 нм. Единицы измерения – ммоль/л. Линейный диапазон измерения до 25,8 ммоль/л.

Определение концентрации триглицеридов в плазме крови. Проводили при помощи биохимических методов с использованием соответствующих тест-наборов фирмы «Витал-Диагностик» (Россия) на биохимическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» (США). Количество образующегося окрашенного продукта, измеряемое при 505 нм, прямо пропорционально концентрации триглицеридов в пробе. Линейный диапазон измерения до 8 ммоль/л.

Определение концентрации восстановленного глутатиона в лизате эритроцитов. Для исследования использовали кровь, отобранную из сердца. Для получения гемолизата кровь центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин на лабораторной медицинской центрифуге ОПН-8УХЛ4.2. Далее отбирали плазму, из средней части эритроцитарной массы отбирали 100 мкл эритроцитов. Лизат готовится путем добавления к эритроцитарной массе дистиллированной воды и встряхивания. Принцип метода основан на способности низкомолекулярных тиоловых соединений, при взаимодействии с реактивом Элмана образовывать окрашенное соединение (тио-2-нитробензойная кислота), водный раствор которого имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. Исследования проводили на спектрофотометре Shimadzu PharmaSpec UV-1700 (Япония) (Ellman G.L., 1959; Sedlak J., 1968) путем регистрации характерного пика оптической плотности. Расчет концентрации восстановленного глутатиона производится по калибровочному графику (ммоль/л). Линейный диапазон измерения 0,05 – 1,1 ммоль/л.

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови. Для исследования использовали кровь, отобранную из сердца. Для получения сыворотки кровь центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. на лабораторной медицинской центрифуге ОПН-8УХЛ4.2. Исследование проводили спектрофотометрическим методом (Tian L., 1998; Рогожин В.В., 1998). В основе метода лежит реакция между малоновым диальдегидом (МДА) и тиобарбитуровой кислотой, которая при высокой температуре (100⁰С) и рН не выше 3 протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Максимум поглощения комплекса приходится на 532 нм. Линейность методики 0,67 – 3,77 нмоль/мл.

Определение концентрации стабильных метаболитов оксида азота (СМОА). Принцип данного метода заключается в одновременном восстановлении нитратов в нитриты в присутствии хлорида ванадия (III) и реакции диазотирования между образовавшимся нитритом и сульфаниламидом с последующим развитием розовой окраски, интенсивность которой определяется спектрофотометрически на спектрофотометре PharmaSpec 1700 (Shimadzu Corporation, Япония). Линейность методики находится в диапазоне концентраций нитрат- и нитрит-ионов 60 – 600 мкмоль/л (ГФ XI, Метельская В.А., 2005).

Методы гистологического анализа

Гистологическое исследование поджелудочной железы. После эвтаназии животных поджелудочную железу фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина в течение 24 ч, после чего материал обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации (70-95%) и по общепринятой методике заливали в парафин. Затем изготавливали серийные срезы толщиной 3-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Axio scope A1 (Karl Zeiss, Германия), объектив 20.

Гистологическое исследование парапанкреатической жировой ткани. После эвтаназии животных парапанкреатическую жировую ткань (адипоциты эпидидимальной области) фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, после чего материал обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации (70-95%) и по общепринятой методике заливали в парафин. Затем изготавливали серийные срезы толщиной 3-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Измерение площади адипоцитов производили с помощью программного обеспечения Видео-Тест-размер 5.0. Для этого с помощью микроскопа Axio scope A1 (Karl Zeiss, Германия) и цифровой камеры AxioCam ICc 1 (Karl Zeiss, Германия) выполняли 15 микрофотографий жировой клетчатки от одного животного. На каждой микрофотографии измеряли площадь группы адипоцитов (не более 10) и делили на количество клеток в данной группе. Производили оценку 10-15 полей зрения с общим количеством проанализированных клеток не менее 100. Далее вычисляли среднее значение площади адипоцитов.

