

ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»

*На правах рукописи*

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук профессор Шабанов П.Д.

доктор медицинских наук Макарова М.Н.

Санкт-Петербург

2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Актуальность исследования .....	4
Цель работы .....	5
Задачи исследования включали: .....	6
Основные положения, выносимые на защиту .....	7
Глава 1. ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ. МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ, ТЕРАПИЯ .....	9
(ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР) .....	9
1.1 САХАРНЫЙ ДИАБЕТ И ЕГО РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ .....	9
1.2. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ .....	10
1.2.1 Внутриклеточная передача сигнала при утилизации глюкозы ...	14
1.2.2 Феномен инсулинорезистентности .....	16
1.3 СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА .....	20
1.3.1 Препараты бигуанидов .....	23
1.3.2 Препараты сульфонилмочевины .....	26
1.3.3 Препараты тиазолидиндионов .....	26
1.3.4 Препараты глинидов .....	28
1.3.5 Ингибиторы $\alpha$ -глюкозидазы .....	29
1.3.6 Инкретиномиметики .....	30
1.3.7 Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) .....	32
1.3.8 Применение антиоксидантов в терапии сахарного диабета 2 типа .	35
1.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДЕСТРУКТИВНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ В- КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА И/ИЛИ ИХ АПОПТОЗ КАК МОДЕЛЬ ДИАБЕТА .....	39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	41
2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	41
2.1.1 Объекты исследования .....	41
2.1.2 Лекарственные препараты, использованные в качестве препаратов сравнения .....	42
2.2 ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ .....	43
2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН- ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У МЫШЕЙ .....	46
2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ НА МОДЕЛИ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ. ТЕСТ «ПРИНУДИТЕЛЬНОЕ ПЛАВАНИЕ» .....	48
2.5. ДИЗАЙН ОЦЕНКИ ПАНКРЕОПРОТЕКТОРНОГО И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕОНАТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА .....	49

2.6. МЕТОД АНАЛИЗА ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО, ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ Тестируемых объектов на модели экспериментального метаболического синдрома, вызванного применением рациона «диета кафетерия».....	51
2.7. Биохимические методы исследования, используемые в экспериментах.....	53
2.8. МЕТОД ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	58
2.8.1. Гистологическое исследование поджелудочной железы.....	58
2.8.2. Гистологическое исследование парапанкреатической жировой ткани.....	58
2.9. МЕТОД ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.....	59
2.10. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ.....	59
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61
3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИНОНОВ НА УТИЛИЗАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА.....	61
3.2. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХИНОНОВ НА УТИЛИЗАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ ПРИ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ В ТЕСТЕ «ПРИНУДИТЕЛЬНОЕ ПЛАВАНИЕ».....	67
3.3. ВЛИЯНИЕ УБИДЕКАРЕНОНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕОНАТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА.....	72
3.3.1 Оценка влияния убидекаренона на массу тела животных.....	72
3.3.2. Оценка влияния убидекаренона на содержание глюкозы и инсулина в периферической крови.....	74
3.3.3 Оценка влияния убидекаркнона на липидный спектр.....	80
3.3.4. Морфометрическое исследование адипоцитов.....	83
3.3.5 Морфометрическое исследование островков Лангерганса.....	86
3.4 ВЛИЯНИЕ СПЕЦИАЛЬНОГО ЭКСТРАКТА БАДАНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА, ВЫЗВАННОГО ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ (РАЦИОН «ДИЕТА КАФЕТЕРИЯ»).....	93
Глава 4 . ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	106
ВЫВОДЫ.....	110
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

## 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 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 три раза выше, при этом значительно увеличивается смертность (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. 2007; 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) (Аmineва Н.В., 2002).

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 место занимает длительный и выраженный окислительный стресс, изучались многими отечественными и зарубежными учеными (Аметов А.С., 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.

Все вышесказанное определило цели и задачи данного исследования.

Цель работы

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

Задачи исследования включали:

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 мышах 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 диссертационной работы

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 обмены. 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.

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, 7,4мг/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.

Личный вклад соискателя заключается в самостоятельном проведении всех экспериментальных исследований, включая работу с экспериментальными животными, проведение лабораторных тестов, статистическую обработку и анализ полученных результатов, а также в подготовке основных публикаций по теме работы.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены и обсуждены на «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), «Фитофарм-2013» (Вена, 2013).

#### Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 4 в центральных журналах, рекомендованных ВАК.

#### Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования главы, содержащей результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, списка литературы.

Работа изложена на 133 страницах машинописного текста, включает в себя 36 таблиц, 31 рисунок. Список литературы содержит 173 источников, из них 120 иностранных авторов.

Глава 1. ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ.  
МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ, ТЕРАПИЯ  
(ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 САХАРНЫЙ ДИАБЕТ И ЕГО РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ

Сахарный диабет (СД) по определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) – это состояние продолжительного повышения уровня сахара в крови, которое может быть вызвано рядом внешних и внутренних факторов. Само заболевание обусловлено абсолютным (полным) и релятивным (относительным) недостатком инсулина, который приводит к нарушению углеводного (сахарного), жирового и белкового обмена. Таким образом, сахарный диабет представляет собой плеiotропное заболевание, возникающее по различным причинам, но имеющее одинаковое проявление (DCCT Research Group, 1996).

За последние 25 лет численность пациентов с подтвержденным СД в мире возросла более чем в 10 раз (таблица 1).

Таблица 1

Темпы роста заболеваемостью СД (Shaw J.E. et al., 2010)

Год	Число пациентов с подтвержденным диагнозом, мил. человек
1985	30
1990	80
1994	110,4
1995	135
2000	177
2003	194
2008	246
2011	366
2012	381

По данным Международной диабетической федерации (The International Diabetes Federation, IDF), число пациентов с установленным диагнозом СД среди взрослого населения (20-79 лет) в мире к 2030 г. составит 439 миллионов (Shaw J.E. et al., 2010).

На сегодняшний день известны различные предпосылки развития СД (Jahromi M.M., 2007), основополагающим принято считать инсулинорезистентность (Bergman R.N., 2005; Jellinge P.S., 2007), а также факторы, которые могут возникать либо как следствие инсулинорезистентности, либо являться ее причиной:

- деструктивные повреждения  $\beta$ -клеток островков Лангерганса и/или их апоптоз;
- патология инсулинового рецептора;
- нарушение внутриклеточной передачи сигнала при утилизации глюкозы.

Следует отметить, что многие клиницисты для обозначения устойчивого комплекса взаимосвязанных факторов риска развития СД и сердечнососудистых заболеваний используют термин – метаболический синдром.

## 1.2. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗЫ. БИОХОИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ

Специфическое действие на клетки – мишени инсулин осуществляет через соответствующий белок-рецептор.

Рецептор инсулина представляет собой тирозиновую протеинкиназу, фосфорилирующую белки по ОН-группам тирозина.

Рецептор состоит из двух  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -субъединиц, связанных дисульфидными связями,  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы – гликопротеины, имеющие углеводную часть на наружной стороне мембраны клетки. Вне мембраны на ее поверхности находятся  $\alpha$ -субъединицы (рис. 1). Центр связывания инсулина образован N-концевыми доменами  $\alpha$ -субъединиц.  $\beta$ -субъединицы

как бы пронизывают мембрану и не участвуют в связывании инсулина (Andrew B., Becker A., 1990).

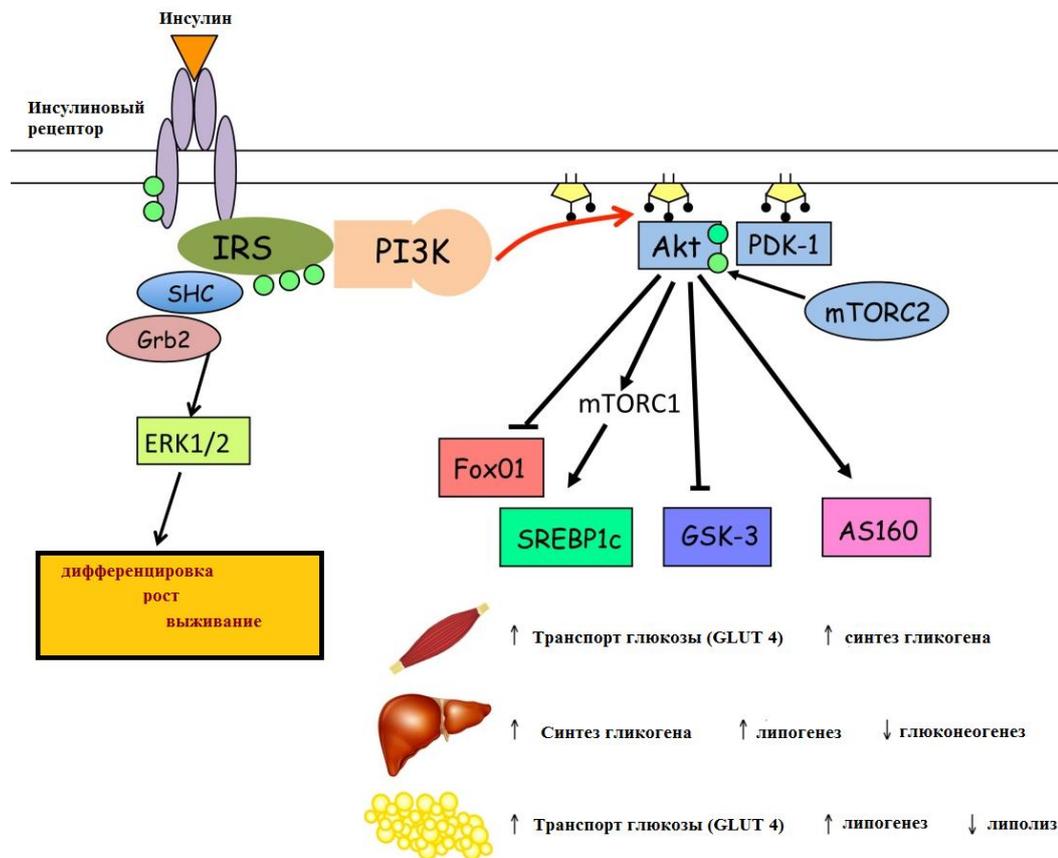


Рисунок 1– Связывание инсулина с инсулиновым рецептором. Передача сигнала внутри клетки (Andrew B., Becker A., 1990 модифицировано)

Связывание инсулина с рецептором приводит к фосфорилированию трех тирозиновых остатков. Эти остатки тирозина представлены в трех классах белков: субстраты инсулинового рецептора (ИРС), Shc белок (адаптерный внутриклеточный белок, который после фосфорилирования образует комплекс с рецептором) и APS белок (Moran M. F., P Polakis 1991).

Важнейшим биологическим эффектом инсулина является активация утилизации глюкозы клетками, за счет интегрирования транспортера глюкозы ГЛЮТ-4 в клеточные мембраны мышечной и жировой ткани (рис. 2).

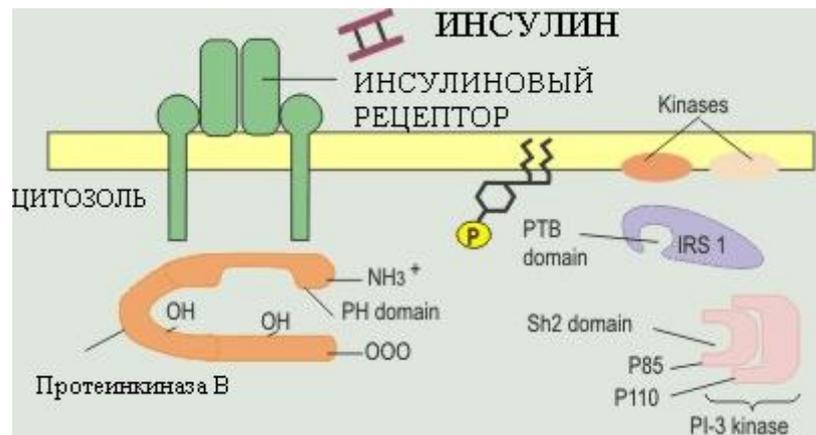


Рисунок 2 – Передача сигнала внутри клетки (Morgan M. F., P Polakis 1991  
модифицировано)

После того как ИРС-1 связывается с фосфотирозиновым остатком через РТВ домен, активированная киназа в цитозольном домене рецептора фосфорилирует ИРС-1 (рис. 2). Одна субъединица PI-3 киназы связывается с рецептор-связанным ИРС1 через свой SH<sub>2</sub> домен, а другая субъединица затем фосфорилирует PI-4,5-P<sub>2</sub> и PI-4-P в PI-3,4,5-P<sub>3</sub> и PI-3,4-P<sub>2</sub> соответственно (рис. 3).

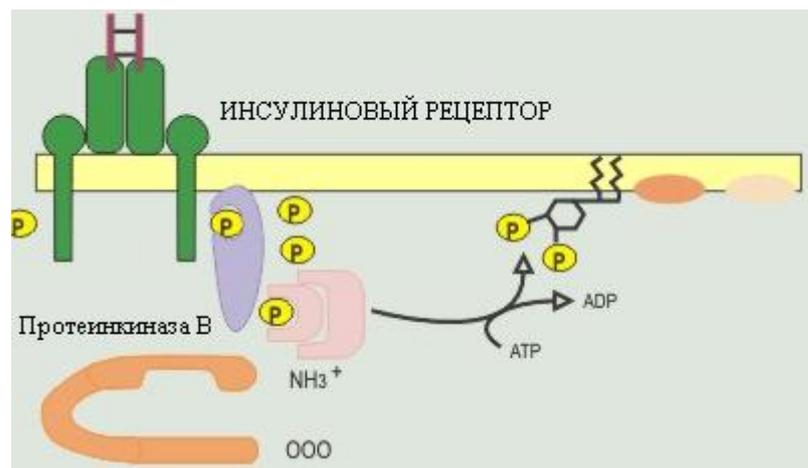


Рисунок 3 – Фосфорилирование ИРС1 (Morgan M. F., P Polakis 1991  
модифицировано)

Фосфоинозитиды связываются с РН доменом протеинкиназы В, прикрепляя ее таким образом к мембране. Две мембраносвязанные киназы

фосфорилируют ассоциированную с мембраной протеинкиназу В (рис. 3) и активируют ее.

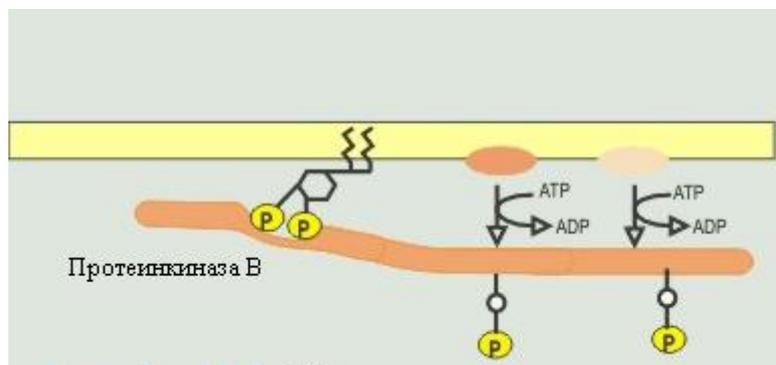


Рисунок 4 – Активирование Протеинкиназы В (Moran M. F., P Polakis 1991 модифицировано)

Активированная протеинкиназа В (рис. 4) высвобождается из мембраны и стимулирует утилизацию глюкозы, активируя транспортер ГЛЮТ и синтез гликогена. Первое происходит вследствие транслокации транспортера глюкозы ГЛЮТ (рис. 5) из внутриклеточных везикул в плазматическую мембрану. Второе, вследствие фосфорилирования протеинкиназы В киназы 3 гликогенсинтазы (ГСК-3), то есть переход ее из активной в неактивную форму. В результате ГСК-3-зависимое ингибирование гликогенсинтазы снимается, что приводит к стимуляции синтеза гликогена.

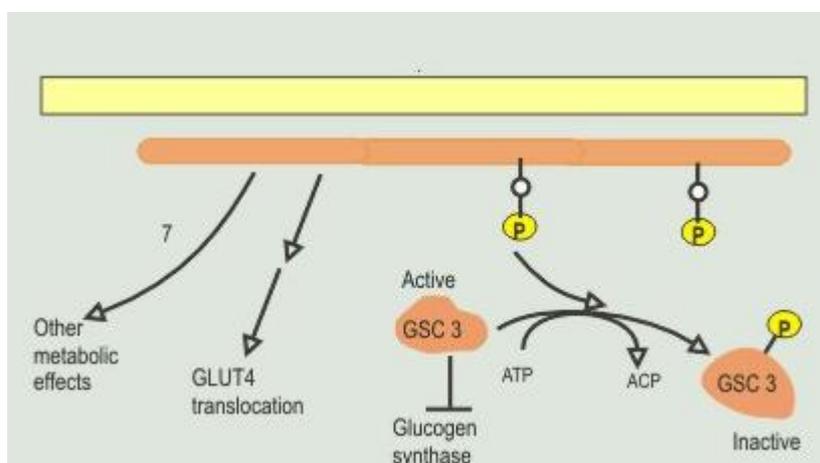


Рисунок 5 – Активация транспортера глюкозы ГЛЮТ (Moran M. F., P Polakis 1991 модифицировано)

Определение инсулинорезистентности впервые было предложено в 1998 г. на заседании Американской диабетологической ассоциации (American Diabetes Association, ADA). По мнению специалистов ассоциации инсулинорезистентность есть нарушение биологического ответа (метаболического и молекулярно-генетического) на инсулин (экзогенный и эндогенный); нарушение метаболизма углеводов, жиров, белков; изменение синтеза ДНК, регуляции транскрипции генов, процессов дифференцировки и роста клеток, тканей организма. Данное определение, несомненно, отражает всю сложность и глобальность патологических изменений, происходящих в организме (Trayhurn P., Wood I.S, 2005; American Diabetes association, 2008).

### 1.2.1 Внутриклеточная передача сигнала при утилизации глюкозы

Попадание глюкозы в клетку происходит с помощью специальных транспортеров глюкозы – ГЛЮТ. Попадая в цитоплазму клетки, последняя метаболизируется до пирувата, который может быть использован в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) в митохондриях (рис. 6).

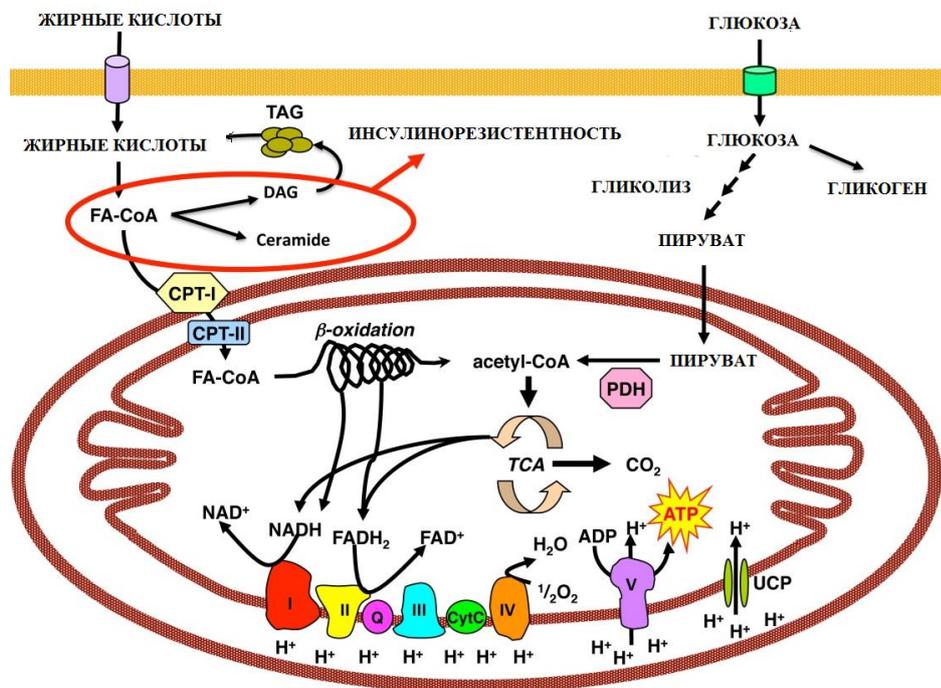


Рисунок 6 – Схема утилизации глюкозы

В случае ограничения углеводных ресурсов в организме (в печени), запускается процесс глюконеогенеза, в ходе которого происходит превращение пирувата в оксалоацетат, а затем в малат, который транспортируется из митохондрий в цитоплазму, где он преобразуется обратно в оксалоацетат, который используется для синтеза фосфоенолпирувата и затем может быть метабализирован в глюкозу.

Глюкозные транспортеры (ГЛЮТ) обнаружены во всех тканях. Существует несколько разновидностей ГЛЮТ (таблица 2), они пронумерованы в соответствии с последовательностью их открытия. Описаны 5 типов ГЛЮТ, которые имеют сходные первичную структуру и доменную организацию.

Таблица 2

#### Функции белков транспортеров глюкозы

Тип ГЛЮТ	Функция
ГЛЮТ-1	обеспечивает стабильный поток глюкозы в мозг
ГЛЮТ-2	обнаружен в клетках органов, выделяющих глюкозу в кровь. Именно при участии ГЛЮТ-2 глюкоза переходит в кровь из энтероцитов и печени. ГЛЮТ-2 участвует в транспорте глюкозы в $\beta$ -клетки поджелудочной железы
ГЛЮТ-3	обладает большим, чем ГЛЮТ-1, сродством к глюкозе. Он также обеспечивает постоянный приток глюкозы к клеткам нервной и других тканей
ГЛЮТ-4	главный переносчик глюкозы в клетки мышц и жировой ткани
ГЛЮТ-5	встречается, главным образом, в клетках тонкого кишечника. Его функции известны недостаточно.