Статистическая обработка данных

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения были подсчитаны среднее значение и стандартная ошибка среднего, которые вместе со значением n представлены в итоговых таблицах. В случаях ненормального распределения была рассчитана медиана и квартильный размах. Межгрупповые различия анализировались параметрическими или непараметрическими методами, в зависимости от типа распределения. В качестве параметрического критерия был использован t -критерий Стьюдента для зависимых и независимых переменных. В качестве непараметрических критериев – U -критерий Манна-Уитни. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Статистический анализ выполнялся с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft, США) (Altman D.G., 1999).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование влияния хинонов на утилизацию глюкозы и антиоксидантный статус на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного диабета

Метаболические патологии (метаболический синдром, сахарный диабет и ожирение) являются одними из наиболее распространенных патологий, ведущих к резкому ухудшению качества жизни и сокращению продолжительности жизни человека (Берштейн Л.М., Коваленко И.Г., 2010).

В ходе данного исследования с использованием батареи экспериментальных моделей была проведена оценка фармакологической активности тестируемых объектов на основе природных хинонов (Ковалева М.А. и др., 2012). Так, на модели стрептозотоцин-индуцированного диабета проводили оценку исследуемых препаратов на утилизацию глюкозы и антиоксидантный статус (Ковалева М.А. и др., 2013). На сегодняшний день существует ряд версий о механизме действия стрептозотоцина. Однако наиболее вероятным считается механизм действия, связанный с наличием в химической структуре стрептозотоцина сахарозного остатка, за счет которого он может включаться клеткой в обменные процессы. Попадая в клетку, стрептозотоцин разрушается с образованием свободных радикалов $\cdot O_2$ и $\cdot NO$ (рис. 1), в результате происходит алкилирование ядерной ДНК, что приводит к запрограммированной гибели клетки (Okamoto H., 1981).

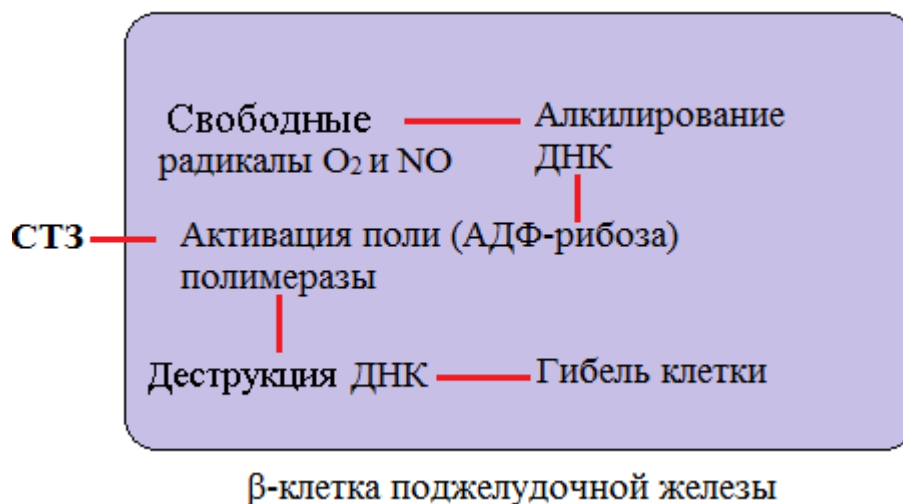


Рисунок 1 – Схема механизма действия стрептозотоцина в β-клетке поджелудочной железы

Следует отметить, что введение стрептозотоцина половозрелым мышам вызывает экспериментальную патологию СД смешанного типа. Поскольку у взрослых животных уже полностью сформированы ткани, и органы в ответ на введение химического агента страдают как рецепторный уровень, так и транспортные белки.

В модели экспериментального СТЗ-индуцированного диабета смешенного типа нами установлены не только фармакологические эффекты, но и наиболее вероятные механизмы действия тестируемых объектов. Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Влияние исследуемых препаратов (введение 10 дней) на показатели крови у мышей со СТЗ-индуцированным диабетом, $M \pm m$, $n=15$

№ п/п	Группа	Глюкоза, моль/л	ВГ, ммоль/мл	МДА, мкмоль/л	СМОА, мкмоль/л
1	Интактная	4,8±0,2	0,60±0,04	11,1±0,4	213±12,
2	Контроль (диабет+плацебо)	7,7±0,4●	0,26±0,06●	19,0±1,3●	137±9●
3	Комплекс ПГНХМ 1,8 мг/кг	6,4±0,3●*	0,66±0,05*	9,4±0,7*	266±22●*
4	Убидекаринон 11,4 мг/кг	5,5±0,4●*	0,68±0,06*	9,2±0,5*	258±9●*
5	Экстракт бадана 50 мг/кг	5,7±0,3●*	0,61±0,05*	10,1±0,3*	254±8●*
6	Метформин 176 мг/кг	6,1±0,3●*	0,62±0,04*	12,5±1,1*	248±9●*

Примечание: ● $p < 0,05$ – в сравнении с интактной группой, * $p < 0,05$ – в сравнении с группой контроля (здесь и далее в таблицах t -критерий Стьюдента).

Комплекс ПГНХМ вызывал антигипергликемическое действие, но и предотвращал окисление восстановленного глутатиона. Как известно, глутатион относится к основным звеньям антиоксидантной защиты. Кроме того, он участвует в детоксикации организма от ксенобиотиков (в том числе и лекарственных препаратов) и продуктов метаболизма, влияет на активность ферментов, регулирует обмен эйкозаноидов и простагландинов, влияет на биосинтез нуклеиновых кислот (Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S., 2009). В модели экспериментального СД смешанного типа впервые показана эффективность фармакологической коррекции тестируемый ПГНХМ на систему глутатиона с нормализацией восстановленного глутатиона в эритроцитах. Можно предположить, что гипогликемическое действие тестируемого ПГНХМ, скорее всего, связано с уменьшением толерантности рецепторов к инсулину за счет снижения интенсивности окислительной деструкции клеточных мембран (Ковалева М. А. и др., 2013).

Нарушение синтеза оксида азота, продуцируемого эндотелиальными и гладкомышечными клетками, является одним из элементов патогенеза инсулинорезистентности. NO уменьшает экспрессию молекул адгезии, пролиферацию клеток гладкой мускулатуры, тем самым препятствуя развитию и прогрессированию атеросклероза (Лупинская З.А. и др., 2008; Касаткина С.Г., 2011). При метаболических нарушениях, в том числе и при СД, снижается инсулинстимулированная продукция оксида азота (Bast A, 1991).

При оценке антигипергликемического эффекта убидекаренона установлено его панкреопротекторное действие, что обусловлено его антирадикальной активностью, а именно нейтрализацией активных форм кислорода в митохондриях инсулоцитов. Обращает на себя внимание влияние убидекаренона на стимуляцию образования метаболитов оксида азота. В ходе исследования было установлено, что убидекаренон статистически значимо увеличивал концентрацию СМОА в 2 раза по отношению к контрольным животным. В работе J.M. Hodgson (2002) описано позитивное влияние убидекаренона на эндотелиальную функцию, снижение систолического давления и образование гликозилированного гемоглобина за счет увеличения концентрации оксида азота. Данный фармакологический эффект чрезвычайно важен, поскольку оксид азота стимулирует синтез простагландинов за счет активации циклооксигеназ, усиливает антиоксидантную защиту, активируя продукцию глутатиона и супероксиддисмутазы (Moncada S., 2000). При сахарном диабете (вследствие дисфункции эндотелия) образование оксида азота снижается, что облегчает функционирование механизмов, приводящих к ускоренному образованию всех структурных изменений в сосудистой стенке, которые характерны для ангиопатии. Окислительный стресс и активирование процессов перекисного окисления липидов сопровождается ингибированием синтеза эндотелиального оксида азота. Ликвидация окислительного стресса у больных СД, которую можно достичь применением антиоксидантов сопровождается повышением уровня оксида азота в сыворотке крови, а значит снижением степени выраженности клинических симптомов, обусловленных дисфункцией эндотелия (Rose P. et al. 1986).

Оценка влияния хинонов на утилизацию глюкозы при субмаксимальной физической нагрузке в тесте «принудительное плавание»

Учитывая, что в тесте «принудительное плавание» экстракт бадана (табл. 2) предотвращал гипергликемию и лактоацидоз его антигипергликемическое действие, установленное на модели экспериментального диабета смешанного типа, связано с механизмом действия обусловленным активацией захвата глюкозы клетками.