Все типы ГЛЮТ могут находиться как в плазматической мембране, так и в цитозольных везикулах. ГЛЮТ-4 (и в меньшей мере ГЛЮТ-1) почти полностью находятся в цитоплазме клеток. Влияние инсулина на такие клетки приводит к перемещению везикул, содержащих ГЛЮТ, к плазматической мембране, слиянию с ней и встраиванию транспортёров в мембрану. После чего возможен облегченный транспорт глюкозы в эти

клетки. После снижения концентрации инсулина в крови транспортёры глюкозы снова перемещаются в цитоплазму, и поступление глюкозы в клетку прекращается.

Известны различные нарушения в работе транспортёров глюкозы, которые приводят к развитию инсулинорезистентности. Наследственный дефект этих белков может лежать в основе инсулинонезависимого сахарного диабета. В то же время причиной нарушения работы транспортера глюкозы может быть не только дефект самого белка. Нарушения функции ГЛЮТ-4 возможны на следующих этапах:

- передача сигнала инсулина о перемещении этого транспортёра к мембране;
- перемещение транспортёра в цитоплазме;
- включение в состав мембраны;
- отшнуровывание от мембраны.

### 1.2.2 Феномен инсулинорезистентности

По современным представлениям феномен инсулинорезистентности лежит в основе развития клинко-лабораторных проявлений таких социально значимых патологий как: метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия и прочие сердечно-сосудистые патологии (Jellinge P.S., 2007).

Как известно развитие инсулинорезистентности может происходить на нескольких уровнях, которые представлены в таблице 3.

Таблица 3

Возможные уровни развития инсулинорезистентности

Уровень	Пререцепторный	Рецепторный	Пострецепторный
Эффект	Аномальная структура молекулы эндогенного инсулина	Уменьшенное число рецепторов к инсулину, нарушение пространственной конформации инсулиновых рецепторов, нарушение инсулинрецепторного сигнала (IRS-1), нарушение аффинности инсулиновых рецепторов	Нарушение трансдукции инсулинового сигнала

Следует отметить, что долгое время ученые считали пострецепторный механизм развития инсулинорезистентности основополагающим в случае приобретенных форм. Однако на сегодняшний день все больше внимания уделяется рецепторному механизму (Kadowaki T. et al., 2006; Antuna-Puente V. et al., 2008).

Так, например, описаны следующие патологии инсулинового рецептора. Жировая ткань рассматривается как один из важнейших источников синтеза фактора некроза опухолей (tumor necrosis factor, TNF) в организме. Помимо адипоцитов фактор продуцируют макрофаги, лимфоциты, эндотелиоциты, пенистые клетки и некоторые другие клетки (Goossens G.H., 2008).

Семейство цитокинов фактора некроза опухолей (TNF) занимает ведущие позиции не только в осуществлении нейроэндокринных и иммунных функций, но и является одним из основных регуляторов энергетического гомеостаза организма в целом (Antuna-Puente V. et al., 2008).

С современных позиций TNF- $\alpha$  является еще и важнейшим медиатором инсулинорезистентности, фактором регуляции общего обмена в организме. TNF- $\alpha$  координирует функциональное взаимодействие между жировой тканью и инсулинзависимыми органами и тканями, в первую очередь печенью и поперечнополосатой мускулатурой.

Уровень экспрессии TNF- $\alpha$  характеризуется высокой положительной корреляцией со степенью ожирения (индексом массы тела, ИМТ) и степенью гиперинсулинемии. Активность же липопротеинлипазы жировой ткани описана отрицательной корреляцией.

При ожирении TNF- $\alpha$  играет ведущую роль в повышении экспрессии ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1) и нарушении функции адипоцитов бурой жировой ткани.

Основной вклад TNF- $\alpha$  в процесс развития инсулинорезистентности заключается в снижении активности тирозинкиназы рецептора инсулина и фосфорилирования серина в субстрате инсулинового рецептора-1 (ИРС-1), что в свою очередь приводит к нарушению (а именно ослаблению) трансдукции инсулинового сигнала. Основная роль TNF- $\alpha$  - липолитическая, данная активность реализуется путем регуляции экспрессии множества генов липидного обмена в адипоцитах. Следует отметить, что TNF- $\alpha$  снижает фосфорилирование инсулиновых рецепторов во многих клетках организма. Кроме того патология инсулинового рецептора может быть вызвана жирными кислотами (ЖК), диглициеридами и церамидом (Carsten Schmitz-Reiffer et al., 1999).

Механизм утраты чувствительности инсулинового рецептора заключается в блокировании проведения клеточного сигнала путем активирования фосфатидилинозитол 3-киназы (ФТК-3), данный фермент фосфорилирует инсулиновый рецептор и посредники инсулинового каскада, препятствуя проведению сигнала под действием собственного инсулина. В то же время избыток ЖК способствует накоплению их в плазматической мембране, что способствует еще большему притоку последних в клетку.

К одной из патологий инсулинового рецептора можно отнести снижение количества последних при ожирении. В норме, жировые клетки и гепатоциты здорового человека содержат по 200-300 тысяч рецепторов. При ожирении, вызванном накоплением висцерального жира, а именно накопления липофильных фракций в адипоците происходит увеличение площади последнего, а значит уменьшение количества рецепторов на единицу площади (рис. 7, 8).

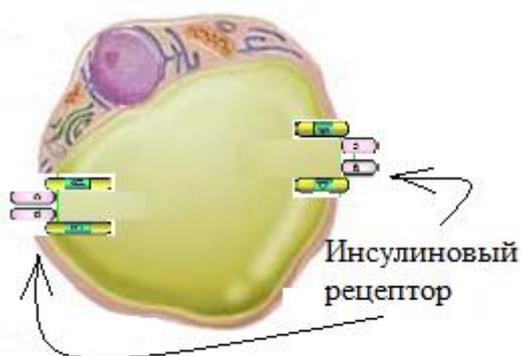


Рисунок 7 – Адипоцит, вариант нормы

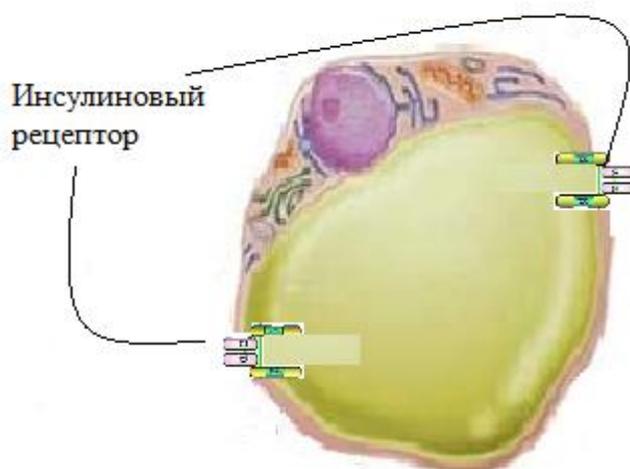


Рисунок 8 – Ожирение. Уменьшение количества рецепторов инсулина на единицу площади

С этим связано моделирование диабета на фоне применения рациона «диета кафетерия». Ключевым фактором развития экспериментального диабета на данной модели является введение в рацион питания экспериментальных животных высококалорийных продуктов, таких как чипсы, печенье, шоколад. При этом у животных развивается висцеральное ожирение, за счет накопления липофильных соединений в адипоцитах (в том числе свободных жирных кислот), что в свою очередь приводит к увеличению площади последних, а значит и уменьшению количества рецепторов на единицу поверхности.

Как известно жировая ткань является инсулинозависимым органом, в котором инсулин снижает высвобождение свободных жирных кислот (СЖК) и глицерина в системный кровоток, тем самым обеспечивает утилизацию глюкозы по пентозофосфатному пути и липогенез. Активный липолиз в висцеральных адипоцитах приводит к выделению большого количества СЖК, преимущественно в портальную циркуляцию и печень. В печени СЖК препятствуют связыванию инсулина с гепатоцитами, что обуславливает развитие инсулинорезистентности (на уровне печени), снижение экстракции инсулина печенью и развитие системной гиперинсулинемии.

В свою очередь, через нарушение ауторегуляции инсулиновых рецепторов гиперинсулинемия усиливает периферическую инсулинорезистентность. СЖК также подавляют тормозное действие инсулина на глюконеогенез, способствуя увеличению продукции глюкозы печенью. СЖК способствуют нарушению поглощения глюкозы и ее утилизации в мышечной ткани, что приводит к усилению периферической инсулинорезистентности; служат источником накопления триглицеридов и продуктов неокислительного метаболизма СЖК в скелетных мышцах, миокарде, а значит, становятся причиной нарушения инсулинзависимой утилизации глюкозы в этих тканях. Показано также, что СЖК оказывают прямое токсическое воздействие на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы (так называемый эффект липотоксичности), приводя к снижению их секреторной активности (Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х., 2004).

### 1.3 СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Общие тенденции в терапии СД 2 типа можно сформулировать следующим образом:

- ранняя диагностика заболевания (возможно на стадии нарушения толерантности к глюкозе (НТГ) (Дедов И.И. и др., 2012);
- форсированная тактика, направленная на достижение целевых значений гликемии на ранних стадиях заболевания;
- использование пероральных сахароснижающих лекарственных средств на стадии НТГ (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2013);
- применение комбинированной терапии (комбинации сахароснижающих лекарственных средств из разных групп или комбинации сахароснижающего лекарственного средства с инсулином) на первом году заболевания;
- раннее применение инсулина в адекватных дозах и схемах в дебюте заболевания (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2011).

## Вещества, влияющие на утилизацию глюкозы

Название	Эффект	Был открыт	Ссылка
инкретины	гормоноподобные вещества, которые продуцируются после приёма пищи и стимулируют секрецию инсулина. К инкретинам относятся глюкозозависимый инсулиотропный полипептид и глюкагоноподобный пептид-1 (энтероглюкагон).	В 1902 году Bayliss и Starling название «инкретин» было предложено La Barre в 1932 году	(Панькиев В.И., 2011)
простагландин Е1	повышает утилизацию глюкозы и кислорода, подавляет высвобождение свободных радикалов и лизосомальных ферментов из гранулоцитов и макрофагов, стимулирует синтез протеинов, оказывает благоприятное влияние на липидный обмен	Ульф фон Эйлер 1934 - 1936	(Айзенберг Л.В., Магилевец В.М., 2004)
висфатин	адипоцитокин с инсулиномиметическими свойствами. подобно инсулину запускает механизмы утилизации глюкозы адипоцитами и миоцитами из кровотока, подавляет глюконеогенез в гепатоцитах. Данный цитокин связывается с рецепторами инсулина и запускает процесс активации тирозинкиназы, что в конечном итоге ведет к фосфорилированию внутриклеточных белков, опосредующих различные биологические эффекты инсулина	В 2004 назван «висфатин» группой японских ученых	(Henrike Sell, Daniela Dietze-Schroeder, 2006)

Инкретины представляют собой класс соединений, продукция которых в организме начинается после приема пищи. Инкретины являются стимуляторами секреции инсулина. К ним относятся пептидные гормоны

глюкозозависимый инсулиотропный полипептид (ГИП) и энтероглюкагон (синоним глюкагоноподобный пептид-1, ГПП-1). Следует отметить, что у здоровых людей до 70 % секреции инсулина после приема пищи обусловлено именно эффектом инкретинов. У пациентов с сахарным диабетом 2 типа описанный выше эффект значительно снижен.

ГИП секретируется К-клетками, которые преимущественно расположены в двенадцатиперстной и проксимальной части тощей кишки. Основными его функциями являются ускорение утилизации глюкозы за счет стимуляции биосинтеза и глюкозозависимой секреции инсулина, пролиферация  $\beta$ -клеток и повышение их устойчивости к апоптозу, также стимуляция липогенеза в печени, мышечной и жировой тканях (Baggio L.L., 2007; Wilkes L.C. et al., 2010).

ГПП-1 секретируется L-клетками желудочно-кишечного тракта. Наиболее значимым биологическим эффектом ГПП-1 является инсулиотропный эффект (Викулова О.К., Шестакова М.В., 2008). Данный инкретин потенцирует синтез инсулина, за счет стимуляции транскрипции гена инсулина, а также экспрессии мРНК внутриклеточных транспортеров глюкозы (глюкокиназы и ГЛЮТ-2), благодаря которым обеспечивается периферическая утилизация глюкозы. Кроме того он способствует стимуляции глюкозозависимого синтеза инсулина, оказывает протективное влияние на  $\beta$ -клетки, препятствуя их апоптозу и повышая скорость дифференцировки и неогенез из эпителиальных предшественников, что в итоге приводит к увеличению массы  $\beta$ -клеток. Среди биологических эффектов ГПП-1 выявлена его способность снижать секрецию глюкагона как посредством прямого действия на  $\alpha$ -клетки поджелудочной железы, так и за счет увеличения синтеза соматостатина, итогом чего является уменьшение мобилизации глюкозы в печени (Baggio L.L., 2004; Kim W., 2008).

Висфатин был выделен сравнительно недавно из висцеральной жировой ткани как колониестимулирующий фактор В-лимфоцитов (Fukuhara

А., Matsuda M., 2005). Экспрессию висфатина регулируют фактор некроза опухолей и интерликин-6, а также гормон роста и глюкокортикоиды. В ходе исследований было установлено, что висцеральные адипоциты являются не единственным источником выработки висфатина. Экспрессию матричной РНК висфатина отмечают в гепатоцитах, клетках поперечно-полосатой мускулатуры, а также нейтрофилов крови. В исследованиях доказано, что данный адипакин запускает механизмы утилизации глюкозы из системного кровотока адипоцитами и миоцитами и подавляет глюконеогенез в гепатоцитах (Charo I.F., Ransohoff R.M., 2006; Henrike S. et al., 2006). В норме (при отсутствии метаболических нарушений и инсулинорезистентности) около 10% инсулиновых рецепторов связано с висфатином. Резкое повышение концентрации висфатина в плазме крови у пациентов, страдающих ожирением (при избыточным количеством висцеральной жировой ткани), рассматривается как некая компенсаторная реакция организма, направленная на поддержание физиологической концентрации глюкозы при чрезмерном поступлении пищи (Schmidt M.I. et al., 2005).

### 1.3.1 Препараты бигуанидов

Первыми препаратами для терапии СД 2 типа были предложены бигуаниды (фенформин и буформин), которые были введены в лечебную практику более 50 лет назад. Однако из-за высокой частоты встречаемости лактоацидоза после приема данных препаратов, они в настоящее время практически исключены из терапии. Единственным препаратом данного класса, разрешенным к применению, как в Российской Федерации, так во многих странах, является метформин.

Начиная с 1950-х годов было проведено множество исследований, для лучшего понимания клеточного и молекулярного механизма действия метформина, который является гипогликемическим средством первой линии пероральной терапии СД 2. На сегодняшний день считается, что основной эффект данного препарата связан с уменьшением выработки глюкозы

печенью. Данное действие реализуется через кратковременное ингибирование комплекса I митохондриальной дыхательной цепи (рис. 9). Кроме того активируются 5'АМФ-активируемая протеинкиназа, блокируется синтез жирных кислот и активируется их окисление, что возможно и обуславливает плеiotропный механизм действия (Viollet B. et al., 2012).

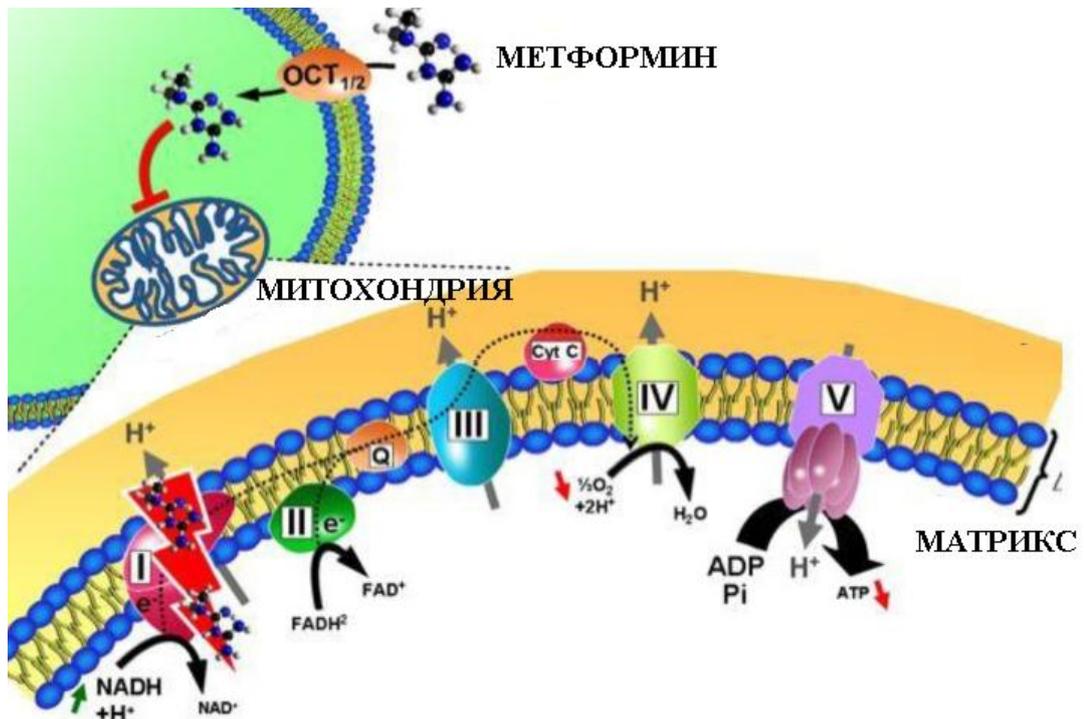


Рисунок 9 – Молекулярный механизм действия метформина.

Митохондриальный комплекс I дыхательной цепи, как первоначальная мишень метформина (Viollet B. et al., 2012 модифицировано )

Также в литературе встречаются следующие описания механизма действия метформина: в экспериментальных и клинических исследованиях было показано, что метформин оказывает благоприятное действие на липидный спектр. Он снижает концентрацию триглицеридов в плазме в среднем на 10–20%. Достоверное снижение концентрации общего холестерина и холестерина ЛПНП, вероятно, происходит благодаря уменьшению их биосинтеза в кишечнике и печени. Метформин уменьшает концентрацию хиломикроннов и несколько повышает концентрацию холестерина ЛПВП.

В экспериментальных исследованиях установлено, что метформин не имеет прямого влияния на секрецию инсулина  $\beta$ -клетками, а оказывает экстрапанкреатическое действие.

К основным фармакологическим эффектам данного препарата можно отнести:

- снижение всасывания углеводов в кишечнике;
- усиление связывания инсулина с рецепторами;
- экспрессию гена транспортера ГЛЮТ 1 (секреция);
- усиление транспорта глюкозы через мембрану в мышцах;
- перемещение (транслокация) ГЛЮТ 1 и ГЛЮТ 4 из плазменной мембраны к поверхностной мембране в мышцах;
- снижение глюконеогенеза (Mithieux G. et al., 2002);
- снижение гликогенолиза;
- снижение уровня триглицеридов и липопротеинов низкой плотности;
- повышение содержания липопротеинов высокой плотности;

Основной механизм действия метформина направлен на преодоление резистентности периферических тканей к действию инсулина, в особенности это касается мышечной и печеночной ткани. К основным фармакологическим эффектам метформина можно отнести торможение интенсивности процессов глюконеогенеза и скорости образования глюкозы печенью. Уменьшение явлений инсулинорезистентности (как в печени, так и на периферии), в том числе за счет индукции образования транспортеров глюкозы (ГЛЮТ-1 и ГЛЮТ-4) и улучшения утилизации глюкозы периферическими органами-мишенями, снижение базальной гиперинсулинемии. Фармакологическое действие метформина, связанное с нормализацией концентрации глюкозы в крови, реализуется в основном через образование инсулинрецепторного субстрата 2 (ИРС-2). Максимально высокая концентрация ИРС-2 регистрируется в печени. Метформин резко усиливает транслокацию ГЛЮТ-1 в плазматическую мембрану клеток

печени и в несколько меньшей степени – ГЛЮТ-4 в мышцах (Garber A. et al., 2006, Musi N. et al., 2002).

### 1.3.2 Препараты сульфонилмочевины

Механизм действия препаратов сульфонилмочевины (СМ) заключается в стимуляции секреции инсулина. Препараты СМ прямо воздействуют на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы за счет связывания и «закрытия» АТФ-зависимых  $K^+$  каналов клеточной мембраны, в результате чего происходит деполяризация клеточной мембраны, открытие  $Ca^{2+}$  каналов, приток ионов  $Ca^{2+}$  и экзоцитоз инсулина из гранул (рис. 10).