Таблица 2

Влияние исследуемых препаратов (введение 7 дней) на физическую выносливость и показатели крови мышей, $M \pm m$, $n=10$

№п/п	Группа	Время плавания, сек	Концентрация глюкозы, ммоль/л	Концентрация лактата, ммоль/л
1	Интактные	-	4,9±0,2	3,3±0,3
2	Контроль	988±131	7,3±0,4●	5,0±0,4●
3	Комплекс ПГНХМ	2356±423*	8,2±0,5●	4,2±0,4●
4	Убидекаринон 5,2 мг/кг	2218±561*	7,8±0,4●×	3,8±0,4
5	Экстракт бадана 3 мг/кг	3125±353*×	6,5±0,3●*×	4,5±0,8
6	Экстракт родиолы розовой 9 мл/кг	2179±544*	9,1±0,6●*	4,6±0,9

Примечание: ● $p < 0,05$ – в сравнении с интактной группой, * $p < 0,05$ – в сравнении с группой контроля, × $p < 0,05$ – с группой, получавшей экстракт родиолы розовой.

Как известно, энергообеспечение мышц при физической работе осуществляется за счет гликолиза, поскольку поступление кислорода в условиях возросших энергетических потребностей недостаточно. В результате в крови увеличивается концентрация лактата. С током крови лактат поступает в печень, где под действием лактатдегидрогеназы превращается в пируват. Далее пируват включается в глюконеогенез, а образующаяся глюкоза мобилизуется в кровь и поглощается мышцами. Эти процессы описываются циклом Кори.

Препарат сравнения – экстракт родиолы розовой – проявил актопротекторный эффект, однако не улучшал энергетику клетки, наоборот, препарат истощал энергетические ресурсы организма, о чем свидетельствует лактоацидоз и гипергликемия, развивавшийся под влиянием экстракта родиолы.

Систематическое 7-дневное введение комплекса ПГНХМ привело к увеличению физической выносливости животных, что нашло отражение в статистически значимом увеличении времени плавания в 2,4 раза. Следует отметить, что на фоне применения комплекса ПГНХМ наблюдали тенденцию к нормализации углеводного обмена. Данные фармакологические эффекты

тестируемого объекта реализуются, скорее всего, за счет его антирадикальной активности.

Убидекаренон оказывал актопротекторный эффект, дополнительно препарат улучшал энергообеспечение клетки, о чем свидетельствует отсутствие лактоацидоза, уменьшение концентрации лактата по отношению к группе контрольных животных. Данные эффекты убидекаренона могут быть связаны с прямым действием на дыхательную цепь, поскольку убидекаренон является донатором электронов, а значит, может нормализовать тканевое дыхание в митохондриях и внутриклеточный метаболизм глюкозы, следовательно, увеличивать проницаемость клетки для глюкозы (Апчел В.Я., Ионова Л.А., 1994; Коровина Н.А., Рууге Э.К., 2002).

При введении фармакологических агентов пируват, как правило, полностью метаболизируется в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), а не идет на избыточный синтез лактата. Сухой экстракт бадана также проявил выраженное актопротекторное действие, что нашло отражение в статистически значимом увеличении времени плавания животных в 3,2 раза по отношению к контрольной группе. Наряду с увеличением работоспособности последний способствовал нормализации углеводного обмена, что проявлялось отсутствием лактоацидоза у лабораторных животных после выполнения работы, а также статистически значимым уменьшением концентрации глюкозы по отношению к контрольной группе на 11%. Возможно, данный эффект экстракта бадана связан с прямым рецепторным действием, например, с закрытием АТФ-зависимых K^+ каналов в кардиомиоцитах и гладкой мускулатуре, что приводит к стабилизации клеточных мембран и экзоцитозу инсулина из гранул. Позитивное влияние экстракта бадана на энергетические процессы клетки, скорее всего, связаны с тем, что входящий в состав гидрохинон являясь переносчиком электронов, способствует разгрузке дыхательной цепи и НАД-зависимых дегидрогеназ цитоплазмы от избытка электронов, что и ведет к восстановлению течения обменных реакций.