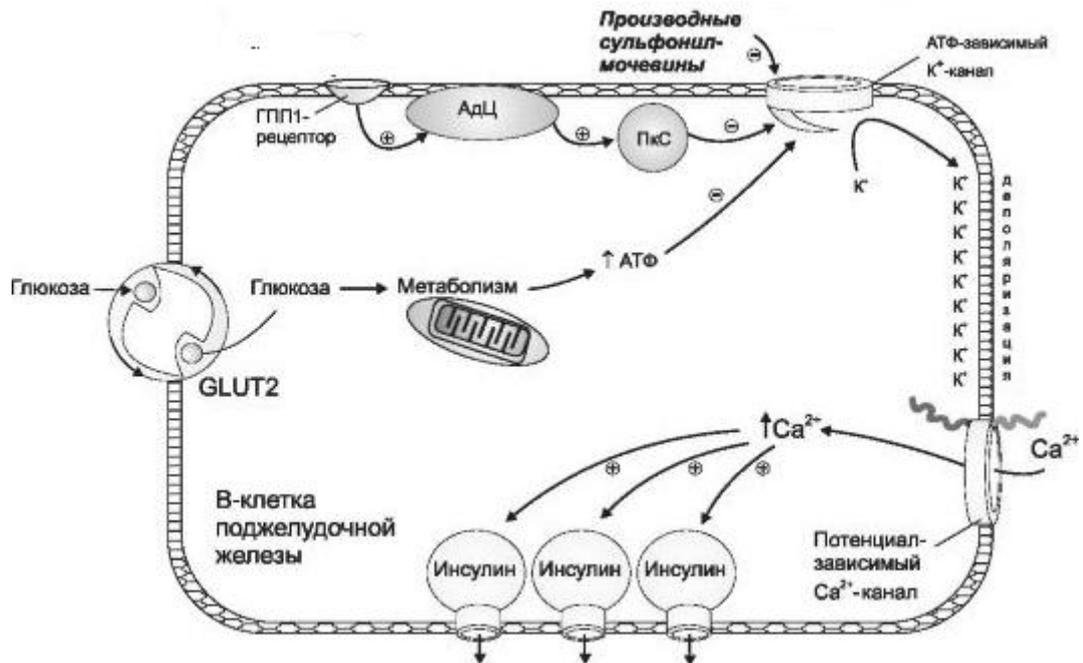


Рисунок 10 – Механизм действия производных сульфонилмочевины

Следует отметить, что АТФ-зависимые  $K^+$  каналы находятся не только в клетках поджелудочной железы, но и в кардиомиоцитах, гладкой мускулатуре, нейронах и клетках эпителия. В связи с чем чрезвычайно важной характеристикой для препаратов СМ является специфичность связывания с рецепторами, расположенными именно в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса.

### 1.3.3 Препараты тиазолидиндионов

Препараты тиазолидиндионов (глитазонов) данной группы принадлежат к относительно новому классу пероральных сахароснижающих

лекарственных средств, действующих на уровне рецепторов, активируемых пролиферацией пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors, рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом-гамма; PPAR- $\gamma$ ). Эти рецепторы находятся в основном в ядрах клеток жировой и мышечной ткани. Активация PPAR- $\gamma$  рецепторов повышает чувствительность клетки к инсулину за счет увеличения экспрессии многих генов, кодирующих протеины, отвечающие за метаболизм глюкозы и свободных жирных кислот (рис. 11). Следствием является улучшение чувствительности к инсулину на уровне печени, мышечной и жировой ткани (Hwang N, Rosen E.D., 2007).

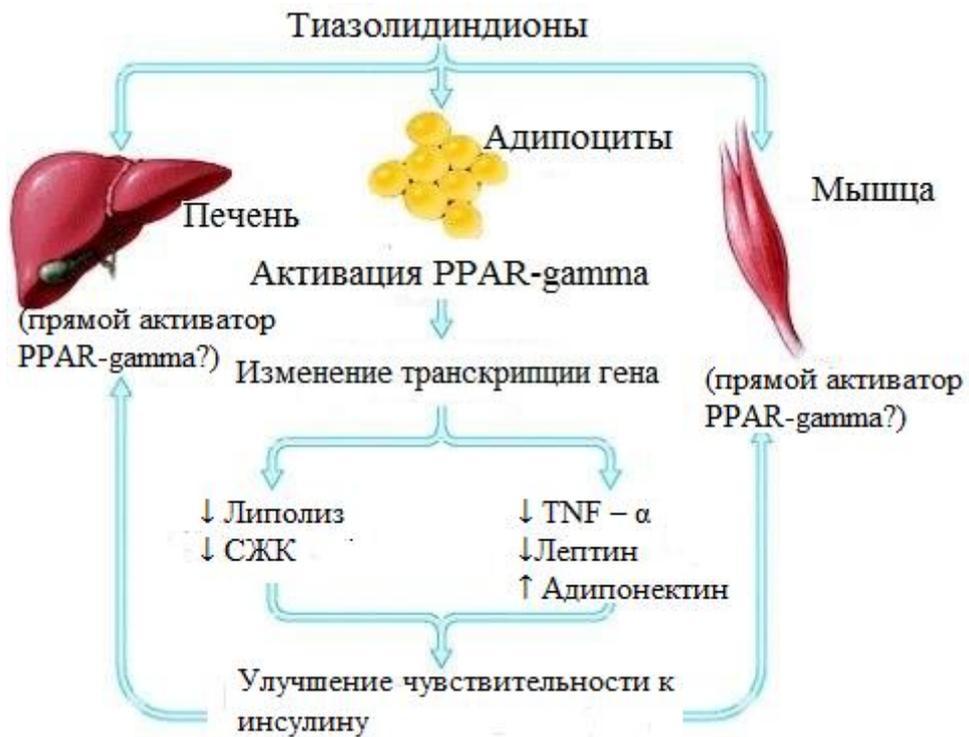


Рисунок 11 – Влияние тиазолидиндионов на PPAR-gamma рецепторы

Кроме того тиазолидиндионы снижают инсулинорезистентность за счет увеличения количества транспортеров глюкозы (а именно ГЛЮТ-1, ГЛЮТ-4) и улучшения условий утилизации глюкозы тканями, снижения уровня СЖК и триглицеридов в крови, подавления продукции глюкозы печенью, снижения концентрации TNF- $\alpha$  и ремоделирования жировой ткани (Uysal K.T., Wiesbrock S.M., 1997).

Результаты международных исследований показывают, что глитазоны эффективны для лечения СД 2 типа. Так применение росиглитазона в дозе 4 и 8 мг в сутки сопровождалось статистически значимым снижением концентрации глюкозы натощак на 0,9-2,1 ммоль/л и на 2-3 ммоль/л, соответственно, а гликозилированного гемоглобина на 0,3% и 0,6-0,7%, соответственно (Miyazaki Y. et al., 2004).

Помимо этого было продемонстрировано, что при лечении тиазолидиндионами случаи сердечной недостаточности встречаются с той же частотой, что и в группе плацебо (1%), в комбинации с инсулинотерапией – 1-3%, тогда как при проведении только терапии инсулином – 1% (Nesto R.W., 2004).

#### 1.3.4 Препараты глинидов

Прандиальные регуляторы (глиниды) являются группой, так называемых короткодействующих препаратов, которые реализуют свое сахароснижающее свойство путем быстрой стимуляции секреции инсулина, что позволяет эффективно контролировать концентрацию глюкозы после еды. Механизм действия препаратов данной группы заключается в закрытии АТФ – чувствительных  $K^+$  каналов в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, что способствует деполяризации и открытию  $Ca^{2+}$  каналов, в следствие чего, увеличивается поступление кальция в  $\beta$ -клетки, а значит увеличивается секреция инсулина (рис. 12).

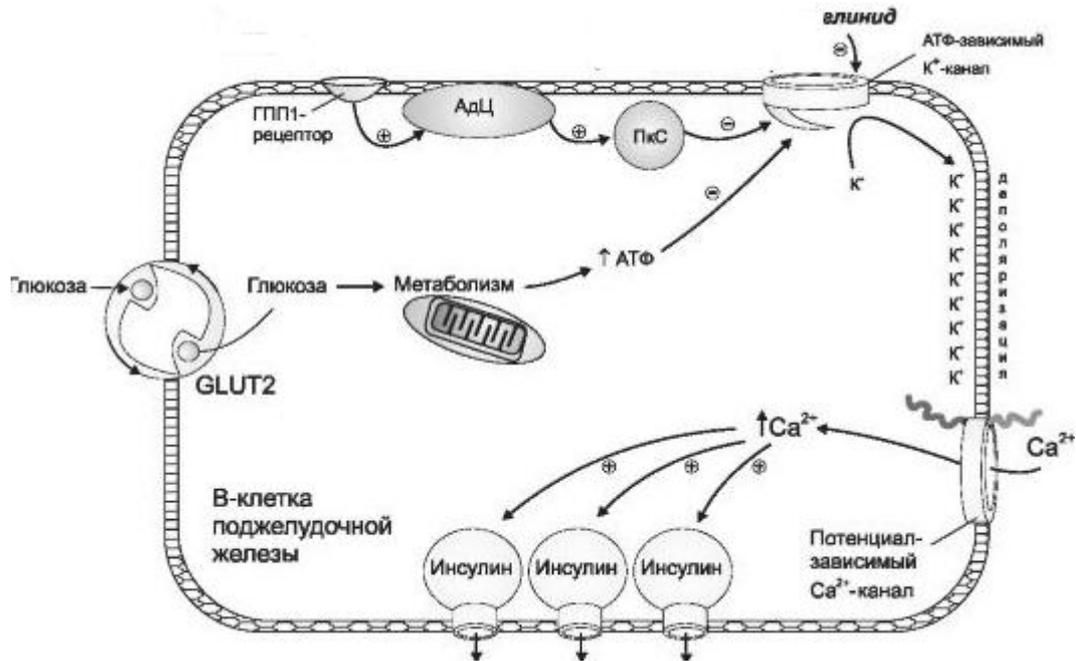


Рисунок 12 – Механизм действия глинидов

Действие глинидов на АТФ-чувствительные  $K^+$  каналы мембран  $\beta$ -клеток сопоставимо по силе фармакологического эффекта с препаратами СМ, но реализуют данный эффект эти две группы препаратов через различные мишени связывания на поверхности мембраны  $\beta$ -клетки.

### 1.3.5 Ингибиторы $\alpha$ -глюкозидазы

К ингибиторам  $\alpha$ -глюкозидазы относятся лекарственные средства, конкурирующие с пищевыми углеводами за связывающие центры ферментов желудочно-кишечного тракта, которые принимают участие в расщеплении и всасывании углеводов. Представителем данной группы является акарбоза. Следует отметить, что под действием акарбозы количество поглощаемых углеводов не уменьшается, но их всасывание значительно замедляется, тем самым надежно предотвращается резкое повышение концентрации глюкозы в крови после еды. При этом сам препарат практически не расщепляется и не всасывается в кровь.

Акарбоза не влияет на секрецию инсулина из  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, поэтому не приводит к гиперинсулинемии, не вызывает гипогликемии. Замедление всасывания глюкозы в кровь под влиянием данного препарата облегчает функционирование поджелудочной железы и

предохраняет ее от перенапряжения и истощения. При длительном применении приводит к выравниванию суточной гликемической кривой, снижению среднесуточного уровня гликемии, уменьшению уровня гликемии натощак, а также к снижению и нормализации уровня гликированного гемоглобина, что способствует профилактике поздних осложнений сахарного диабета.

### 1.3.6 Инкретиномиметики

Первым инкретиномиметиком (агонисты рецепторов глюкагоноподобного полипептида-1), утвержденным US FDA для терапии пациентов с выявленным СД 2 типа, стал эксенатид под торговым наименованием Баета<sup>®</sup> (ВУЕТТА, «Элай Лилли Восток С.А.», Швейцария).

Эксенатид является миметиком инкретина и представляет собой 39-аминокислотный амидопептид.

Многочисленные исследования доказали, что секреция ГПП-1 контролируется нутриентами, а также нервными и эндокринными факторами. В исследованиях Kieffer T.Y., 1999, Drucker D.J., 1998, Massimo S.P., 1998, было показано, что ГПП-1 секретируется в ответ на прием смешанной пищи и таких отдельных составляющих, как глюкоза, жирные кислоты и пищевые волокна (Аметов А.С., 2008).

ГПП-1 усиливает глюкозозависимую секрецию инсулина, улучшает секреторную функцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы (рис. 13), подавляет неадекватно повышенную секрецию глюкагона и способствует замедлению опорожнения желудка. Вызывает усиление глюкозозависимой секреции инсулина и оказывает другие гипогликемические эффекты, присущие инкретинам.

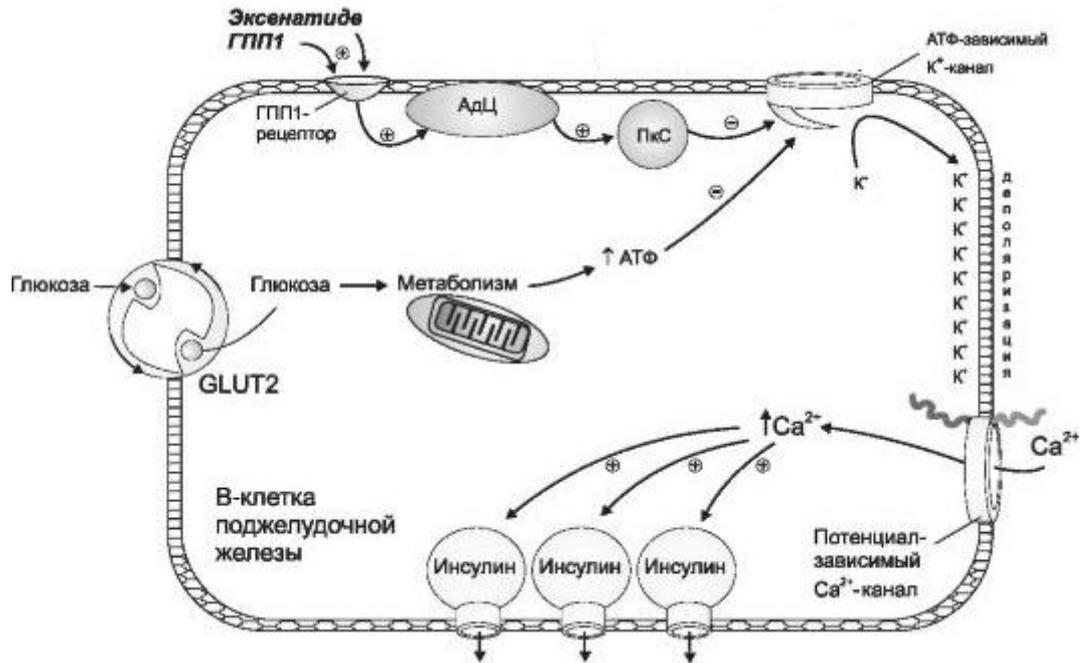


Рисунок 13 – Механизм действия эксенатида

Аминокислотная последовательность эксенатида частично соответствует таковой человека ГПП-1, в результате чего он связывается и активирует рецепторы ГПП-1, что в свою очередь приводит к усилению глюкозозависимого синтеза и секреции инсулина в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса с участием циклического АМФ и/или других внутриклеточных сигнальных путей. Также эксенатид стимулирует высвобождение инсулина из  $\beta$ -клеток в случае повышенной концентрации глюкозы. Описанные выше явления позволяют улучшать гликемический контроль и проводить эффективную терапию у пациентов с СД 2 типа за счет следующих механизмов.

Глюкозозависимая секреция инсулина. В случае гипергликемических состояний эксенатид усиливает глюкозозависимую секрецию инсулина  $\beta$ -клетками островков Лангерганса. Следует отметить, что секреция инсулина прекращается по мере снижения концентраций глюкозы в крови (т.е. приближения ее к норме), тем самым уменьшается потенциальный риск развития гипогликемии.

Первая фаза инсулинового ответа. Секреция инсулина в течение первых 10 минут, так называемая «первая фаза инсулинового ответа», специфично отсутствует у пациентов с СД 2 типа. Кроме того утрата первой фазы инсулинового ответа является ранним нарушением секреторной функции  $\beta$ -клеток при СД 2 типа. Применение эксенатида восстанавливает или значительно усиливает первую фазу инсулинового ответа у пациентов с СД 2 типа.

Секреция глюкагона. У пациентов с СД 2 типа на фоне гипергликемии применение эксенатида подавляет избыточную секрецию глюкагона. Однако эксенатид не нарушает нормального глюкагонового ответа на гипогликемию. Опорожнение желудка. Было показано, что введение эксенатида приводит к снижению аппетита. У пациентов с СД 2 типа терапия эксенатидом в сочетании с метформином и/или препаратами сульфонилмочевины приводит к снижению концентрации глюкозы в крови натощак, постпрандиальной глюкозы крови, а также показателя гликозилированного гемоглобина ( $HbA_{1c}$ ), улучшая тем самым гликемический контроль у данной группы лиц.

### 1.3.7 Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4)

Относительно недавно на фармацевтическом рынке появился новый класс пероральных препаратов для лечения СД 2 типа – ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4). Первым и единственным представителем данного класса, рекомендованным FDA, является ситаглиптин, под коммерческим названием Янувия<sup>®</sup> (МЕРК ШАРП и ДОУМ ИДЕА, Инк.). Механизм действие данного лекарственного препарата, также как и действие эксенатида, тесно связан с основополагающими биологическими эффектами гормонов желудочно-кишечного тракта. Ситаглиптин является полностью обратимым ингибитором фермента ДПП-4, а значит, способствует повышению уровня активных форм инкретинов. Фармакологическое действие ситаглиптина связано с усилением глюкозозависимого

инсулинового ответа и одновременным подавлением глюкозозависимой секреции глюкагона на фоне повышения концентрации глюкозы в крови. По результатам многочисленных международных исследований ситаглиптина установлено, что препарат имеет следующие фармакологические эффекты:

- значительное и стабильное снижение уровней глюкозы плазмы натощак;
- значительное снижение колебаний уровней глюкозы плазмы после приема пищи;
- значительное снижение уровня гликированного гемоглобина;
- улучшение секреторной функции  $\beta$ -клеток.

Ситаглиптин не влияет на массу тела, что также важно при лечении пациентов с СД 2 типа и ожирением.

Несмотря на широкий ассортимент различных групп пероральных сахароснижающих лекарственных препаратов на фармацевтическом рынке, которые модулируют различные патофизиологические аспекты СД 2 типа, не всегда удается добиться и поддерживать длительное время целевые значения гликемии. Исследование, проводившееся в рамках UKPDS (2010 год), подтвердило, что ранее присоединение инсулинотерапии к терапии пероральными сахароснижающими лекарственными препаратами может безопасно поддерживать концентрацию  $HbA_{1c}$  близкую к 7% впервые 6 лет после постановки диагноза (СД 2 типа). Таким образом, переход на инсулинотерапию при сахарном диабете 2 типа с целью компенсации сниженной секреторной функции  $\beta$ -клеток островков Лангерганса является правомочным терапевтическим подходом для достижения оптимального контроля гликемии (Yki-Jarvinen H., 2001; ADA 2013).

На сегодняшний день инсулинотерапию назначают при неэффективности диеты, максимальных терапевтических доз сахароснижающих пероральных препаратов ( $HbA_{1c} > 7,5\%$ , гликемия натощак

$>8,0$  ммоль/л при индексе массы тела  $<25$  кг/м<sup>2</sup>), при наличии кетоацидоза (UK Prospective Diabetes Study Group, 1995).

Следует отметить, что многим пациентам с установленным сахарным диабетом 2 типа для достижения и поддержания в течение длительного времени целевых значений гликемии и повышения качества жизни монотерапии обычно бывает недостаточно.

Исследование UKPDS выявило прогрессивное течение СД 2 типа. Известно, что секреторная функция  $\beta$ -клеток падает в среднем на 5% в год от момента установления диагноза (СД 2 типа). Данный феномен и объясняет снижение эффективности монотерапии, выявленной при оценке количества пациентов, имевших уровень гликированного гемоглобина менее 7% через 3,6 и 9 лет от начала наблюдения.

Таким образом, с целью сохранения контроля гликемии и предупреждения развития осложнений диабета (таких как ретинопатия, ангиопатия, нейропатия и др.) необходимо постоянное «усиление» медикаментозной терапии (Yki-Jarvinen H., 2004). В связи с чем использование комбинированной терапии на ранних и последующих этапах СД 2 типа считается оправданным. Следует отметить, что наиболее предпочтительными являются комбинации пероральных сахароснижающих препаратов, воздействующих на несколько патофизиологических составляющих сахарного диабета 2 типа (например, метформин в сочетании с сульфонилмочевинной, сульфонилмочевина в комбинации с эксенатидом). Наиболее эффективной комбинацией считается инсулин в сочетании с метформином (Романцова Т.И. и др., 2013; Доскина Е.В., 2014).

Немаловажную роль в терапии пациентов играет степень выполнения рекомендаций, предписанных врачом (комплаентность). Очевидно, что чем больше количество лекарственных препаратов используется в терапии, тем ниже комплаентность (Gupta A.K., Arshad S., 2010).

В связи, с чем ведущие фармацевтические компании разрабатывают фиксированные комбинированные лекарственные препараты. Такая терапия обеспечивает максимальную эффективность в достижении гликемического контроля (близкого к норме): имеется возможность снизить до минимума побочные действия компонентов комбинации за счет резкого уменьшения доз субстанций, входящих в комбинацию. Все это приводит к улучшению качества жизни пациентов и повышает качество терапии.

### 1.3.8 Применение антиоксидантов в терапии сахарного диабета 2 типа

Как известно одним из патогенетических звеньев развития СД является повышенная активация процессов свободнорадикального окисления (СРО). На сегодняшний день данный процесс рассматривают в качестве ключевого механизма, объединяющего основные биохимические пути токсичного влияния гипергликемии на организм в целом.

Инициатором СРО считаются свободные радикалы – молекулы или фрагменты молекул, имеющие в одном из атомов кислорода неспаренный электрон. Одним из важнейших патогенетических механизмов (связанного с процессами свободнорадикального окисления при сахарном диабете), является способность образующихся свободных радикалов вступать в реакции с фосфолипидами мембран клеток. Данные явления неизбежно приводят к структурным изменениям мембран. Происходит нарушение проницаемости мембраны клетки (за счет уменьшения числа неповрежденных фосфолипидов), потеря эластических свойств мембраны вплоть до разрыва мембран.

Для защиты инсулоцитов от потенциального повреждения избыточным количеством свободных радикалов (СР) кислорода, существует мощная внутриклеточная антиоксидантная защита. Деструкция и/или апоптоз  $\beta$ -клеток наблюдается лишь в случаях развития оксидативного стресса. Под оксидативным стрессом понимают нарушение в организме баланса между прооксидантами и компонентами системы антиоксидантной защиты, когда

отсутствует их нормальное восстановление или имеется недостаточность защитного антиоксидантного ферментного комплекса, что со временем неизбежно приводит к развитию СД. Данные процессы также являются обязательными компонентами патогенеза отсроченных сосудистых осложнений диабета. В эндокринологии накоплен большой опыт использования различных антиоксидантов для профилактики и комплексной терапии СД 2 типа. Антиоксидантная терапия у пациентов с СД 2 типа преследует две цели:

- предупреждение (замедление развития) патологии (реализация цитопротекторного действия (в отношении  $\beta$ -клеток островков Лангерганса) лекарственных препаратов);
- предупреждение развития отсроченных осложнений (ангио- и нейропатий).

Ряд публикаций описывает влияния антиоксидантов на углеводный и липидный обмены, а так же реологические свойства крови. Данные фармакологические эффекты и создают предпосылки для применения антиоксидантов с целью предупреждения и комплексной терапии СД 2 типа (Деримедведь Л. В., Бухтиярова И. П., 2007).

Одним из наиболее перспективных и изученных терапевтических средств в этой области является коэнзим  $Q_{10}$  (Ко $Q_{10}$ ) (Kuklinski B, Weissenbacher E, et al. 1994). Убихинон (убидекаренон, коэнзим  $Q_{10}$ ) является витаминоподобным веществом, синтезируется в организме человека из аминокислоты тирозин при участии витаминов  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_6$ ,  $B_{12}$ , С, фолиевой и пантотеновой кислот, а также ряда микроэлементов. В случае дефицита витаминов и микроэлементов, при нарушениях со стороны регулирующих ферментных систем даже в отсутствии какой-либо патологии эндогенный биосинтез убихинона не обеспечивает потребностей организма (Медведев О.С. и др., 2009).

Убихинон присутствует во всех клетках организма. Он необходим для синтеза аденозинтрифосфата (АТФ) в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях. Биохимические исследования показали, что именно митохондрии являются основным источником активных форм кислорода (АФК) - кислородных радикалов. При недостатке убихинона электроны начинают уходить в межмембранное пространство, что способствует образованию АФК (Аронов Д.М., 2006; Гривненникова В.Г., Виноградов А.Д., 2013). Как известно в митохондриях млекопитающих потребляется 80% экзогенного кислорода, который расходуется на синтез АТФ. Около 2% кислорода, потребляемого митохондриями, рассматриваются как основной источник супероксид-аниона  $O_2^{\cdot-}$  и  $N_2O_2$  (Skulachev V.P., 1998). Еще одним источником активных форм кислорода является  $H_2O_2$ , которая продуцируется моноаминоксидазой, флавиноксидазой, а также отток электронов с цитохрома р-450 в эндоплазматическом ретикулуме (Cadenas E., 1992). Свободные радикалы, образующиеся в клетке, способствуют повреждению липидов, белков и ДНК. Перекисное окисление липидов начинается с «удаления» атома водорода из метиленовой группы полиненасыщенной жирной кислоты. Окисленная ДНК восстанавливается посредством двух ферментативных механизмов: удалением и последующим перемещением одиночных дезоксирибонуклеотидов и/или эксцизией 25-32 нуклеотидных длинных олигомеров, которые восстанавливаются ДНК-полимеразой и позже сшиваются ДНК-лигазой (Wood R.D., 1996). Антиоксиданты – ферментные и неферментные агенты, предотвращающие или ликвидирующие активные формы кислорода. Антиоксиданты в организме млекопитающих представлены ферментами супероксиддисмутазой и различными пероксидазами (глутатионовая пероксидаза, каталаза, тиоредоксиновая редуктаза) (Wood Z.A., 2003); витамины С, Е, каротиноиды, глутатион,  $\alpha$ -липоевая кислота, флавоноиды и восстановленная форма CoQ10 являются неферментными антиоксидантами.

Митохондриальный CoQ<sub>10</sub> после окисления эффективно регенерируется дыхательной цепью и обычно находится в восстановленной форме. Изучение механизма действия CoQ<sub>10</sub> дали возможность предполагать, что восстановленный CoQ<sub>10</sub> влияет на начальный процесс и предотвращает формирование пероксильных радикалов (Ernster L. et al., 1993). Данный эффект проявляется, когда восстановленный CoQ<sub>10</sub> отдает протон с образованием убисемихинона и перекиси. Данные изменения свидетельствуют о том, что CoQ<sub>10</sub> как антиоксидант весьма эффективен.

Следует отметить, что именно в восстановленной форме CoQ<sub>10</sub> (рис. 14) выступает в качестве антиоксиданта, предотвращающего повреждение ДНК, липидов, белков и других молекул (Bhagavan H.N. 2007; Belliere J., 2012).

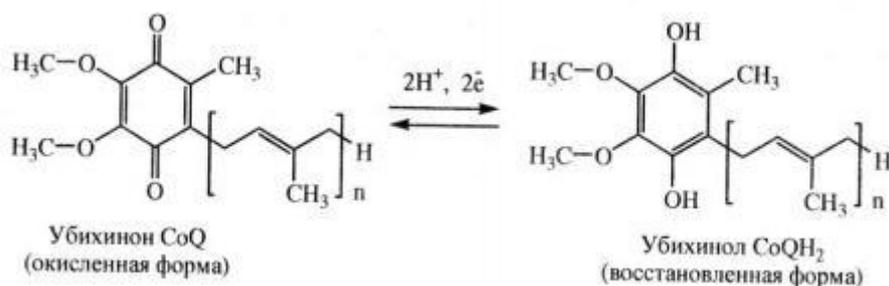


Рисунок 14 – Окисленная и восстановленная формы убихинона

В литературе описано применение убидекаренона у пациентов с СД 2 типа с целью снижения систолического давления и HbA<sub>1c</sub>, при этом снижая F2-изопростанов (индикаторы окислительного стресса) не происходит. Считается, что данный эффект связан с увеличением концентрации оксида азота (Hodgson J.M. et al., 2002).

На сегодняшний день, для терапии диабетической ретинопатии применяется лекарственный препарат Гистохром<sup>®</sup> (Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук). Препарат относится к группе антиоксидантов. Механизм действия связан со способностью Гистохрома<sup>®</sup> стабилизировать клеточные мембраны,

взаимодействовать с активными формами кислорода, свободными радикалами, проявлять свойства хелатора металлов переменной валентности. Гистохром<sup>®</sup> снижает количество продуктов перекисного окисления липидов.

#### 1.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДЕСТРУКТИВНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ В-КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА И/ИЛИ ИХ АПОПТОЗ КАК МОДЕЛЬ ДИАБЕТА

Одним из признаков развития СД 2 типа является относительный недостаток продукции инсулина, необходимого для поддержания гомеостаза глюкозы в организме.

При СД 2 типа развивается прогрессирующая недостаточность  $\beta$ -клеток островков Лангерганса и относительное снижение их массы, как следствие возрастания апоптоза (Butler A.E. et al., 2003). Доказано, что клетки инкреторного аппарата поджелудочной железы (в первую очередь)  $\beta$ -клетки обладают выраженной пластичностью. Существуют два основных пути восстановления  $\beta$ -клеток: репликация и неогенез. Первый путь (репликация) реализуется в раннем периоде жизни организма и с возрастом подавляется. Второй путь (неогенез) выполняется за счет дифференцировки различных клеток поджелудочной железы в  $\beta$ -клетки (Demeterco C. et al., 2009, Guz Y. et al., 2001).

Как известно ключевую роль в развитии апоптоза играют цистеиновые протеазы (каспазы), которые за счет взаимной активации запускают каскад «фатальных» реакций. Итогом активации каспаз 8 и 9 является протеолиз ядерных белков клетки, посредством каспазы 3 (Nakamata T., Nattori M., 2004). В первую очередь токсическое действие стрептозотоцина на  $\beta$ -клетки панкреатических островков (островков Лангерганса) реализуется путем алкилирования ДНК, что приводит к образованию таких токсических соединений как супероксид анион, пероксинитрит и оксид азота. Такие повреждения ДНК и внутриклеточных структур клетки неизбежно приводят к апоптозу эндокриноцитов ( $\beta$ -клеток) островков Лангерганса. В результате повреждения митохондриальных мембран, активации протеина Вах (белок

ускоряющий апоптоз клетки) происходит высвобождение апоптотических факторов в цитозоль, в том числе цитохрома С и белка АИФ (apoptosis inducing factor - «фактор индуцирующий апоптоз») (Снигур Г. Л., 2012).

Таким образом, стрептозотоцин может быть использован в качестве химического агента для моделирования экспериментального диабета.

При неонатальном стрептозотоцин-индуцированном диабете механизм повреждения поджелудочной железы такой же, как описан в предыдущей модели. При постановке данной модели стрептозотоцин вводят потомству лабораторных крыс в возрасте 3-5 дней. Данная экспериментальная модель также характеризуется частичным апоптозом  $\beta$ -клеток и в большей степени нарушением передачи внутриклеточного сигнала посредством ИРС и ГЛЮТ. Однако у животных в раннем возрасте активно развиты процессы пролиферации и дифференцировки (из эпителиальных предшественников)  $\beta$ -клеток.

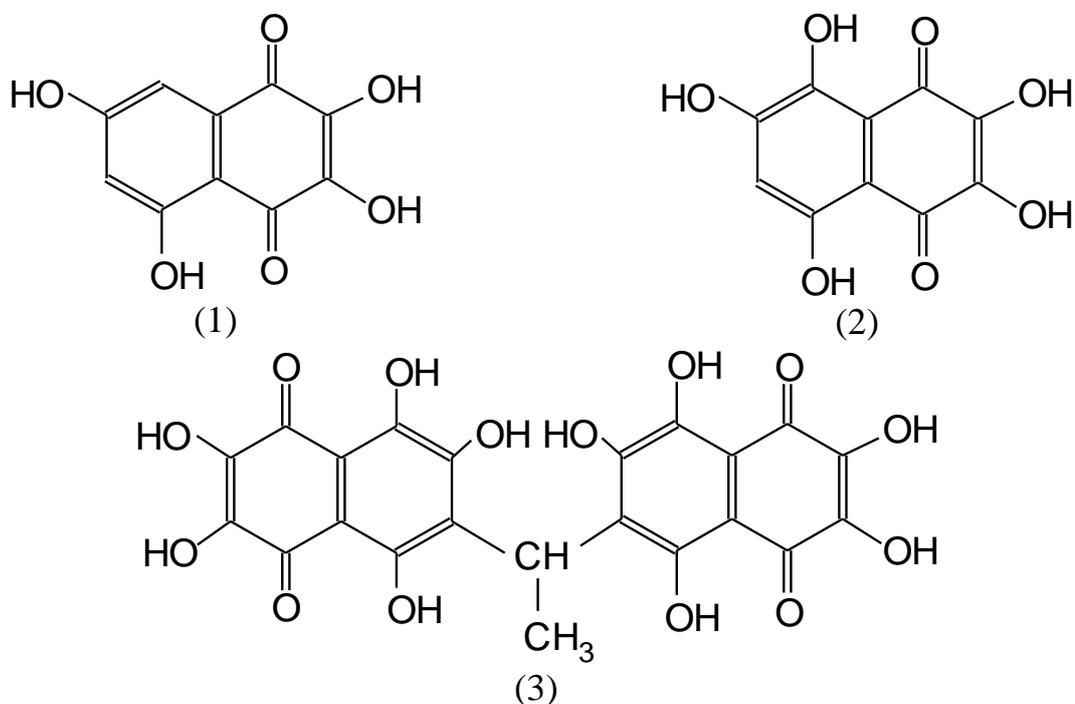
## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1.1 Объекты исследования

В качестве объектов, содержащих хиноны были использованы следующие соединения.

1. Комплексный препарат из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ), патент РФ №2441661 «Способ переработки панциря морских ежей». Действующими веществами являются полигидронафтохиноны, в том числе спинохромы В и D, а так же биснафтохиноны. Препарат стандартизован по сумме полигидроксинафтохинонов (Shikov A.N., 2011) с содержанием 0,02% (рис. 15): спинохром В (1), спинохром D (2), этилиден-6,6` (2,3,7- тригидроксинафтазарин) (3) и ангидрэтилиден-6,6` (2,3,7-тригидроксинафтазарин) (4). Серия 17/43.



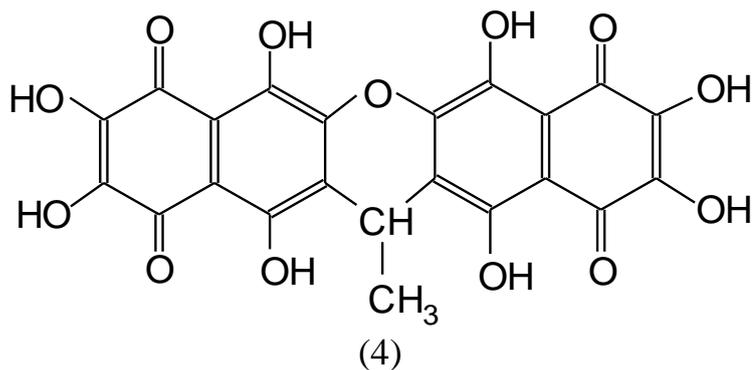


Рисунок 15 – Структуры идентифицированных в составе ПГНХМ  
полигидроксинафтохинонов

2. Убидекаренон – субстанция убидекаренона, содержание убидекаренона 99,2% (Lot. № 1-091105, производитель QuimDis, Япония).

3. Сухой экстракт бадана. Экстракт, полученный по оригинальной методике. Стандартизован по арбутину, содержание 7- 10 %. Серия В-1254.

2.1.2 Лекарственные препараты, использованные в качестве препаратов сравнения

#### 2.1.2.1 Сиофор<sup>®</sup> 500

Наименование: Сиофор<sup>®</sup> 500, таблетки, покрытые оболочкой

Производитель: Berlin-Chemie AG/Menarini Group, Германия.

Серия: 45789

Дата выпуска: 07.2010

Срок годности: 07.2013

АТХ: А10ВА02 Метформин

Клинико - фармакологическая группа: гипогликемические синтетические и другие средства.

#### 2.1.2.2 Янувия<sup>®</sup>

Наименование: Янувия<sup>®</sup>, таблетки, покрытые оболочкой, 100 мг

Производитель: MSD, Нидерланды

Серия: V6292

Срок годности: 06. 2013.

АТХ: А10ВН01

Клинико - фармакологическая группа: пероральный гипогликемический препарат

### 2.1.2.3 Родиолы экстракт жидкий

Наименование: родиолы экстракт жидкий.

Производитель: ООО «Камелия НПП», Московская область.

Фармакотерапевтическая группа: стимулирующее ЦНС средство

Лекарственная форма: экстракт жидкий

Серия №: 050807

Годен до: 09.2012

Состав препарата: активное вещество – экстракт (1:1) из корней и корневищ родиолы розовой, вспомогательные вещества – спирт этиловый 40%.

### 3.1.2.4 Сибутрамина гидрохлорид

Наименование: Сибутрамина гидрохлорид

Производитель: Sigma-Aldrich, USA (Lot. S-011)

Форма: субстанция для приготовления водного раствора

## 2.2 ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Аутбредные мыши, крысы линии Wistar для исследований были получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово РАМН». Спонтанно гипертензивные крысы (SHR крысы), получены из питомника лабораторных животных РАН Институт физиологии им. И.П.Павлова.

Характеристика животных указана в таблицах 5-8.

Таблица 5

Характеристика животных для проведения исследования на модели экспериментального стрептозотцин-индуцированного диабета 2 типа

Вид животных:	Аутбредные мыши – самцы
Источник получения:	Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»
Вес животных к началу исследования:	29 – 31 г
Возраст животных:	4 – 5 месяца
Количество самцов:	90

Таблица 6

Характеристика животных для проведения исследования на модели субмаксимальной физической нагрузки. Тест «принудительное плавание»

Вид животных:	Аутбредные мыши – самцы
Источник получения:	Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»
Вес животных к началу исследования:	19 – 22 г
Возраст животных:	3 – 4 месяца
Количество самцов:	60

Таблица 7

Характеристика животных для проведения исследования на модели экспериментального неонатального стрептозотцин-индуцированного диабета 2 типа

Вид животных:	Крысы – самки Wistar Крысы – самцы Wistar
Источник получения:	Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»
Вес животных к началу исследования:	6 - 10 г
Возраст животных:	3 – 5 дней (моделирование патологии)
Количество самцов:	36 крыс-самок и 36 крыс-самцов

Таблица 8

Характеристика животных для проведения исследования на модели экспериментального метаболического синдрома, вызванного применением рациона «диета кафетерия»

Вид животных:	Крысы-самцы SHR
Источник получения:	питомник лабораторных животных РАН Институт физиологии им. И.П.Павлова
Вес животных к началу исследования:	250 – 300 г
Возраст животных:	3 месяца
Количество самцов:	60

Лабораторные животные до начала исследования содержались 14 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных каждый день контролировали клиническое состояние путем визуального осмотра. Лабораторные животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы включены не были.

Перед началом исследования лабораторные животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы методом блочной рандомизации, пользуясь генератором случайных чисел в статистической программе Statistica 6.0.

Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер, маркировка животных осуществлялась перманентным маркером у основания хвоста.

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденными ГОСТ Р 53434-2009г., по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

В период акклиматизации и эксперимента животные были размещены в поликарбонатных клетках фирмы TECNIPLAST (Италия) 1500U евростандарт, тип IV S (480x375x210 мм, площадь пола 1500 см<sup>2</sup>) со

стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. В качестве подстилки использовались древесные гранулы.

Лабораторных животных кормили комбикормом «Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, приготовленным по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.

Лабораторные животные получали воду, соответствующую ГОСТу «Вода питьевая» 2874-82. Корм и вода давались *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки.

Световой режим составлял 12 часов света и 12 часов темноты. Температура воздуха поддерживалась в пределах 18-22 °С, относительная влажность – 50-70%. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO<sub>2</sub> не более 0,15 объемных %, аммиака – не более 0,001 мг/л.

Температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно. Никаких существенных отклонений этих параметров в период акклиматизации и в ходе эксперимента не произошло.

### 2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У МЫШЕЙ

Продолжительность эксперимента составила 20 дней. Дизайн исследования приведен в таблице 9.

На 10 день после введения стрептозотоцина, животные были распределены на 6 групп: интактная (животные без модельной патологии); контроль (модельная патология без лечения); комплекс ПГНХМ (модельная патология и терапия комплексом ПГНХМ в дозе 1,8 мг/кг); убидекаренон (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 11,4 мг/кг); экстракт бадана (модельная патология и терапия специальным экстрактом бадана в

дозе 50 мг/кг); метформин (модельная патология и терапия препаратом сравнения метформин в дозе 176 мг/кг).

Таблица 9

## Дизайн исследования

Манипуляция	День эксперимента		
	1-10	11-20	21
Введение стрептозотоцина 60 мг/кг	1		
Введение никотиновой кислоты 210 мг/кг на животное	1		
Развитие патологии	1-10		
Контроль развития патологии		11	
Введение препаратов			
Масса тела	1	11, 15, 20	
Определение концентрации глюкозы		11, 15, 20	
Определение глутатиона в эритроцитах			
Определение МДА в плазме крови			
Определение стабильных метаболитов оксида азота в плазме крови			
Эвтаназия			

Животным всех групп (кроме интактной) однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин (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. За это время у животных развивался диабет смешанного типа, который затрагивал 3 основных механизма утилизации глюкозы: прецепторный, рецепторный, передачу сигнала от рецептора к транспортным белкам. Начиная с 10 дня после индукции патологии, мышам ежедневно вводили тестируемые объекты по лечебной схеме в течение 10 дней. В ходе исследования проводили определение концентрации глюкозы в периферической крови на 10 день – для оценки развития патологии и на 15 и 20 дни для оценки фармакологической активности тестируемых объектов.

Также было проведено определение антиоксидантного статуса животных и влияние на него тестируемых объектов, для этого на 20 день определяли концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ) в лизате эритроцитов, малонового диальдегида (МДА) и стабильных метаболитов оксида азота (СМОА) в плазме крови.

#### 2.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ Тестируемых объектов на модели субмаксимальной нагрузки. ТЕСТ «ПРИНУДИТЕЛЬНОЕ ПЛАВАНИЕ»

Исследование актопротекторной активности было проведено на модели субмаксимальной физической нагрузки с использованием теста «Принудительное плавание» (Porsolt R.D., 1977). Продолжительность эксперимента составила 8 дней. Дизайн исследования приведен в таблице 10.