Влияние убидекаренона на течение экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета

С целью дальнейшего понимания молекулярного механизма действия убидекаренона его антигипергликемическое действие было изучено в модели неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета. В условиях данной модели (СТЗ вводится в ранний постнатальный период) полностью не завершено формирование поджелудочной железы, а также не сформированы транспортные белки. Однако в этом исследовании установлен еще более выраженный антигипергликемический эффект, который сопровождался гипополипидемическим действием и препятствовал статистически значимому увеличению диаметра адипоцитов (табл. 3 и 4). Убидекаренон проявил устойчивое антигипергликемическое действие и корректировал липидный состав плазмы крови. Через 3 недели курсового приема препарат нормализовал значения холестерина, что свидетельствует о снижении риска развития атеросклероза при МС. Данные эффекты препарата могут быть связаны, например, с прямым

действием на дыхательную цепь, поскольку убидекаренон является донатором убихинона, а значит, может предоставлять электроны для комплекса цитохрома С и нормализовать внутриклеточный метаболизм глюкозы. Регенерирующего действия в отношении β -клеток островков Лангерганса выявлено не было, но убидекаренон сдерживал процесс воспалительной инфильтрации островков Лангерганса, что также связано с антиоксидантными свойствами.

В ходе эксперимента было установлено позитивное влияние убидекаренона на уровень инсулина. Возможно, препарат влиял на пререцепторном уровне (препятствовал изменению функции β -клеток в ответ на воздействие СТЗ) или же имел клеточный механизм действия (влият на внутриклеточное перемещение ГЛЮТ-4 или нормализовал сигнальный путь инсулина). Этот эффект чрезвычайно важен, поскольку инсулинорезистентность является одним из ключевых факторов развития абдоминального ожирения. Уменьшение уровня инсулина в периферической крови тормозит гидролиз цАМФ, следовательно, активируется процесс липолиза, приводящий к нормализации веса. С другой стороны, возможно прямое влияние убидекаренона на гидролиз цАМФ.

Для наглядности оценки фармакологических эффектов исследуемых препаратов была введена система рангов (табл. 3)

Таблица 3

Сводная таблица рангов (самки/самцы)

Группа	Масса тела	Глюкоза	Инсулин	ХС	ТГ	Адиipoциты	Островки Лангерганса
Интактные	1/2	1/1	1/1	1/1	2/2	0/0	0/0
Контроль	6/6	6/6	2/2	6/6	4/4	10/10	10/10
Янувия 10,7 мг/кг	4/5	2/2	1/1	2/2	1/1	5/1	7,5/4,9
Убидекаринон 7,4 мг/кг	5/4	4/4	1/1	4/3	5/3	8,5/3,5	8,4/8
Убидекаринон 5,2 мг/кг	2/3	3/3	1/1	3/4	3/6	9,5/4,6	9,0/8,6
Убидекаринон 2,6 мг/кг	3/1	5/5	1/1	5/5	6/5	9,5/7,3	9,4/10

Для показателей масса тела, концентрация глюкозы, холестерина и триглицеридов ранги присваивались исходя из значения среднего по показателю, минимальный ранг (1) имело наименьшее среднее значение. Далее ранги присваивались в соответствии с увеличением среднего значения. Максимальный ранг 6 (в соответствии с количеством экспериментальных групп). Для показателя концентрация инсулина все группы, кроме контроля имели ранг 1, т.к. значения

данного показателя находились в диапазоне нормы, в контрольной группе ранг – 2. Для показателя «диаметр адипоцитов» рассчитывали разницу в мкм по среднему значению между показателями интактной и контрольной группами. Для самок она составила 20 мкм, для самцов 22,5. Интактной группе был присвоен ранг 0, контрольной 10. Таким образом, изменение диаметра в 1 мкм для самок имел коэффициент 2, для самцов – 2,25. Для расчета ранга высчитывали разницу диаметра в мкм между интактной и экспериментальной группой, полученное значение делили на коэффициент. Для показателя диаметр островков Лангерганса рассчитывали разницу в мкм по среднему значению между показателями интактной и контрольной группами. Для самок она составила 88,5 мкм, для самцов 82,3. Интактной группе был присвоен ранг 0, контрольной 10. Таким образом, изменение диаметра в 1 мкм для самок имел коэффициент 8,9, для самцов – 8,2. Для расчета ранга высчитывали разницу диаметра в мкм между интактной и экспериментальной группой, полученное значение делили на коэффициент.

В ходе морфометрического изучения островков Лангерганса вновь подтвердилось панкреопротекторное действие препарата, которое нашло отражение в отсутствии признаков воспалительного процесса в поджелудочной железе (Ковалева М.А., Селезнева А.И. и др., 2012).

Таблица 4

Итоговая таблица по сумме объединенных рангов (самцы и самки)

Группа	Сумма рангов
Интактные	13
Контроль	88
Янувия 10,7 мг/кг	39,4
Убидекаренон 7,4 мг/кг	62,4
Убидекаренон 5,2 мг/кг	60,7
Убидекаренон 2,6 мг/кг	87,2

Как видно из таблицы 4 наиболее эффективен исследуемый убидекаренон в дозах 5,2 мг/кг и 7,4 мг/кг.

Влияние сухого экстракта бадана на течение экспериментального метаболического синдрома, вызванного высококалорийной диетой (рацион «диета кафетерия»)

Сухой экстракт бадана был дополнительно исследован в экспериментальной модели метаболического синдрома на фоне применения рациона «диета кафетерия» (табл. 5 и 6). Данная модель позволяет моделировать нарушение углеводного обмена на рецепторном уровне, поскольку гиперфагия, развивающаяся у лабораторных животных на фоне потребления высококалорийных продуктов, приводит к развитию алиментарного ожирения, что в свою очередь ведет к увеличению объема клетки и уменьшению количества рецепторов на единицу площади. В ходе исследования установлено, что сухой экстракт бадана нормализует углеводный обмен, о чем свидетельствуют данные ГТТ, уменьшает потребление пищи (на 42%), нормализует липидный профиль, при этом экстракт бадана не оказывает центрального действия, о чем косвенно свидетельствует отсутствие выраженных изменений поведенческих реакций в тесте «открытое поле».

Таблица 5

Концентрация глюкозы при проведении глюкозотолерантного теста (ммоль/л) при моделировании метаболического синдрома, $M \pm m$, $n=15$

День исследования	Время, мин	Интактная	Контроль	Экстракт бадана 50 мг/кг	Сибутрамина гидрохлорид 1,5 мг/кг
15	0	3,2±0,3	2,9±0,3	3,3±0,1	2,2±0,5
	60	4,3±0,3	6,0±0,9•	3,4±0,1•	4,1±0,3
	120	3,1±0,8	8,1±1,0•	4,6±1,3•	2,5±0,5
23	0	2,2±0,3	2,4±0,3	3,5±0,3•	4,8±0,3
	60	3,5±0,3	6,6±0,6•	3,9±0,3	4,6±0,2•
	120	3,1±0,2	10,3±1,4•	8,7±1,1•	10,3±0,5•

Примечание: • $p < 0,05$ – в сравнении с интактной группой крыс.

Таблица 6

Состояние липидного обмена у крыс на фоне «диеты кафетерия» и применения исследуемых препаратов, ммоль/л, $M \pm m$, $n=15$

Группы	Триглицериды	Холестерин
Интактные	0,63±0,11	1,87±0,08
Контроль	2,84±0,57•	2,80±0,17•
Экстракт бадана 50 мг/кг	1,28±0,20•*	2,45±0,24•
Сибутрамина гидрохлорид 1,5 мг/кг	3,09±0,49•*	2,60±0,26•

Примечание: • $p < 0,05$ – в сравнении с интактной группой крыс; * $p < 0,05$ – в сравнении с контрольной группой.