Таблица 10

Дизайн исследования

Манипуляция	День исследования						
	1	2	3	4	5	6	7
Введение тестируемых объектов							
Проведение теста «Принудительное плавание»							
Определение концентрации глюкозы в крови							
Определение концентрации лактата в крови							
Эвтаназия							

После адаптационного периода, животные были распределены на 6 групп: интактная (животные без модельной патологии); контроль (модельная патология без лечения); комплекс ПГНХМ (модельная патология и терапия

комплексом ПГНХМ в дозе 1,8 мг/кг); убидекаренон (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 5,2 мг/кг); экстракт бадана (модельная патология и терапия специальным экстрактом бадана в дозе 3 мг/кг); экстракт родиолы розовой (модельная патология и терапия препаратом сравнения экстракт родиолы розовой в дозе 9000 мкг/кг).

С 1-го по 7-ой дни эксперимента животным (кроме интактной группы) вводили тестируемые объекты, по профилактической схеме. На 7-ой день исследования, через 4 часа 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  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Окончанием теста считали погружение животного под водяное «зеркало» на 7 секунд. После выполнения теста у животных проводили измерение концентрации глюкозы и лактата в периферической крови.

## 2.5. ДИЗАЙН ОЦЕНКИ ПАНКРЕОПРОТЕКТОРНОГО И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕОНАТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА

Исследование панкреопротекторной и гиполипидемической активности исследуемых субстанций было проведено на модели экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного СД2.

Продолжительность эксперимента составила 7 недель. Исследование выполнено на 72 (36 крыс-самок и 36 крыс-самцов) детенышах крыс линии Wistar, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово РАМН». Дизайн исследования приведен в таблице 11.

## Дизайн исследования

Манипуляции	Возраст животного, недели				
	1	4	5	6	7
Внутрибрюшинное введение стрептозотоцина 60 мг/кг					
Введение экспериментальных препаратов					
Регистрация массы тела, концентрации глюкозы					
Регистрация уровня инсулина					
Определение показателей липидного спектра					
Эвтаназия в CO <sub>2</sub> – камере, с дальнейшим обескровливанием					
Забор образцов тканей Поджелудочной железы и парапанкреатического жира					

Спустя 4-е недели после введения СТЗ, животные были распределены на 6 групп: интактная (животные без модельной патологии); контроль (модельная патология без лечения); убидекаренон 7,4 мг/кг (модельная патология и терапия убидекаренон в дозе 7,4 мг/кг); убидекаренон 5,2 мг/кг (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 5,2 мг/кг); убидекаренон 2,6 мг/кг (модельная патология и терапия убидекареноном в дозе 2,6 мг/кг); Янувия<sup>®</sup> (модельная патология и терапия препаратом сравнения Янувия<sup>®</sup> в дозе 10,7 мг/кг).

Животным всех групп (кроме интактной) однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотин (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг на 3-5 сутки жизни. В раннем возрасте у животных выражены регенеративные свойства

поджелудочной железы, поэтому введение СТЗ вызывает нарушение углеводного обмена, связанного с нарушением передачи сигнала от инсулинового рецептора к транспортным белкам (ГЛЮТ). Контроль развития патологии выполняли в 1-ый день 4-ой недели. В эксперимент включали животных с концентрацией глюкозы в крови более 6,5 ммоль/л.

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. Эвтаназию животных проводили в CO<sub>2</sub>-камере с дальнейшим обескровливанием из полостей сердца и осуществляли забор поджелудочной железы для дальнейшего гистологического исследования.

## 2.6. МЕТОД АНАЛИЗА ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО, ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕСТИРУЕМЫХ ОБЪЕКТОВ НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА, ВЫЗВАННОГО ПРИМЕНЕНИЕМ РАЦИОНА «ДИЕТА КАФЕТЕРИЯ»

Исследование гипогликемического, гиполипидемического действия тестируемых объектов было проведено на 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 веса животных, увеличению площади адипоцитов и постепенному развитию гипергликемии и инсулинорезистентности. В данном случае механизм инсулинорезистентности – рецепторный. За счет увеличения площади адипоцитов происходит уменьшение количества инсулиновых рецепторов на единицу площади (Morris M.J., 2008; Caimari A 2010; Heyne A. 2009; Rolls B.J. 1980).

Продолжительность эксперимента составила 11 недель. Исследование выполнено на 60 крысах линии SHR (Spontaneously Hypertensive rat), полученных из питомника лабораторных животных РАН Институт физиологии им. И.П.Павлова. Дизайн исследования приведен в таблице 12.

Таблица 12

## Дизайн исследования

Манипуляция	День исследования				
	1	15	23	24	25
Масса тела					
Оценка потребления пищи и воды					
ГТТ (глюкозотолерантный тест)					
Голодание 18 часов					
Оценка потребления пищи после голодания					
Тест «Открытое поле»					
Определение концентрации триглицеридов и холестерина					
Эвтаназия					

После адаптационного периода животные были распределены на 4-е группы: интактная (животные на стандартном рационе вивария); контроль (модельная патология – рацион «диета кафетерия»); экстракт бадана 50 мг/кг (модельная патология – рацион «Диета кафетерия» и терапия экстрактом бадана 50 мг/кг); сибутрамина гидрохлорид (модельная патология – рацион «Диета кафетерия» и терапия сибутрамина гидрохлорид 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. Данная модель приводит к развитию глюкозотолерантности за счет нарушения рецепторного уровня утилизации глюкозы. С 1-ого дня 6-ой недели животным вводили исследуемые препараты на протяжении 5-ти недель по лечебной схеме. В ходе эксперимента проводили измерение артериального давления (один раз в две недели), еженедельное определение концентрации глюкозы, холестерина и триглицеридов. Определение концентрации инсулина и глюкозотолерантный тест проводили на 1-ой, 6-ой и 11-ой неделях эксперимента. Эвтаназию животных проводили в CO<sub>2</sub>-камере.

## 2.7. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ

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. Метод определения глюкозы электрохимический, в основе которого лежит биосенсорный глюкозооксидазный принцип. Глюкоза, содержащаяся в крови, вступает в электрохимическую реакцию с реактивами тест-полоски, при этом возникает слабый электрический ток. Сила тока меняется пропорционально содержанию глюкозы в крови. Линейный диапазон измерения 1,1-33,3 ммоль/л.

Определение концентрации глюкозы в цельной крови при проведении глюкозо-толерантного теста (ГТТ) проводили натощак (после 12 часов голодания), оценивали начальный уровень глюкозы. Затем животным внутривенно вводили раствор глюкозы (ЗАО «Вектон», Россия), приготовленный таким образом, что в 1 мл было растворено 60 мг глюкозы.

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, определение вели в течение 60 секунд. Данный метод основан на принципе рефлексивной фотометрии (прибор измеряет поток оптического излучения, отраженного от тест-полоски) и позволяет определить 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 минут со скоростью 3000 об/мин (ускорение около 1500g) на лабораторной медицинской центрифуге ОПН-8УХЛ4.2. Метод основан на конкурентном связывании свободного инсулина в сыворотке периферической крови и комплекса ацетилхолинэстераза-инсулин с моноклональными антителами к инсулину крысы. Для колориметрического определения используется реагент Элмана, служащий субстратом для ацетилхолинэстеразы. При этом интенсивность цветной ферментативной реакции обратно пропорциональна концентрации инсулина в экспериментальных пробах. Оптическую плотность измеряли 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 («Витал-Диагностик», Россия) на

биохимическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» (США). Принцип метода основан на гидролизе эфиров холестерина холестеролэстеразой с образованием свободного холестерина. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность образующейся окраски прямо пропорциональна концентрации холестерина. Оптическую плотность измеряют 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 («Витал-Диагностик», Россия) на биохимическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» (США). Принцип метода основан на том, что триглицериды ферментативно гидролизуются на глицерин и свободные жирные кислоты под действием липазы. Концентрация глицерина определяется ферментативным методом, связанным с реакцией Триндера с образованием конечного продукта – киномина. 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 в пластмассовую пробирку (5 мл, коническое дно с юбкой, завинчивающаяся крышка, стерильная, «РР»). Для получения лизата 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. Гемолизат приготавливается путем

добавления к эритроцитарной массе дистиллированной воды и встряхивания. Исследования проводили на спектрофотометре Shimadzu PharmaSpec UV-1700 (Япония) в области 412 нм (Ellman G.L. 1959; Sedlak J. 1968) путем регистрации 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 в пластмассовую пробирку (5 мл, коническое дно с юбкой, завинчивающаяся крышкой, стерильная, «PP»). 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 протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Максимум поглощения комплекса приходится на 532 нм. Концентрация ТБК-активных продуктов (малонового диальдегида) в сыворотке крови рассчитывается по формуле:

$$C_{\text{мда}} = (D * V_2) / (\epsilon * l * V_1) \quad (1)$$

где D - оптическая плотность анализируемого образца с сывороткой; V1 - объем сыворотки, взятой на определение, мл; V2 - конечный объем реакционной смеси, мл; l - длина кюветы, см (обычно l = 1 см);  $\epsilon$  – молярный коэффициент экстинкции комплекса МДА с ТБК, равный  $156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Линейность методики 0,67 – 3,77 нмоль/мл (Tian L., 1998).

Определение концентрации стабильных метаболитов оксида азота (СМОА) 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). Концентрация метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов) в пробе с учетом разбавления при депротеинизации вычисляется по формуле:

$$C_{NO} = k \cdot \frac{D - 0.0109}{0.0042}, \quad (2)$$

где  $k$  – коэффициент разбавления плазмы при депротеинизации, равный 3;

$C$  – концентрация метаболитов NO в плазме, мкмоль/л;

$D$  – оптическая плотность анализируемого раствора ( $D = D_k - D_0$ ).

Линейность методики находится в диапазоне концентраций нитрат- и нитрит-ионов 60 – 600 мкмоль/л (ГФ XI; Метельская В.А. 2005 ).

Определение концентрации гликогена в печени, после эвтаназии животных и забора печени, образцы подвергали заморозке. Количество гликогена определяли спектрофотометрическим методом (Chun&Yin, 1998). Метод основан на том, что после обработки 0,1 г (точная навеска) печени 30% раствором КОН при 100 °С в течение 20 мин к раствору в пробирку прибавляют 4 мл этилового спирта и центрифугируют при 4000×g в течение 15 мин. К полученному осадку прибавляют 3 мл дистиллированной воды и 2 мл 0,2% раствора антрона, нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут, охлаждают до температуры 10-15 °С и измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре PharmaSpec 1700 (Shimadzu, Япония).

Содержание гликогена в печени мышей ( $X_1$ ), в мг/г, рассчитывают по формуле:

$$X_1 = \frac{a \cdot V \cdot 10^{-3}}{m} \quad (3)$$

, где  $a$  – количество глюкозы, определенное по калибровочному графику, мкг/мл;

$m$  – навеска печени, г;

$V$  – разведение, мл;

$10^{-3}$  – пересчет микрограммов в миллиграммы.

## 2.8. МЕТОД ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

### 2.8.1. Гистологическое исследование поджелудочной железы

После эвтаназии животных поджелудочную железу фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина («Первая лабораторная компания», Россия) в течение 24 часов, 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 проводилось при помощи светооптического микроскопа Axio scope A1 (Karl Zeiss, Германия), объектив 20.

### 2.8.2. Гистологическое исследование парапанкреатической жировой ткани

После эвтаназии животных парапанкреатическую жировую ткань (адипоциты эпидидимальной области) фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина («Первая лабораторная компания», Россия), 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. 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.

## 2.9. МЕТОД ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Тест «открытое поле» - данная методика широко используется в психофармакологии и позволяет оценить эффективность веществ, влияющих на двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и эмоциональный статус.

Вариантом методики для крыс служила площадка размером  $1 \text{ м}^2$  с прозрачной крышкой. Пол площадки был равномерно разделен линиями на 16 квадратов. Предварительно крыс в течение 3-х минут выдерживали в темноте, после чего помещали в центр площадки. Наблюдение за животными велось 3 минуты, при этом оценивали горизонтальную двигательную активность (ГДА) – количество посещенных квадратов и центровых посещений; вертикальную двигательную активность (ВДА) – количество пристеночных и свободных стоек, груминг.

## 2.10. 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 критерий Стьюдента для зависимых и независимых переменных.

В качестве непараметрических критериев – 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

### Глава 3. ОЦЕНКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИРОДНЫХ ХИНОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

#### 3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИНОНОВ НА УТИЛИЗАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА

Следует отметить, что данная экспериментальная модель позволяет сформировать диабет с доминирующим повреждением поджелудочной железы за счет прямого прооксидантного действия стрептозотоцина, связанного с усилением перекисного окисления липидов.

Известно, что на фоне введения данного панкреотоксина у лабораторных животных резко увеличивается содержание как первичных, так и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в поджелудочной железе и печени. Следует отметить, что к усилению окислительного стресса также приводит и развивающаяся гипергликемия (в ответ на введение стрептозотоцина), а так же аутоокисление избытка глюкозы (Эскина К.А., 2007; Чистяков Д. А., 2000).

На модели экспериментального СД у мышей-самцов (группы Контроль), спустя 10 дней после моделирования патологии, наблюдали нарушение углеводного обмена и состояния антиоксидантной системы в сравнении с интактной группой. Концентрация глюкозы в периферической крови на протяжении всего эксперимента была статистически значимо выше, чем у интактных в среднем на 64% (таблица 13).

На данной экспериментальной модели было изучено влияние на углеводный обмен (утилизацию глюкозы) и антиоксидантный статус следующих объектов:

1. Комплексный препарат из панциря зеленых морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* (ПГНХМ).

2. Убидекаренон – субстанция убидекаренона, содержание убидекаренона 99,2% (Lot. № 1-091105, производитель QuimDis, Япония);
3. Сухой экстракт бадана, полученный по оригинальной методике.

Таблица 13

Концентрация глюкозы в периферической крови мышей-самцов, ммоль/л,  
 $M \pm m$ , n=15

№ п/п	Группа	День введения препарата		
		0	5	10
1	Интактная	4,7±0,3	4,6±0,4	4,8±0,2
2	Контроль (диабет+плацебо)	6,9±0,5●	8,5±0,4●	7,7±0,4●
3	Комплекс ПГНХМ 1,8 мг/кг	5,9±0,5●	6,5±0,4●×	6,4±0,3●×
4	Убидекаренон 11,4 мг/кг	6,5±0,3●	5,9±0,3●×	5,5±0,4●×
5	Экстракт бадана 50 мг/кг	7,5±0,4●	6,1±0,5●×	5,7±0,3●×
6	Метформин 176 мг/кг	6,8±0,3●	6,3±0,5●×	6,1±0,3●×

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента);

× - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента).

В группе мышей-самцов, получавших исследуемый комплекс ПГНХМ, концентрация глюкозы была статистически значимо ниже, чем у животных группы Контроль в среднем на 17,5%. Следует отметить, что нормализацию углеводного обмена наблюдали уже с 5 дня систематического введения комплекса ПГНХМ.

У животных получавших убидекаренон концентрация глюкозы была статистически значимо ниже, чем у животных группы Контроль в среднем на 33%.

У животных получавших экстракт бадана концентрация глюкозы была статистически значимо ниже, чем у животных группы Контроль в среднем на 31%.

Систематическое, 10 дневное, применение препарата сравнения метформин способствовало статистически значимому уменьшению концентрации глюкозы в периферической крови лабораторных животных в среднем на 24%.

На данной экспериментальной модели наибольшим сахароснижающим действием обладал убидекаренон. Следует отметить, что по литературным данным, в ходе клинических испытаний, при 12 недельной лечебной схеме введения коэнзима Q<sub>10</sub> было установлено статистически значимое уменьшение концентрации гликозилированного гемоглобина (на  $0,37 \pm 0,17\%$ ;  $p < 0,0345$ ) у пациентов с СД 2 типа (Hodgson J.M. et al., 2002).

Следует отметить, что тестируемые образцы хинонов на модели экспериментального СД проявили гипогликемический эффект сопоставимый с эффектом препарата сравнения метформином. Полученные эффекты препарата сравнения соответствуют литературным данным, так, например, применение метформина в дозе 150 мг/кг на фоне экспериментального стрептозотоцин-индуцированного диабета приводит к уменьшению концентрации глюкозы на 22% (Dalia O. Saleh, Ayman R. Bayoumi, 2013).

Данные многочисленных исследований позволяют считать, что одним из важных факторов нарушений метаболизма при сахарном диабете является развитие окислительного стресса, что в свою очередь приводит к периферическим сосудистым нарушениям (Bayens J.W., Thorpe S.R., 2000) и развитию гипоксических изменений, как общего, так и местного характера, что, в свою очередь, приводит к развитию ретинопатии, микроангиопатии, нейродегенеративных изменений и других так называемых «отсроченных осложнений» диабета и метаболического синдрома.

Так, например, ранее в нашей лаборатории было установлено, что исследуемый Комплекс ПГНХМ обладает выраженной антирадикальной активностью (Ivanova S.A., Pozharitskaya O.N., 2011).

Была проведена оценка влияния тестируемых объектов на антиоксидантную систему на фоне экспериментального стрептозотоцинового диабета. При этом в группе Контроль наблюдали уменьшение концентрации восстановленного глутатиона (ВГ) в гемолизате эритроцитов в 2,3 раза и увеличение концентрации малонового диальдегида (МДА) в плазме крови в 1,7 раза (таблица 14), что свидетельствует о наличии окислительного стресса у лабораторных животных.

Таблица 14

Влияния тестируемых объектов на антиоксидантную систему на фоне стрептозотацинового диабета,  $M \pm m$ ,  $n=15$

№ п/п	Группа	ВГ, ммоль/мл	МДА, мкмоль/л
1	Интактная	0,60±0,04	11,1±0,4
2	Контроль (диабет+плацебо)	0,26±0,06●	19,0±1,3●
3	Комплекс ПГНХМ 1,8 мг/кг	0,66±0,05×	9,4±0,7×
4	Убидекаренон 11,4 мг/кг	0,68±0,06×	9,2±0,5×
5	Экстракт бадана 50 мг/кг	0,61±0,05×	10,1±0,3×
6	Метформин 176 мг/кг	0,62±0,04×	12,5±1,1×

Примечание: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента);

× - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента).

Из данных, приведённых в таблице 14 видно, что выраженность изменения вторичных продуктов ПОЛ – МДА под действием Комплекса ПГНХМ на фоне экспериментального СД, относительно стрептозотацин-индуцированных животных снизилась в крови в 2 раза, а уровень ВГ

9\*бувеличился в 2,5 раза, что соответствовало значениям данных показателей в интактной группе.

На фоне систематического 10 дневного введения убидекаренона наблюдали статистически значимое снижение МДА в 2 раза и увеличение концентрации ВГ в 2,6 раза.

Применение экстракта бадана приводило к статистически значимому снижению МДА в 1,7 раза и увеличение концентрации ВГ в 2,3 раза. На фоне систематического применения препарата сравнения метформин наблюдали статистически значимое снижение МДА в 1,5 раза и увеличение концентрации ВГ в 2,4 раза.

Таким образом, на фоне 10 дневного применения тестируемых объектов происходила нормализация антиоксидантного статуса, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых отличий концентраций ВГ и МДА от группы интактных животных, причем нормализация данных показателей коррелирует со снижением сахара в крови животных. Таким образом, сохранение нормальной концентрации глюкозы крови позволяет защитить организм от окислительного стресса и предотвратить развитие отсроченных осложнений диабета, связанных с гипергликемией. Как известно, эндотельная дисфункция играет важную роль в патогенезе сосудистых осложнений сахарного диабета. Из многочисленных исследований известно, что при развитии дисфункции эндотелия снижается синтез таких вазодилататоров, как оксид азота и фактор Виллебранда (Banning D.P., 1991).

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).

В нашем исследовании установлено, что тестируемые объекты способствовали статистически значимому увеличению концентрации СМОА почти в 2 раза по отношению к контрольным животным (таблица 15).

Таблица 15

Влияния тестируемых объектов на концентрацию окиси азота в периферической крови мышей-самцов, мкмоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=15$

№п/п	Группа	Концентрация окиси азота
1	Интактная	213±12,3
2	Контроль (диабет+плацебо)	137,4±9,7●
3	Комплекс ПГНХМ 1,8 мг/кг	266,9±22,0●×
4	Убидекаренон 5,2 мг/кг	258,0±9,3●×
5	Экстракт бадана 50 мг/кг	254,3±8,3●×
6	Метформин 176 мг/кг	248,4±9,6●×

Примечание: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента);

× - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента).

Все исследуемые препараты (комплекс ПГНХМ в дозе 1,8 мг/кг, убидекаренон в дозе 5,2 мг/кг, экстракт бадана 50 мг/кг), а также препарат сравнения метформин в дозе 176 мг/кг способствовали статистически значимому увеличению концентрации оксида азота по отношению к контрольным животным.

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).

### 3.2. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХИНОНОВ НА УТИЛИЗАЦИЮ ГЛЮКОЗЫ ПРИ СУБМАКСИМАЛЬНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ В ТЕСТЕ «ПРИНУДИТЕЛЬНОЕ ПЛАВАНИЕ»

Оценку влияния тестируемых объектов проводили на модели субмаксимальной физической нагрузки в тесте «Принудительное плавание». В ходе эксперимента оценивали время плавания животных, концентрацию глюкозы и лактата в периферической крови.

Тестируемые объекты вводили по профилактической схеме на протяжении 7 дней. Через 4 часа после 7 введения тестируемых объектов, животных (кроме интактной группы) подвергали тесту «Принудительное плавание».

Контрольная группа получала носитель (0,5% раствор микрокристаллической целлюлозы), интактные животные не получали ни носитель, ни тестируемые объекты.

В качестве препарата сравнения был выбран экстракт родиолы розовой, поскольку экстракт обладает двойным действием, с одной стороны адаптогенным, с другой стороны ноотропным (Саратиков А.С., Краснов Е.А.1987; Воронина Т.А., 1989;).

После выполнения животными субмаксимальной физической нагрузки (таблица 16) проводили оценку биохимических показателей углеводного обмена – концентрацию глюкозы и лактата в периферической крови (таблица 17). Измерение показателей крови проводили спустя 3 – 5 минут после окончания заплыва животного, что было связано с необходимостью первоначальной обсушки, а также помещением мыши в рестрейнер и подготовкой хвостовой вены к забору крови.

Таблица 16

Время плавания мышей-самцов, сек,  $M \pm m$ ,  $n=10$

№п/п	Группа	Время плавание
1	Интактные	-
2	Контроль	988±131
3	Комплекс ПГНХМ	2356±423*
4	Убидекаренон 5,2 мг/кг	2218±561*
5	Экстракт бадана 3 мг/кг	3125±353*×
6	Экстракт родиолы розовой 9 мл/кг	2179±544*

Примечания: \* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента);

× - различия статистически значимы по сравнению с группой Экстракт родиолы розовой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента)

Из данных таблицы 16 видно, что применение хинонов привело к увеличению выносливости животных, что нашло отражение в статически значимом увеличении времени плавания по отношению к контрольной группе.

Следует отметить, что на фоне систематического введения экстракта бадана физическая выносливость животных была выше, чем у животных, получавших препарат сравнения Экстракт родиолы розовой. Данные изменения нашли свое отражение в статистически значимом увеличении времени плавания на 43%.

Таблица 17

Показатели углеводного обмена у мышей после теста «Вынужденное плавание до утомления», моль/л,  $M \pm m$ ,  $n=10$

№п/п	Группа	Концентрация глюкозы	Концентрация лактата
1	Интактные	4,9±0,2	3,3±0,3
2	Контроль	7,3±0,4●	5,0±0,4●
3	Комплекс ПГНХМ	8,2±0,5●	4,2±0,4●
4	Убидекаренон 5,2 мг/кг	7,8±0,4●×	3,8±0,4
5	Экстракт бадана 3 мг/кг	6,5±0,3●*×	4,5±0,8
6	Экстракт родиолы розовой 9 мл/кг	9,1±0,6●*	4,6±0,9

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента);

× - различия статистически значимы по сравнению с группой Экстракт родиолы розовой ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента).

Из данных таблицы 17 видно, что после перенесенной физической нагрузки в группе контрольных животных наблюдали гипергликемию и лактоацидоз, что нашло отражение в статистически значимом увеличении концентрации глюкозы и лактата 51% и 49%, соответственно.

Полученные данные характеризуют процесс утомления, который возникает вследствие наращивания нагрузки на мышцы (Михайлова А.В., 2013).

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 (рисунок 16).

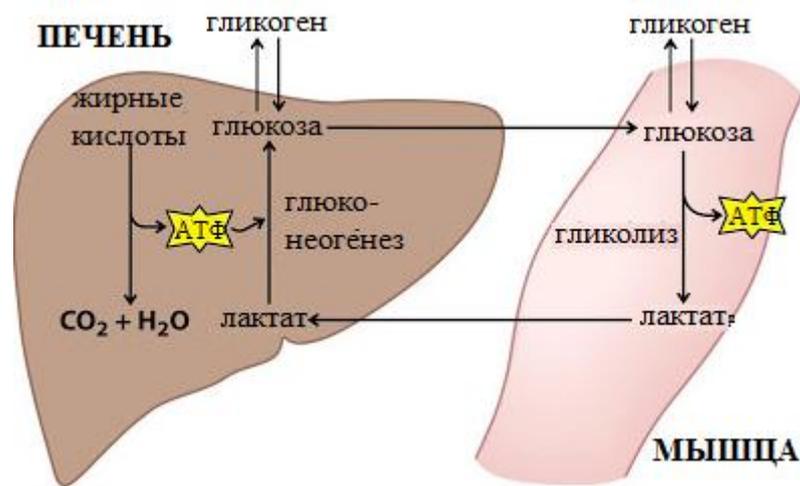


Рисунок 16 – Цикл Кори (глюкозо – лактатный цикл)

Препарат сравнения – экстракт Рдиолы розовой, проявил актопротекторный эффект, однако не улучшал энергетику клетки, наоборот препарат истощал энергетическое депо организма, о чем свидетельствует лактоацидоз и гипергликемия.

Систематическое семидневное введение тестируемого 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.

Тестируемый объект убидекаренон оказал актопротекторный эффект, дополнительно препарат улучшал энергообеспечение клетки (рис. 17), о чем свидетельствует отсутствие лактоацидоза, уменьшение уровня глюкозы 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).

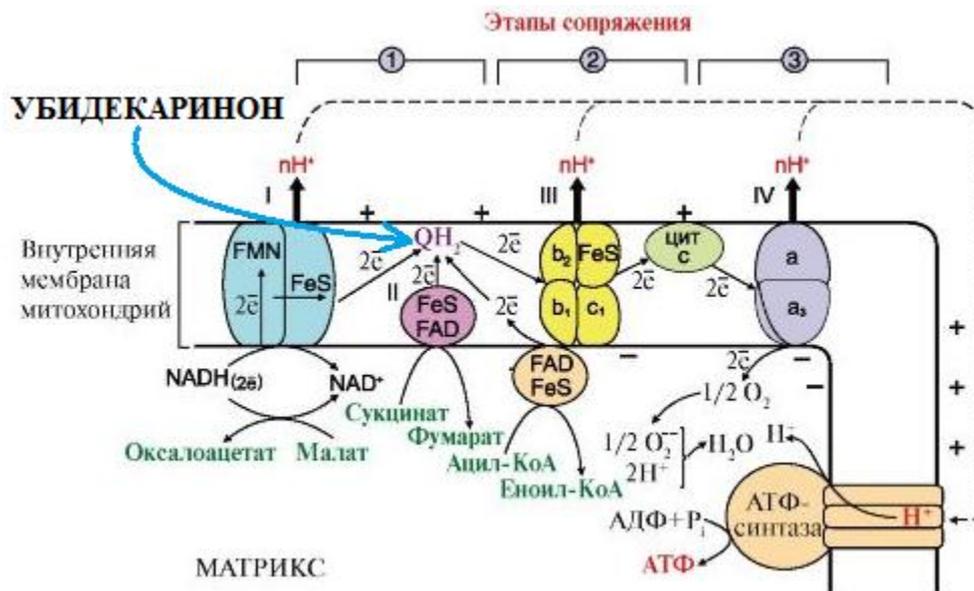


Рисунок 17 – Возможный механизм действия убидекаренона на сопряжение переноса электронов через дыхательный комплекс III (Апчел В.Я., Ионова Л.А., 1994, модифицировано)

В условиях потенцированного клеточного дыхания пируват полностью метаболизируется в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), а не идет на избыточный синтез лактата.

Тестируемый экстракт бадана так же проявил 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 нашло отражение в отсутствии лактоацидоза у лабораторных животных, после выполнения работы, а так же статистически значимому уменьшению концентрации глюкозы по отношению к группе Контроль 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 тестируемого образца 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.

### 3.3. ВЛИЯНИЕ УБИДЕКАРЕНОНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕОНАТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА

С целью формирования неонатального СТЗ индуцированного диабета животным всех групп (кроме интактной) однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотозин (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг на 3-5 сутки жизни. В данном возрасте у животных еще не полностью сформирована система транспортных белков (ГЛЮТ), поэтому введение СТЗ не вызывает нарушение передачи сигнала от инсулинового рецептора к транспортным белкам.

#### 3.3.1 Оценка влияния убидекаренона на массу тела животных

Вес животных оценивали в четырех точках эксперимента: до начала введения препаратов, еженедельно в течение трех недель введения препаратов. Результаты представлены в таблицах 18 и 19.

В группе контрольных крыс-самцов наблюдали статистически значимое увеличение веса в среднем на 17% по отношению к интактным животным (таблица 18). Это закономерно, поскольку течение СД 2 часто сопровождается развитием абдоминального ожирения и увеличением массы тела, что в свою очередь усугубляет инсулинорезистентность, которая способствует переключению углеводного обмена на липидный и сопровождается увеличением объема адипоцитов (Дедов И.И., 2004).

Таблица 18

Изменение массы крыс-самцов в динамике, г,  $M \pm m$ , n=6

Группа	Возраст животных, недели			
	4	5	6	7
Интактные	69±4	95±4	131±3	210±8
Контроль	99±4●	147±5●	206±7●	247±9●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	87±5●	127±3●*	178±5●*	227±9
Убидекаренон 7,4 мг/кг	90±6●	114±5●*	171±9●*	230±7
Убидекаренон 5,2 мг/кг	93±4●	117±5●*	165±6●*	221±5*
Убидекаренон 2,6 мг/кг	93±6●	121±5●*	175±6●*	223±6

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента).

Исследуемый препарат во всех изучаемых дозах, а также препарат сравнения препятствовали резкому приросту массы тела животных. Приведенные в таблице 18 данные свидетельствуют о том, что исследуемый препарат убидекаренон в дозе 5,2 мг/кг после трех недельного курсового введения статистически значимо снижал массу животных на 11% по отношению к группе Контроль.

Таблица 19

Изменение массы крыс-самок в динамике, г,  $M \pm m$ , n=6

Группа	Возраст животных, недели			
	4	5	6	7
Интактные	67±3	94±3	159±3	172±4
Контроль	77±6	109±6●	146±7	194±8●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	79±6	111±7●	142±8	179±7

Группа	Возраст животных, недели			
	4	5	6	7
Убидекаренон 7,4 мг/кг	80±7	113±7●	145±6	177±4
Убидекаренон 5,2 мг/кг	76±5	110±5●	145±5●	174±4
Убидекаренон 2,6 мг/кг	73±7	101±9	134±9●	165±11*

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

Как видно из данных таблицы 19 в группе контрольных крыс-самок к концу эксперимента наблюдали увеличение массы тела на 12% по отношению к интактным животным. Исследуемый препарат во всех изучаемых дозах, а также препарат сравнения препятствовали приросту массы тела. Препарат убидекаренон в дозе 2,6 мг/кг к 7 неделе снижал массу тела крыс-самок на 15% по отношению к группе контрольных животных.

### 3.3.2. Оценка влияния убидекаренона на содержание глюкозы и инсулина в периферической крови

При СД происходит снижение чувствительности рецепторов периферических тканей к инсулину на пострецепторном уровне. Известно, что рецептор инсулина состоит из двух субъединиц –  $\alpha$  и  $\beta$ . Инсулин занимает  $\alpha$  субъединицу рецептора и сигнал от него идет к  $\beta$ -субъединице, которая передает сигнал тирозинкиназе в цитоплазме клетки. При наличии дефекта передачи сигнала происходит уменьшение проницаемости клеточных мембран по отношению к глюкозе, уменьшается активность белков транспортеров глюкозы, в частности, ГЛЮТ-2 и ГЛЮТ-4, в результате развивается инсулинорезистентность, и в ответ на нее – гиперинсулинемия.

Считается, что в основе развития экспериментального СД, вызванного введением стрептозотоцина, лежит повреждение плазматической мембраны  $\beta$ -клеток, это приводит к нарушению транспортной функции мембран. Поскольку стрептозотоцин в своей химической структуре содержит остаток глюкозы он связывается с рецептором глюкозы на мембране, при этом он блокирует глюкозостимулируемый выброс инсулина. Данные изменения приводят к снижению чувствительности  $\beta$ -клеток к глюкозе, далее происходит запаздывание ранней фазы секреции инсулина, усиливается глюконеогенез в печени и развивается гипергликемия (Благосклонная Я. В., Шляхто Е.В., 2004)

Для моделирования экспериментального диабета животным всех групп (кроме интактной) однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотоцин (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг на 3-5 сутки жизни. Контроль развития патологии выполняли в 1-ый день 5-ой недели. В эксперимент включали животных с концентрацией глюкозы в крови более 6,5 ммоль/л. 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, холестерина в плазме крови проводили на 7-ой неделе. На 61-ый день проводили эвтаназию животных в CO<sub>2</sub>-камере с дальнейшим обескровливанием из полостей сердца и осуществляли забор поджелудочной железы для дальнейшего гистологического исследования.

Динамика изменения глюкозы и инсулина описаны в таблицах 20, 21, 22, и 23.

Динамика изменения уровня глюкозы в цельной крови крыс-самцов,  
ммоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=6$

Группа	Возраст животных, недели			
	4	5	6	7
Интактные	4,8±0,2	4,7±0,2	4,5±0,2	4,6±0,2
Контроль	12,8±1,1●	15,3±1,2●	14,7±1,3●	13,2±0,9●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	12,5±1,7●	10,0±1,3●*	7,1±0,6●*	6,1±0,3●*
Убидекаренон 7,4 мг/кг	11,4±1,1●	10,3±1,0●*	8,6±0,6●*	7,2±0,3●*
Убидекаренон 5,2 мг/кг	11,6±1,3●	9,6±1,0●*	7,8±0,6●*	6,6±0,2●*
Убидекаренон 2,6 мг/кг	10,8±0,7●	10,3±0,8●*	9,1±0,4●*	8,1±0,5●*

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

В группе контрольных крыс-самцов, с 4-ой недели жизни наблюдали развитие устойчивой гипергликемии, которая сохранялась на протяжении всего эксперимента.

Такие же изменения были описаны группой ученых биомедицинского университета Сан Пауло. В ответ на введение стрептозотоцина в дозе 60 мг/кг неонатальным животным, наблюдали увеличение концентрации глюкозы в среднем до 11,6 ммоль/л (Hasegawa G, Mori H, 1989)

В группе крыс-самцов, получавших препарат сравнения Янувия в дозе 10,7 мг/кг, с 5-ой по 7-ую неделю наблюдали статистически значимое уменьшение содержания глюкозы в крови по отношению к группе Контроль. К 7-ой неделе эксперимента уровень глюкозы снижался на 54%. Применение препарата убидекаренон в дозах 7,4 мг/кг, 5,2 мг/кг и 2,6 мг/кг после первой недели введения также приводило к статистически значимому уменьшению

содержания глюкозы в крови по отношению к контрольным животным. Следует отметить, что в группе животных получавших убидекаренон в дозе 5,2 мг/кг гипогликемический эффект сопоставим с препаратом сравнения Янувия<sup>©</sup>. Через три недели курсового введения убидекаренон в дозе 5,2 мг/кг уровень глюкозы в периферической крови был на 50% ниже, чем у крыс-самцов контрольной группы.

Таблица 21

Динамика изменения уровня глюкозы в цельной крови крыс-самок, ммоль/л,  $M \pm m$ , n=6

Группа	Возраст животных, недели			
	4	5	6	7
Интактные	4,5±0,2	4,8±0,2	4,9±0,1	4,7±0,2
Контроль	9,4±0,7●	10,7±0,9●	12,1±1,1●	11,4±0,8●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	10,1±0,9●	8,4±1,1●	6,7±0,4●*	5,9±0,3●*
Убидекаренон 7,4 мг/кг	9,4±0,6●	8,9±0,7●	7,8±0,6●*	6,8±0,3●*
Убидекаренон 5,2 мг/кг	10,7±0,9●	9,6±0,8●	7,4±0,3●*	6,7±0,3●*
Убидекаренон 2,6 мг/кг	9,4±0,7●	8,9±0,6●	8,8±0,3●*	8,1±0,4●*

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента).

В группе контрольных крыс-самок с 4-ой недели жизни наблюдали развитие устойчивой гипергликемии, которая сохранялась на протяжении всего эксперимента. В группе крыс-самок, получавших препарат сравнения – Янувия, с 5-ой по 7-ую недели наблюдали статистически значимое уменьшение содержания глюкозы в крови по отношению к группе Контроль. Применение препарата убидекаренон в дозах 7,4мг/кг, 5,2 мг/кг и 2,6 мг/кг также приводило к статистически значимому уменьшению уровня глюкозы в крови в сравнении с контрольными животными. Представленные в таблице 5

данные свидетельствуют о том, что препарат убидекаренон в дозах 7,4 мг/кг и 5,2 мг/кг оказался наиболее эффективным. Через три недели систематического введения снижение уровня глюкозы в обоих случаях составило 40%. Измерение инсулина проводили двукратно: на 4-ой неделе для рандомизации животных в группы и на 7-ой неделе для оценки эффективности препаратов.

Как известно у крыс диапазон физиологической нормы концентрации инсулина в периферической крови лежит в пределах 0,2-1,5 нг/мл (Morgan C. R., Lazarow A., 1963). Поэтому в исследование были включены только те животные, которые имели концентрацию глюкозы в крови более 6,5 ммоль/л и концентрацию инсулина не менее 0,2 нг/мл.

Таблица 22

Динамика изменения инсулина в сыворотке крови, крыс-самцов, нг/мл,  $M \pm m$ ,  $n=6$

Группа	Возраст животных, недели	
	4	7
Интактные	0,68±0,14	0,70±0,11
Контроль	0,72±0,15	2,36±0,32•
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	0,67±0,07	0,73±0,04
Убидекаренон 7,4 мг/кг	0,58±0,12	0,73±0,14
Убидекаренон 5,2 мг/кг	0,88±0,19	0,75±0,10
Убидекаренон 2,6 мг/кг	0,60±0,09	0,57±0,06

Примечание • - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

На 4-ой неделе жизни у крыс-самцов во всех экспериментальных группах значения инсулина находились в пределах нормы. На седьмой неделе в группе – Контроль значение инсулина превысило норму. Во всех

остальных группах содержание инсулина в крови соответствовало физиологической норме, что характеризует сохранность инсулярного аппарата, а, следовательно, имеющаяся у животных гипергликемия связана либо с нарушением внутриклеточной передачи сигнала (что может быть связано с нарушением работы ГЛЮТ), либо с повреждениями рецепторного аппарата.

Таблица 23

Динамика изменения инсулина в сыворотке крови, крыс-самок, нг/мл,  $M \pm m$ ,  $n=6$

Группа	Возраст животных, недели	
	4	7
Интактные	0,75±0,13	0,76±0,09
Контроль	0,62±0,07	1,97±0,20●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	0,76±0,20	0,67±0,08
Убидекаренон 7,4 мг/кг	0,70±0,14	0,70±0,10
Убидекаренон 5,2 мг/кг	0,65±0,15	0,63±0,09
Убидекаренон 2,6 мг/кг	0,73±0,18	0,65±0,09

Примечание ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

На 4-ой неделе жизни у крыс-самок во всех экспериментальных группах значения инсулина находились в пределах нормы. На 7-ой неделе в группе – Контроль значение инсулина превысило норму. Во всех остальных группах содержание инсулина в крови соответствовало норме.

Таким образом, статистически значимое увеличение концентрации инсулина в крови животных контрольной группы (как самок, так и самцов) к окончанию эксперимента (7 неделя) дополнительно свидетельствует о том, что в ходе эксперимента была индуцирована экспериментальная патология

которая схожа с СД 2 в клинике. А так же о том, что гиперпродукция гормона (инсулина) связана с крайне высоким уровнем глюкозы в крови животных контрольной группы (как самок, так и самцов) к концу эксперимента.

### 3.3.3 Оценка влияния убидекаркнона на липидный спектр

Течение СД 2 сопровождается появлением признаков метаболического синдрома, что нашло отражение в нарушении липидного обмена (дислипидемии).

Данные по липидному спектру приведены в таблицах 24 и 25.

Таблица 24

Значения показателей липидного спектра в сыворотке крови крыс-самцов, ммоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=6$

Группа	Общий холестерин	HDL - Холестерин	Триглицериды	LDL - Холестерин
Интактные	0,89±0,15	0,28±0,05	0,77±0,08	0,27±0,15
Контроль	3,68±0,35●	0,28±0,09	1,32±0,09●	2,8±0,37●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	0,96±0,15	0,22±0,05	0,47±0,08●	0,53±0,15
Убидекаренон 7,4 мг/кг	0,97±0,06●	0,22±0,05	1,40±0,10●	1,12±0,07●
Убидекаренон 5,2 мг/кг	2,01±0,22●	0,28±0,08	1,28±0,25	1,15±0,14●
Убидекаренон 2,6 мг/кг	3,01±0,25●	0,24±0,05	1,85±0,14●	1,93±0,26●

Примечание ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

У крыс-самцов в группе Контроль концентрация в крови холестерина и триглицеридов была повышена относительно показателей нормы на 84% и 47%, соответственно.

Схожие изменения липидного профиля на фоне развития экспериментального неонатального стрептозотоцин-индуцированного

диабета были описаны в работе Yuri K. S. и соавторов. В исследовании описано изменение липидного профиля у лабораторных животных на фоне введения стрептозотоцина, в ходе исследования авторы наблюдали увеличение концентрации триглицеридов и холестерина до  $1,2 \pm 0,2$  и  $4,6 \pm 0,7$  ммоль/л (Yuri K. S. et al., 2014).

Также в группе контрольных животных LDL-Холестерин был увеличен на 12% по отношению к верхнему пределу нормы. В группе крыс-самцов, получавших препарат сравнения Янувия<sup>®</sup>, все показатели липидного спектра находились в допустимых пределах, что отражает положительное влияние препарата на липидный обмен. Препарат убидекаренон 7,4 мг/кг нормализовал значения общего холестерина в крови, однако на концентрацию триглицеридов влияния не выявлено. Препарат убидекаренон в дозах 5,2 мг/кг и 2,6 мг/кг проявил схожий эффект в отношении показателей липидного спектра. Следует отметить, что в сравнении с контрольными животными обе дозы уменьшали уровень LDL – холестерина на 59% и 31%, соответственно, данные изменения были статистически значимы.