Говоря о возможном молекулярном механизме сухого экстракта бадана, следует исходить из того, что эндогенный инсулин оказывает свой биологический

эффект за счет активации тирозинкиназы инсулинового рецептора. Далее запускается цепочка последовательного фосфорилирования белков инсулин-рецепторного субстрата (ИРС-1 и ИРС-2), что приводит к активации ключевого фермента в передаче инсулинового сигнала – фосфатидилинозитол-3-киназы (PI-3K). Последняя катализирует образование фосфоинозитол-3-фосфата, действующего как вторичный мессенджер инсулина, что способствует транспорту глюкозы внутрь клетки. Он также запускает каскад протеинкиназ, которые фосфорилируют и регулируют функцию многих клеточных белков, участвующих в процессах клеточного обмена, пролиферации и апоптоза клетки (Nystrom F.H., 1999).

Заключение

В ходе проведенного исследования было установлено наличие у исследуемых препаратов, содержащих природные хиноны, метаболических эффектов. Препарат из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ), убидекаренона, сухой экстракта бадана (водный экстракт) обладают антиоксидантным и антигипергликемическим действиями. Для убидекаренона, сухой экстракта бадана (водный экстракт) дополнительно установлено наличие гиполипидемического действия. Для убидекаренона – панкреопротекторное. Таким образом, применение препаратов, полученных на основе хинонов природного происхождения, в терапии сахарного диабета, метаболического синдрома является перспективным.

Выводы

1. В экспериментах на аутбредных мышах, крысах линии Вистар и SHR фармакологические препараты, содержащие хиноны природного происхождения проявили антиоксидантные, антигипергликемические, гиполипидемические, панкреатопротекторные и актопротекторные свойства.

2. У мышей самцов при моделировании экспериментального стрептозотоцин-индуцированного диабета выявлен антигипергликемический и антиоксидантный эффекты комплексного препарата из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ) в дозе 1,8 мг/кг, убидекаренона в дозе 5,2 мг/кг и сухого экстракта бадана в дозе 50 мг/кг.

3. При моделировании экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета на детенышах (самцы и самки) крыс Вистар убидекаренона кроме антигипергликемического действия проявил панкреопротекторную активность в отношении β -клеток островкового аппарата поджелудочной железы в дозах 5,2 мг/кг и 7,4 мг/кг.

4. Установленное антигипергликемическое действие убидекаренона реализовано не только за счет антиоксидантной активности последнего, а связано с его способностью увеличивать концентрацию оксида азота в крови.

5. У аутбредных мышей в тесте «принудительное плавание» выявлено актопротекторное действие ПГНХМ, убидекаренона и сухого экстракта бадана.

Наибольшим актопротекторным действием обладал сухой экстракт бадана в дозе 50 мг/кг, повышающий физическую выносливость в 3 раза в сравнении с контролем. При этом он предотвращал развитие выраженного лактоацидоза и гипогликемии.

6. У крыс линии SHR при моделировании экспериментального метаболического синдрома, вызванного высококалорийной диетой (рацион «диета кафетерия») установлен гиполипидемический и антигипергликемический эффекты сухого экстракта бадана в дозе 50 мг/кг, что предположительно связано со стимуляцией хинонами, входящими в состав экстракта, фосфорилирования белков инсулин-рецепторного субстрата (ИРС-1 и ИРС-2).

Научно-практические рекомендации

На основании результатов изучения убидекаринона зарегистрирован новый препарат Валеокор-Q10® (фармакологическая группа -кардиотоническое средство негликозидной структуры, лекарственная форма – таблетки жевательные), рекомендованный для улучшения адаптации к повышенным физическим нагрузкам у спортсменов.

Полученные экспериментальные данные в отношении фармакологической активности сухого экстракта бадана легли в основу получения патента РФ 2409379 «Средство, обладающее анорексическим, гипогликемическим и гиполипидемическим действием». Результаты исследований использованы в российско-финском проекте SPECICROP, поддерживаемого Евросоюзом. Рекомендуется также расширение исследовательских работ по детализации влияния сухого экстракта листьев бадана в терапии сахарного диабета и метаболического синдрома.

Список основных работ по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. **Ковалева, М.А.** Эффективность убидекаринона при метаболическом синдроме и артериальной гипертензии в эксперименте/ **Ковалева М.А.**, А.И. Селезнева, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, А.А. Забозлаев, Г.И. Дьячук // Профилактич. и клинич. медицина. 2012. №4. С. 81–84.