Как известно в клинике сахарный диабет второго типа проявляется различными видами дислипидемий, что находит свое отражение в повышении концентраций тех или иных маркеров (холестерина, триглицеридов, LDL-липопротеидов и т.д.) (Cowie C.C., Harris M.I., 1995; Syväne M, Taskinen M.R., 1997). Следует отметить, что со временем дислипидемия может явиться звеном развития ишемии и/или атеросклероза у пациента с диабетом. В связи с чем, нормализация показателей липидного профиля играет важную роль в терапии диабета в клинике.

Таблица 25

Значения показателей липидного спектра в сыворотке крови, крыс-самок,  
ммоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=6$

Группа	Общий холестерин	HDL - холестерин	Триглицериды	LDL - холестерин
Интактные	0,76±0,08	0,29±0,05	0,71±0,07	0,15±0,04
Контроль	3,77±0,29●	0,09±0,04●	1,52±0,22●	2,98±0,23●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	0,95±0,14	0,33±0,08	0,55±0,11	0,37±0,12
Убидекаренон 7,4 мг/кг	2,14±0,22●	0,20±0,09	1,45±0,12●	1,28±0,14●
Убидекаренон 5,2 мг/кг	2,52±0,16●	0,32±0,08	2,00±0,39●	1,28±0,16●
Убидекаренон 2,6 мг/кг	2,70±0,34●	0,23±0,08	1,92±0,12●	1,60±0,25●

Примечание ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

У крыс-самок в группе Контроль концентрация в крови холестерина и триглицеридов была повышена относительно показателей нормы на 88% и 52%, соответственно. Также в группе контрольных животных LDL-Холестерин был увеличен на 20% по отношению к наибольшему значению физиологической нормы. В группе крыс-самок, получавших препарат сравнения Янувия<sup>©</sup> в дозе 10,7 мг/кг, все показатели липидного спектра находились в допустимых пределах, что отражает положительное влияние препарата на липидный обмен. Исследуемый препарат убидекаренон во всех исследуемых дозах нормализовал уровень LDL-холестерина. Следует отметить и наличие позитивных тенденций в отношении нормализации показателей общего холестерина и триглицеридов. Исследуемый препарат Убидекаренон в дозе 7,4 мг/кг снижал уровень триглицеридов на 5% по

отношению к контрольным животным, однако уровня допустимых значений достигнуто не было.

### 3.3.4. Морфометрическое исследование адипоцитов

В группах интактных крыс-самцов и крыс-самок адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки имели округлую форму (рисунок 18), средние значения диаметра адипоцитов приведены в таблице 26.

Для определения среднего диаметра адипоцитов 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.

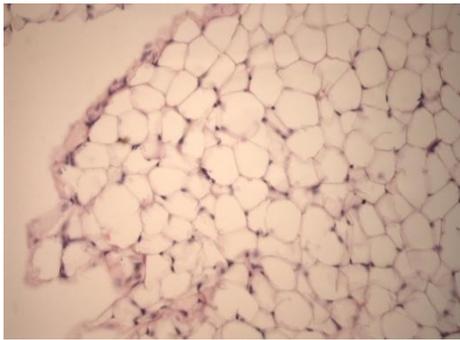


Рис.18. Адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки  
Интактная группа. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

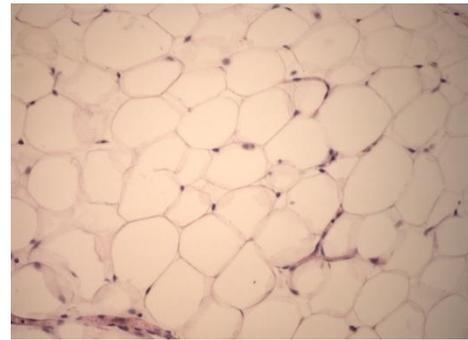


Рис.19. Адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки  
Контрольная группа. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин



Рис.20. Адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки  
Группа убидекаренон 7,4 мг/кг. Объектив 20. Окраска гематоксилин- эозин



Рис.21. Адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки  
Группа убидекаренон 5,2 мг/кг. Объектив 20. Окраска гематоксилин- эозин

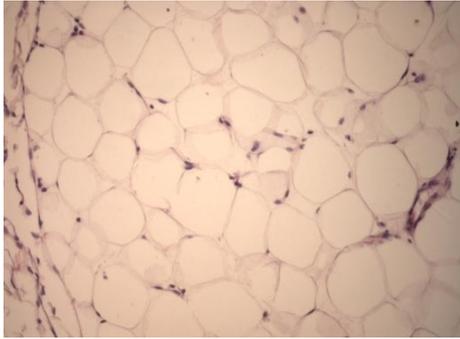


Рис.22. Адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки  
Группа убидекаренон 2,6 мг/кг. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

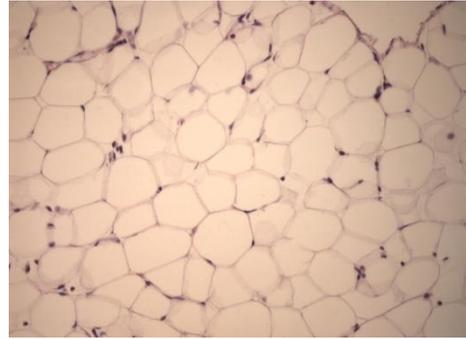


Рис.23. Адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки  
Группа Янувия<sup>©</sup>. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

В группах Контроль (самцов и самок) адипоциты парапанкреатической жировой клетчатки также имели округлую форму (рис. 19), но их диаметр был статистически значимо больше (в 1,4 раза) по отношению к интактным животным. Это закономерно, поскольку течение СД 2 сопровождается глубокими нарушениями углеводного и липидного обменов и находит отражение в развитии абдоминального ожирения.

Жировые клетки здорового человека содержат по 200-300 тысяч рецепторов. При развитии ожирения, вызванного накоплением висцерального жира (накопление липофильных фракций в адипоците) происходит увеличение площади последнего, а значит уменьшение количества рецепторов на единицу площади. Поскольку жировая ткань, является инсулинозависимым органом, в котором инсулин снижает высвобождение свободных жирных кислот (СЖК) и глицерина в системный кровоток, тем самым обеспечивает утилизацию глюкозы по пентозофосфатному пути и липогенез. Активный липолиз в висцеральных адипоцитах приводит к выделению большого количества СЖК, преимущественно в портальную циркуляцию и печень. В печени СЖК препятствуют связыванию инсулина с гепатоцитами, что обуславливает: развитие инсулинорезистентности (на уровне печени), снижение экстракции инсулина печенью и развитие системной гиперинсулинемии (Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х., 2004).

Из данных таблицы 26 видно, что применение исследуемого препарата убидекаренон не привело к статистически значимому снижению диаметра адипоцитов парапанкреатической жировой клетчатки (как у крыс самцов, так и у крыс самок), а значит и уменьшению депонирования липидов в парапанкреатических адипоцитах (рисунки 18-23).

Таблица 26

Диаметр адипоцитов парапанкреатической жировой клетчатки, мкм  $M \pm m$ ,  
n=6

Группа	Диаметр адипоцитов	
	Самцы	Самки
Интактные	50,8±5,8	52,8±7,9
Контроль	70,9±4,7•	75,3±7,5•
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	60,4±3,0	56,0±5,7*
Убидекаренон 7,4 мг/кг	67,2±4,8	60,8±3,9
Убидекаренон 5,2 мг/кг	69,8±6,8	63,1±5,9
Убидекаренон 2,6 мг/кг	68,9±7,3	69,3±6,1

Примечания: • - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента).

Препарат сравнения Янувия<sup>©</sup> в дозе 10,7 мг/кг, в отличие от исследуемого препарата, предупреждал увеличение диаметра адипоцитов (рис. 23), причем эти изменения были наиболее выражены у крыс-самок, различия составили 25% по отношению к животным контрольной группы. У крыс-самцов этот эффект выражался в виде тенденции, различия составили 15% и не являлись статистически значимыми ( $p > 0,05$ ).

Данные, полученные в нашей лаборатории, согласуются с данными исследования Takada J и соавторов в котором, авторы также наблюдали увеличение диаметра адипоцитов на фоне экспериментального

стрептозотоцин-индуцированного диабета (Takada J, Machado M.A. et al. 2007).

### 3.3.5 Морфометрическое исследование островков Лангерганса

Для оценки влияния исследуемых препаратов на состояние эндокринного аппарата поджелудочной железы на модели экспериментального стрептозотоцинового СД 2 была проведена сравнительная гистологическая оценка и морфометрическое измерение диаметра панкреатических островков Лангерганса. Характерные изменения диаметра панкреатических островков Лангерганса приведены на рисунках 24-29.

Как известно, при воздействии стрептозотоцина на эндокриноциты панкреатических островков происходит некроз клеток, воспалительная инфильтрация в этих участках, вследствие чего снижается диаметр островков Лангерганса (Portha B, Blondel O, 1989).

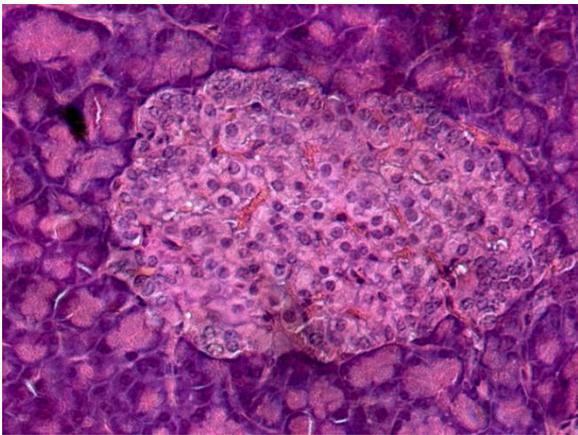


Рисунок 24 – Островки поджелудочной железы  
Интактная группа. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

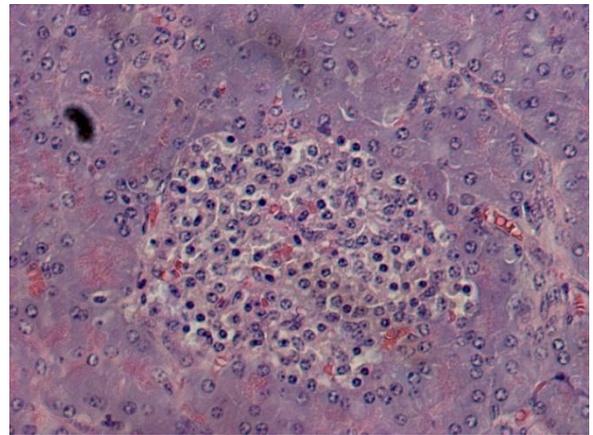


Рисунок 25 – Островки поджелудочной железы  
Контрольная группа. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

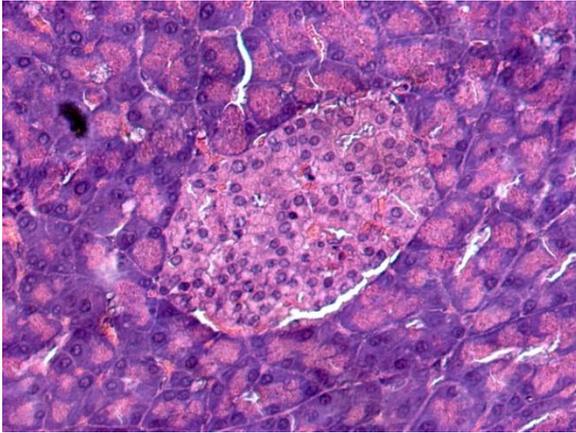


Рисунок 26 – Островки поджелудочной железы

Группа убидекаренон 7,4 мг/кг. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

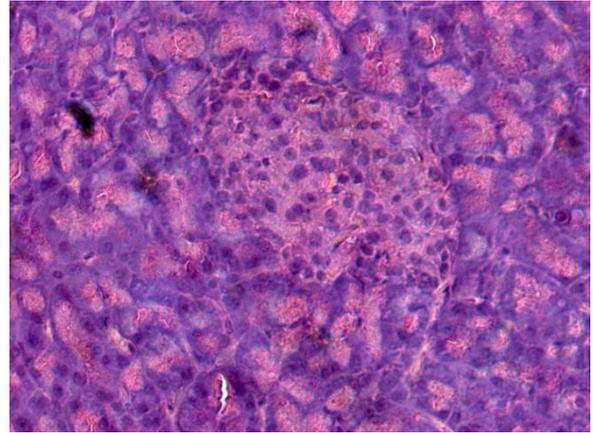


Рисунок 27 – Островки поджелудочной железы

Группа убидекаренон 5,2 мг/кг. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

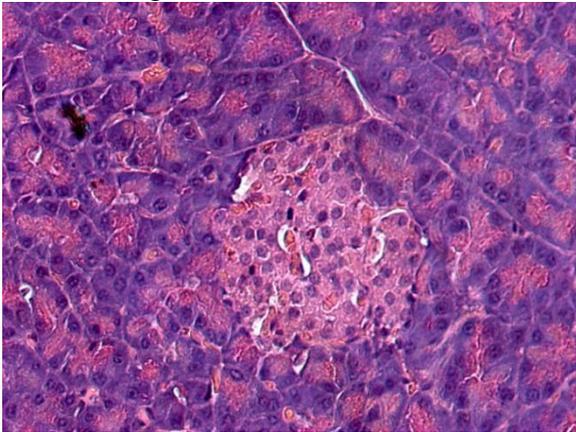


Рисунок 28 – Островки поджелудочной железы

Группа убидекаренон 2,6 мг/кг. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

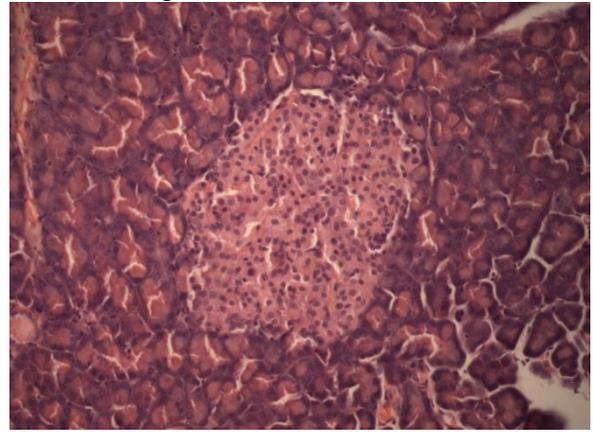


Рисунок 29 – Островки поджелудочной железы

Группа Янувия<sup>©</sup>. Объектив 20. Окраска гематоксилин-эозин

В группе интактных животных (рисунок 24) поджелудочная железа имела дольчатое строение, между дольками наблюдались прослойки соединительной и жировой ткани, дольки представлены экзокринной частью, образованной панкреатоцитами, их клетки формировали ацинусы, открывавшиеся в панкреатические протоки железы. Между ацинусами, преимущественно в хвостовом отделе поджелудочной железы, диффузно располагались крупные панкреатические островки (островки Лангерганса), образованные инсулоцитами, окруженными тонкой сетью фенестрированных капилляров. Диаметр островков приведен в таблице 27.

В группе Контроль, в строме панкреатических островков (рисунок 25) и вокруг них наблюдалась слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация с атрофией функционирующих инсулоцитов: резко уменьшалось количество островков, а диаметр оставшихся островков был снижен по сравнению с интактной группой. Вокруг ткани поджелудочной железы наблюдали реактивную гиперплазию лимфатических узлов.

Таблица 27

Диаметр панкреатических островков поджелудочной железы крыс различных групп, мкм  $M \pm m$ ,  $n=6$

Группа	Диаметр островков Лангерганса	
	Самцы	Самки
Интактные	201,7±35,1	199,0±37,7
Контроль	113,2±18,0●	116,7±20,0●
Янувия <sup>©</sup> 10,7 мг/кг	134,9±19,0●	159,0±11,9●*
Убидекаренон 7,4 мг/кг	126,6±13,5●	133,4±27,0●
Убидекаренон 5,2 мг/кг	121,8±21,1●	128,7±16,3●
Убидекаренон 2,6 мг/кг	118,2±17,4●	116,7±15,6●

Примечания: ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

В группе контрольных крыс-самцов и крыс-самок диаметр островков Лангерганса был статистически значимо ниже, чем у интактных животных, на 56% и 59% соответственно. Схожие данные были получены учеными Волгоградского государственного медицинского университета в ходе сравнительной оценки ультраструктурных изменений инсулоцитов при стрептозотоцин-индуцированном диабете. Так в исследовании Снигур Г.Л. и соавторов на фоне стрептозотоци-индуцированного диабета происходило уменьшение диаметра инсулоцитов примерно на 60% (Сингур Г.Л. и др., 2012).

Это закономерно, поскольку экспериментальный диабет, вызванный введением стрептозотоцина, сопровождается воспалительной реакцией в островковых клетках, что и влечет за собой уменьшение диаметра последних. Данные процессы с одной стороны могут быть связаны с токсическим (деструктивным) действием стрептозотоцина на комплекс Гольджи и элементов эндоплазматической сети. Данный эффект сопровождается уменьшением размеров и численности секреторных гранул (инсулоцитов) и развитием необратимых некротических процессов (Koji Y., et al. 1997; Lenzen S. 2008). Однако возможен и иной механизм гибели инсулоцитов (островков Лангерганса), а именно апоптоз, который сопровождается конденсацией, маргинацией и фрагментацией хроматина ядер, набуханием митохондрий, уплотнением цитоплазмы, что в итоге приводит к формированию апоптотических телец. Данные процессы в итоге проявляются в значительном уменьшении диаметров инсулоцитов и объемной доли островков (Szkudelski T., 2001; Lenzen S., 2008).

При исследовании тканей поджелудочной железы крыс-самцов и крыс-самок, которые получали препарат убидекаренон в исследуемых дозах, было установлено, что препарат оказывал цитопротекторную активность в отношении клеток островкового аппарата поджелудочной железы. О чем свидетельствует отсутствие признаков воспалительного процесса, однако статистически значимых отличий диаметра островков Лангерганса в сравнении с контрольной группой, как крыс-самцов, так и крыс-самок не установлено.

Препарат сравнения Янувия<sup>©</sup>, также снижал выраженность воспаления в околоостровковой зоне панкреатической железы, кроме того в отличие от исследуемого препарата, он стимулировал репарацию клеток островкового аппарата у крыс-самок, что нашло отражение в предупреждении уменьшения диаметра островкового аппарата поджелудочной железы, вызванного введением стрептозотоцина.

Таким образом, однократное введение стрептозотоцина детенышам лабораторных крыс линии Wistar привело к развитию экспериментального диабета. Основными компонентами его явились инсулинорезистентность, связанная с пререцепторными нарушениями или же с нарушениями на уровне внутриклеточного перемещения ГЛЮТ-4, а также нарушения сигнального пути. Гипергликемия, связанная, как с нарушением переноса электронов дыхательной цепи из-за развития окислительного стресса, в результате разобщения переноса электрона через дыхательный комплекс III (рис. 30), глюкоза перестает метаболизировать в клетке, такое нарушение внутриклеточной утилизации глюкозы приводит к уменьшению поступления последней в клетку и накоплению ее в сосудистом русле.

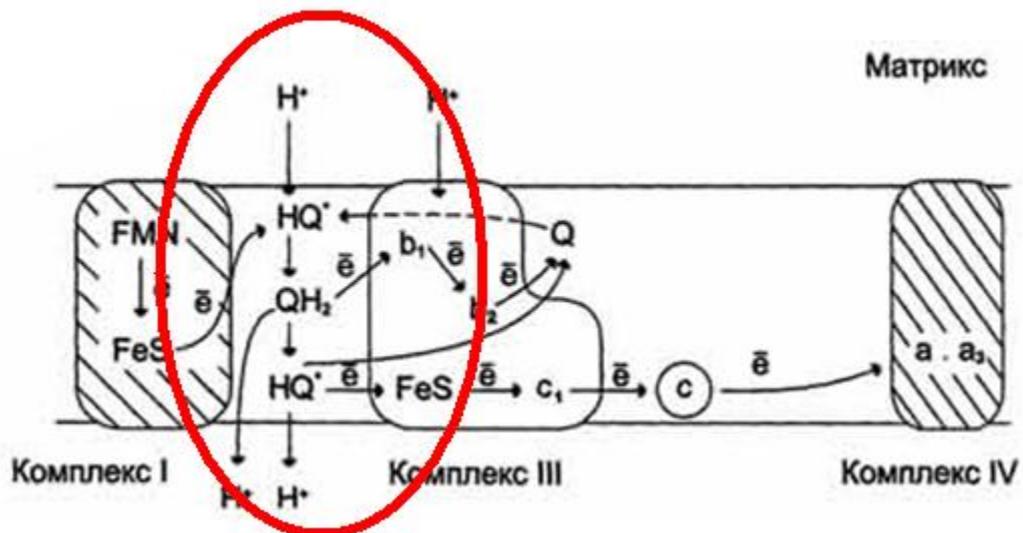


Рисунок 30 – Нарушение митохондриального окисления глюкозы

Следует отметить, что развитие окислительного стресса приводит не только к гипергликемии, данный процесс также лежит в основе воспалительного процесса поджелудочной железы.