2. **Ковалева, М.А.** Влияние комплексного препарата из панциря морских ежей на концентрацию глюкозы в крови и параметры окислительного стресса на модели сахарного диабета II типа/ **Ковалева М. А.**, Иванова С. А, Макарова М. Н., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. // Эксперим. и клинич. фармакология. 2013. Т.76, №8. С. 27–32.

3. Shikov, A.N. Effect of *Bergenia crassifolia* L. extracts on weight gain and feeding behavior of rats with high-caloric diet-induced obesity / A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, M.N. Makarova, M.A. **Kovaleva**, I. Laakso, H.J. Dorman, R. Hiltunen, V.G. Makarov, B. Galambosi // *Phytomedicine*. 2012. Vol. 19. P. 1250–1255.

4. Селезнева, А.И. Противоишемические свойства метаболитических средств в эксперименте / А.И. Селезнева, И.Е. Макаренко, А.Е. Кастирнава, С.В. Ходько, **М.А. Ковалева** // Биомедицина. 2014. №3. С. 23–31.

Прочие работы, опубликованные по теме диссертации

5. **Ковалева, М.А.** Влияние нового препарата «Валеокор Q10» на инсулярный аппарат при моделировании экспериментального метаболитического синдрома / **М.А. Ковалева**, А.И. Селезнева, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // Современные проблемы анатомии, гистологии и эмбриологии животных. Сб. тр. III междунар. интернет-конф. Казань, 2012. С. 50.

6. **Kovaleva, M.A.** Antidiabetic effect of ubidecarenone in rats/ **M.A. Kovaleva**, M.N. Kokareva, M.N. Makarova, V.G. Makarov // *Obzory po klinicheskoy farmacologii i lekarstvennoj terapii*. 2012. Vol. 10, № 2. M70.

7. **Ковалева, М.А.** Эффективность убидекаринона при метаболитическом синдроме и артериальной гипертензии в эксперименте/ **М.А. Ковалева**, А.И. Селезнева, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // Фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности. Доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов. Матер. всерос. мол. конф. Уфа, 2012. С. 84–87.

8. **Ковалева, М.А.** Применение крыс со спонтанной гипертензией для моделирования экспериментального метаболитического синдрома индуцированного высококалорийной диетой/ **М.А. Ковалева**, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, Г.И. Дьячук // Инновации в современной фармакологии. Матер. IV съезда фармакологов России. Казань, 2012. С. 88–89.

9. Селезнева, А.И. Противоишемические свойства нового антиоксидантного препарата Валеокор-Q10 (экспериментальное исследование) / А.И. Селезнева, В.Г. Макаров, Г.И. Дьячук, А.А. Забозлаев, М.Н. Макарова, С.В. Ходько, **М.А. Ковалева** // Инновации в современной фармакологии. Матер. IV съезда фармакологов России. Казань, 2012. С. 168.

10. Селезнева, А.И. Моделирование метаболитического синдрома у крыс со спонтанной гипертензией / А.И. Селезнева, **М.А. Ковалева**, М.Н. Макарова, Г.И. Дьячук, В.Г. Макаров // Наука о лабораторных животных: современные подходы. Матер. 2-е ежегод. науч.-практич. конф. СПб., 2012. С. 15–16.

11. **Ковалева, М.А.** Изучение сахароснижающего и антиоксидантного действия комплекса полигидроксиафтохиноновых пигментов из панцера морских ежей на модели экспериментального стрептозотин-индуцированного диабета / **М.А. Ковалева**, М.Н. Макарова, С.В. Иванова // Частные проблемы медицинских и фармацевтических наук. Матер. междунар. науч.-практич. конф. Днепрпетровск, 2012. С. 42–44.

12. **Ковалева, М.А.** Возрастные особенности формирования стрептозотин-индуцированного диабета у крыс / **М.А. Ковалева**, А.И. Селезнева, М.Н. Кокарева, А.Е. Кастирнава, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров // Мед. акад. журнал. 2012. Т.12. Прил. С. 26 – 27.