Препарат убидекаренон проявил устойчивое сахароснижающее действие и корректировал липидный состав плазмы крови. Через три недели курсового приема препарат нормализовал значения LDL-холестерина, что свидетельствует о снижении риска развития атеросклероза при МС.

Данные эффекты препарата могут быть связаны как 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  $\beta$ -клеток островков Лангерганса, выявлено не было, но препарат убидекаренон сдерживал процесс воспалительной инфильтрации островков Лангерганса, что также связано с антиоксидантными свойствами.

В ходе эксперимента было установлено позитивное влияние препарата убидекаренон на уровень инсулина. Возможно препарат влиял на пререцепторном уровне (препятствовал изменению функции  $\beta$ -клеток в ответ на воздействие стрептозотоцина) или же имел клеточный механизм действия (влиял 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 препарата убидекаренон на гидролиз цАМФ.

Таким образом, в ходе эксперимента была установлена эффективная доза тестируемого объекта Убидекаренон, которая составила 5,2 мг/кг. Препарат Убидекаренон дозе 5,2 мг/кг может быть рекомендован для дальнейших клинических исследований.

Для наглядности оценки фармакологических эффектов исследуемых препаратов была введена система рангов (таблица 28, 29). 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 2. Для показателя диаметр адипоцитов рассчитывалась разница 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 высчитывалась разница диаметра в мкм между интактной и экспериментальной группой, полученное значение делили на коэффициент. Для показателя диаметр островков Лангерганса рассчитывалась разница 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 высчитывалась разница диаметра в мкм между интактной и экспериментальной группой, полученное значение делили на коэффициент.

Таблица 28

Сводная таблица рангов (самки/самцы)

Группа	Масса тела	Глюкоза	Инсулин	ХС	ТГ	Адипоциты	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 <sup>®</sup> 10,7 мг/кг	4/5	2/2	1/1	2/2	1/1	5/1	7,5/4,9
Убидекаренон 7,4 мг/кг	5/4	4/4	1/1	4/3	5/3	8,5/3,5	8,4/8
Убидекаренон 5,2 мг/кг	2/3	3/3	1/1	3/4	3/6	9,5/4,6	9,0/8,6
Убидекаренон 2,6 мг/кг	3/1	5/5	1/1	5/5	6/5	9,5/7,3	9,4/10

Итоговая таблица. Сумма объединенных рангов самцы и самки

Группа	Сумма рангов
Интактные	13
Контроль	88
Янувия <sup>©</sup> 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

Таким образом, в ходе эксперимента была установлена эффективная доза тестируемого объекта убидекаренон, которая составила 5,2 мг/кг. Препарат убидекаренон дозе 5,2 мг/кг может быть рекомендован для дальнейших клинических исследований.

#### 3.4 ВЛИЯНИЕ СПЕЦИАЛЬНОГО ЭКСТРАКТА БАДАНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА, ВЫЗВАННОГО ВЫСОКОКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТОЙ (РАЦИОН «ДИЕТА КАФЕТЕРИЯ»)

Как известно, препараты природного происхождения обычно считаются менее токсичными и менее склонны вызывать побочные эффекты, чем химически синтезированные препараты.

Растения, принадлежащие к роду Бадана (семейство Saxifragaceae) являются родными для Китая, Монголии, Сибири, Алтая и Гималаев. Наиболее широко известны следующие подвиды Бадана, имеющие лекарственное значение *B. ciliata*, *B. ligulata* и *B. crassifolia*. *B. ciliata*, *B. ligulata* широко используются в Индии в качестве лекарства для лечения лихорадки, диареи, а также для заживления ран, лечения почечных и

легочных инфекций (Ballabh B. et al., 2008; Dhalwal K. et al., 2008). Экстракт из листьев и корневищ *B. Cordifolia* обладает ярко выраженным антиоксидантными, анти- $\alpha$ -глюкозидазными и антихолинэстеразными свойствами (Roselli M. et al., 2011).

Фитохимические исследования *B. crassifolia* выявили наличие фенольных соединений (Pozharitskaya, O.N. et al., 2007; Shicov A.N. et al., 2007; Чернецова и др. 2012), флавоноидов, 3-О-моногликозидов и 3-О-дигликозидов из кемпферола и кверцетина (Бом Н.М. и др., 1986), дубильных веществ (Федосеева Л.М., 2003), бергенина (Шиков А.Н. и др., 2007), а также полисахарида бергенана (Головченко В.В. и др., 2007).

Основными летучими компонентами являются 3-метил-2-бутен-1-ол, пальмитиновая кислота, додекановая кислота, линалоол и октадекадиеновая кислота (Zhao J. et al., 2006).

Антимикробная активность экстракта из листьев *B. crassifolia* была продемонстрирована в отношении грамотрицательных бактерий и грамположительных кокков (Федосеева Л.М. и др., 2000). Экстракт *B. crassifolia* оказывал защитный эффект, предотвращая ингибирование сукцинат-оксидазной системы (Хазанов В.А., Смирнова Н.Б., 2000). Кроме того, Бергенан, представляющий собой пектиновый полисахарид из зеленых листьев *B. crassifolia*, обладает иммуностимулирующим действием, что было выявлено в исследованиях на мышцах (Pорov S.V. et al., 2005). Оценка антирадикальной активности показала, что этот эффект может быть вызван в значительной степени присутствием растительных фенолов (Pozharitskaya, O.N. et al., 2007).

В ряде исследований отмечается, что настой из листьев *B. crassifolia* способствует ускорению утилизацию жиров у мышей во время купания и уменьшению массы тела на 15-18%, что наблюдалось в группах животных, получавших ферментированные листья *B. crassifolia* (Shicov A.N. et al., 2010). Тем не менее, отсутствуют как таковые данные, касающиеся

использования и соответственно эффектов *B. crassifolia* в рационах с высоким содержанием жиров.

Таким образом, в исследовании нами использовались зеленые и черные листья *B. Crassifolia*, собранные с плантации МТТ сельскохозяйственного холдинга в Финляндии (Миккели, Финляндия). Собранные образцы были идентифицированы с контрольными образцами, имеющимися в гербарии Санкт-Петербургского фармацевтического института имени И.Е. Репина (Санкт-Петербург, Россия). Зеленые листья были подвергнуты частичной ферментации (Shicov A.N. et al., 2010). Для этого свежие листья выдерживали в течение 12-24 ч для частичного удаления влаги. Затем листья измельчали и оставляли при комнатной температуре для ферментации. После завершения изменения окраски биомассу листьев быстро высушивали при высокой температуре. Далее листья измельчали с использованием мельницы-эксцельсиора OPA Peltiteos Oy (Helsinki, Finland) и хранили в закрытых сосудах для дальнейшего использования.

Измельченные листья (100 г) растворяли в воде (800 мл) и кипятили с обратным холодильником в течение 1,5 ч. Полученные водные экстракты фильтровали, концентрировали в вакууме (40 °С), лиофилизировали и хранили в закрытых сосудах при комнатной температуре до тех пор, пока они не потребовались для экспериментальной работы.

Общее содержание фенольных экстрактов оценивалось как эквиваленты галловой кислоты, выраженное в мг галловой кислоты/г (сухого веса) экстракта, в соответствии с методом Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999).

Результаты измерения массы тела животных на фоне применения диеты кафетерия и исследуемых веществ в динамике представлены в таблице 26. Все данные распределены нормально. Сравнение между группами проводилось с помощью критерия Стьюдента для зависимых переменных между днем начала «диеты кафетерия».

Таблица 30

Динамика массы тела животных на фоне «диеты кафетерия» и применения исследуемых препаратов, г,  $M \pm m$ ,  $n=15$

День исследования	Интактная	Контроль	Экстракт бадана 50 мг/кг	Сибутрамина гидрохлорид 1,5 мг/кг
1	275,5±5,1	269,3±2,0	266,3±5,2●	303,1±4,8●
15	268,1±6,4	291,9±3,1	285,6±1,8●	315,6±3,7●
23	287,4±2,8	316,1±11,3	300,1±8,2●	327,6±4,2●

Примечание ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

Как видно из представленных в таблице данных, переход животных на диету кафетерия сопровождался первоначально снижением веса на 2,5-7% по сравнению с последними днями стандартной диеты.

Спустя 14 дней пребывания животных на «диете кафетерия» наблюдалась отчетливая тенденция к увеличению веса на 2,5-10,5% во всех группах. К 23 дню исследования в контрольной группе животных продолжало наблюдаться увеличение массы животных.

При применении экстракта бадана наблюдалось снижение веса к 23 дню (по сравнению с 14 днем) на 4,1%, и, в группе, получавшей сибутрамина гидрохлорид отмечалось снижение массы тела животных на 6,4%. На фоне потребления рациона «диеты кафетерия» наблюдали увеличение потребления пищи. Полученные данные представлены в таблице 31.

Таблица 31

Динамика потребления пищи на фоне «диеты кафетерия» и применения исследуемых препаратов, г,  $M \pm m$ ,  $n=15$

День исследования	Интактная	Контроль	Экстракт бадана 50 мг/кг	Сибутрамина гидрохлорид 1,5 мг/кг
1	22,6±0,2	13,0±1,8	20,9±1,2●	18,5±1,5●
15	24,8±1,1	26,5±1,9	17,5±0,7●	16,9±0,9●
23	31,6±1,1	27,8±1,9	16,2±0,5●	16,7±0,3●

Примечание ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

Как видно из представленных данных, на фоне применения рациона «диеты кафетерия» отмечали статистически значимое увеличение потребления пищи. Потребление пищи животными, получавшими экстракт бадана, было на 42% ниже на 23 день по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ), а потребление пищи животными, получавшими сибутрамин – на 40% ниже на 23 день по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). Таким образом, применение препаратов приводило к снижению аппетита у животных (снижение потребления пищи), приблизительно одинаково, начиная с 1-го по последний день применения исследуемых препаратов.

Следующим этапом исследования было изучение влияния препаратов на аппетит лабораторных животных после голодания. Время голодания составило 18-ть часов, после чего животным был возвращен корм. Массу потребленного корма регистрировали через 30, 90 минут, 3 и 6 часов. Данные потребления пищи после голодовки представлены в таблице 32.

Таблица 32

Динамика потребления пищи на фоне «диеты кафетерия», после 18-ти часового голодания и применения исследуемых препаратов, г,  $M \pm m$ ,  $n=15$

Группы	30 минут	90 минут	3 часа	6 часов
Интактные	2,6±0,1	2,3±0,2	2,1±0,0	3,0±0,3
Контроль	4,8±0,9	3,5±0,3●	3,1±0,5●	2,5±0,5●
Экстракт бадана 50 мг/кг	5,1±1,1●	3,9±0,1●	2,9±0,4●	2,1±0,2●
Сибутрамина гидрохлорид 1,5 мг/кг	5,0±0,8●	2,6±0,4●	2,7±0,3●	2,3±0,6●

Примечание ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

В ходе эксперимента между интактной и контрольной группами животных была установлена существенная разница в потреблении корма. Контрольные животные через полчаса после возвращения корма в кормовое углубление клетки потребляли корма на 85% больше, чем интактные животные. Через 90 минут разрыв между контрольной и интактной группами

сократился до 52%, через 3 часа до 48%, через 6 часов обе группы потребляли уже практически одинаковое количество пищи.

На фоне применения экстракта бадана через 30 минут наблюдалась тенденция к увеличению аппетита по сравнению с контрольной группой и выраженное увеличение по сравнению с интактной группой. Через 90 минут потребление пищи в этой группе оставалось повышенным, через 3 часа наблюдалась тенденция к снижению этого показателя, а через 6 часов аппетит у животных был ниже, чем у интактной группы.

Таким образом, можно предположить, что сухой экстракт бадана обладает способностью снижать аппетит, однако его эффект наступает через 3-6 часов после введения и связан с метаболитами биологически активных веществ, содержащихся в экстракте. Наиболее выраженный эффект от применения экстракта бадана наблюдался спустя 90 минут – 3 часа после введения препарата, и, вероятно, обусловлен действием, веществ, входящих в состав экстракта.

На фоне введения сибутрамина гидрохлорида эффект был схож с фармакологической активностью экстракта бадана, также через 30 минут, наблюдалась тенденция к увеличению аппетита по сравнению с контрольной группой и выраженное увеличение по сравнению с интактной группой (почти в 2 раза). Через 90 минут, потребление пищи в этой группе, снижалось до уровня интактных животных, и оставалось на этом уровне до конца исследования (через 3 и 6 часов). Сибутрамина гидрохлорид вероятно проявляет свое действие за счет первичных и вторичных метаболитов, что объясняет отсроченность эффектов.

Также в ходе эксперимента регистрировали потребление воды у экспериментальных животных. Полученные данные представлены в таблице 33.

Таблица 33

Динамика потребления воды на фоне «диеты кафетерия» и применения исследуемых препаратов, мл,  $M \pm m$ , (n=15)

День исследования	Интактная	Контроль	Специальный экстракт бадана 50 мг/кг	Сибутрамина гидрохлогид 1,5 мг/кг
1	55,6±3,7	34,4±1,5●	32,2±1,5●	24,5±2,0●
15	32,8±4,9	15,6±2,4●	22,0±1,3●	13,3±1,7●
23	34,5±0,7	34,0±2,4	14,0±0,6●*	13,3±0,1●*

Примечания ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ , t – критерий Стьюдента).

Как видно из представленных данных, потребление воды в интактной группе было выше, чем в остальных исследуемых группах. Вероятно, этот факт связан с тем, что стандартный корм для крыс представляет собой сухие гранулы, а в составе «диеты кафетерия» большая часть продуктов содержала в себе увлажненные продукты.

На 23 день эксперимента был проведен ГТТ с целью выявления нарушений углеводного обмена. Следует отметить, что перед проведением теста у лабораторных животных всех групп не было статистически значимых различий концентрации глюкозы в периферической крови. Между 15 и 23 днем применения рациона «диета кафетерия» контрольные животные имели статистически значимо большую концентрацию глюкозы спустя 60 и 120 мин после углеводной нагрузки. На фоне применения экстракта бадана (таблица 34) наблюдали нормализацию утилизации глюкозы, что нашло свое отражение в статистически значимом уменьшении концентрации глюкозы спустя 60 и 120 мин после углеводной нагрузки (15 день).

Концентрация глюкозы при проведении глюкозотолерантного теста,  
ммоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=15$

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 ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

У интактных животных уровень глюкозы изменялся в пределах физиологической нормы.

У контрольных животных в первые девять дней пребывания на «диете кафетерия», сахарная кривая практически не отличалась от уровня интактных животных. К 15 дню пребывания на «диете кафетерия» у животных было отмечено повышение уровня глюкозы в плазме крови через 1 и 2 часа после сахарной нагрузки, подобные изменения (хотя уровень глюкозы не превышал почечного порога) характеризуют нарушенную толерантность к глюкозе, и являются фактором риска для развития сахарного диабета 2 типа. К концу исследования (23 и 24 день пребывания животных на «диете кафетерия») у животных контрольной группы наблюдалась устойчивое нарушение толерантности к глюкозе с повышением уровня глюкозы через 2 часа после сахарной нагрузки выше почечного порога.

В группе животных, которые на фоне «диеты кафетерия» получали экстракт бадана в первые пятнадцать дней пребывания на «диете кафетерия», сахарная кривая практически не отличалась от уровня интактных животных. К 15 дню пребывания на «диете кафетерия» у животных было отмечено незначительное повышение уровня глюкозы в плазме крови через 2 часа после сахарной нагрузки. К концу исследования (23 и 24 день пребывания

животных на «диете кафетерия») у животных этих групп наблюдалось некоторое повышение уровня глюкозы через 2 часа после сахарной нагрузки, однако почечный порог превышен не был.

Схожая ситуация наблюдалась в группе животных, получавших сибутрамина гидрохлорид, в первые пятнадцать дней пребывания на «диете кафетерия», сахарная кривая практически не отличалась от уровня интактных животных. К концу исследования (23 и 24 день пребывания животных на «диете кафетерия») у животных этой группы наблюдалось устойчивое нарушение толерантности к глюкозе с повышением уровня глюкозы через 2 часа после сахарной нагрузки выше почечного порога. Как известно, арбутин, являющийся компонентом экстракта бадана, оказывает определенное влияние на уровни триглицеридов и холестерина в сыворотке крови животных. Как показали наши исследования, уровень триглицеридов у животных на фоне применения «диеты кафетерия» увеличивался в 4,5 раза и превышал физиологический уровень. Концентрация холестерина в крови контрольных животных также увеличивался (в 1,5 раза).

На фоне применения тестируемых объектов статистически значимое уменьшение концентрации триглицеридов наблюдали только в группе животных, получавших экстракт бадана (таблица 35).

Таблица 35

Состояние липидного обмена у животных 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*

Примечания ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль ( $p < 0,05$ ,  $t$  – критерий Стьюдента).

Применение сибутрамина гидрохлорида не привело к выраженной нормализации концентрации холестерина в плазме крови.

Интегральным отражением функционально-метаболических изменений, возникающих на фоне рациона «диеты кафетерия» и применения тестируемых объектов, является поведение животных в тесте «открытое поле». Ориентировочно-исследовательская активность и эмоциональный статус лабораторных животных в ходе эксперимента изучались однократно. При тестировании в «открытом поле» животные интактной группы демонстрировали преимущественно уравновешенный тип поведения, что нашло свое отражение в умеренной локомоторной и поисковой активности без проявления признаков тревожности. Полученные данные приведены в таблице 36.

Таблица 36

Результаты поведенческих реакций животных в тесте «открытое поле»,  
M±m, n=15

Группы	Кол-во центральных посещений	Число посещенных квадратов	Кол-во пристеночных стоек	Кол-во свободных стоек	Грумминг
Интактная	3,0±0,8	40,4±3,2	19,6±1,0	5,6±1,0	7,7±0,8
Контроль	0,8±0,3●	30,4±7,0	10,1±2,2●	2,3±1,0●	2,3±0,7●
Экстракт бадана 50 мг/кг	1,0±0,4●	27,6±7,2	9,4±2,4●	0,9±0,4●*	2,2±0,5●
Сибутрамина гидрохлорид 1,5 мг/кг	0,7±0,3●	23,6±5,9●	9,4±2,2●	1,3±0,4●*	1,3±0,6●

Примечания ● - различия статистически значимы по сравнению с интактной группой (p<0,05, t – критерий Стьюдента);

\* - различия статистически значимы по сравнению с группой контроль (p<0,05, t – критерий Стьюдента).

Из данных таблицы видно, что в тесте «открытое поле» у животных, как контрольной группы, так и на фоне применения тестируемых препаратов отмечалось снижение горизонтальной активности, что нашло отражение в статистически значимом снижении количества пересеченных квадратов по отношению к интактным животным. Вертикальная активность, также была

снижена, что нашло отражение в статистически значимом уменьшении свободных и пристеночных стоек, по отношению к интактным животным.

Следует отметить, что в контрольной группе проявлялась психомоторная заторможенность, которая нашла отражение в уменьшении количества паттернов движений. Кроме того, наблюдалось снижение груминга, что также является отражением неблагоприятного влияния «диеты кафетерия» на ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус, связанную с развитием ожирения. Данный феномен - развитие депрессии на фоне ожирения достаточно изучен и освещен рядом авторов (Fabricatore A.N, Wadden T.A., 2006).

Наиболее выраженные изменения ориентировочно-двигательной и эмоциональной активности наблюдались на фоне применения сибутрамина гидрохлорида (по числу посещенных квадратов, пристеночных стоек и груминга). Для сибутрамина гидрохлорида эти изменения характеризуют побочное – депрессивное действие препарата, рассмотренное в работах Patten S.B. (2002), Elfhag K, Rössner S, Barkeling B, Rooth P. (2005), Gadde K.M., Allison D.B. (2006).

Таким образом, ожирение, являясь нарушением энергетического дисбаланса, развивается в тех случаях, когда потребление энергии превалирует над ее расходом, что является серьезной медицинской проблемой, т.к. вызывает множество проблем со здоровьем. Повышенное потребление калорийной пищи резко увеличивает риск серьезных проблем со здоровьем, включая сердечно-сосудистые заболевания, гипертонии, диабет и нарушение обмена веществ. Проведенное исследование показало, что «диета кафетерия» является перспективной моделью исследования влияния биологически-активных веществ на аппетит экспериментальных животных. Пребывание животных на «диете кафетерия» в течение 15 дней привело к увеличению массы животных на 2,5-10,5%. Вместе с тем, отмечалось увеличение потребления пищи в 1,2-1,4 раза, которое носило устойчивый

характер. На фоне перорального введения экстракта бадана и сибутрамина тенденции снижения веса тела по сравнению с контрольной группой составили 12% и 2%, соответственно.

При использовании как сухого экстракта бадана, так и сибутрамина снижение потребления пищи за 24 дня составило 38%.

При исследовании концентрации глюкозы в крови экспериментальных животных уже к 15 дню применения рациона «диета кафетерия» у животных было отмечено повышение уровня глюкозы в плазме крови через 1 и 2 часа после сахарной нагрузки. Через 24 дня применения рациона «диета кафетерия» у животных наблюдалось устойчивое нарушение толерантности к глюкозе с повышением уровня глюкозы через 2 часа после сахарной нагрузки выше почечного порога, что связано с нарушением толерантности к глюкозе, и является фактором риска для развития сахарного диабета 2 типа.

По сравнению с контрольной группой, экстракт бадана показал заметное снижение уровня глюкозы в сыворотке крови через 60 мин на 41% и через 90 минут – на 16%, соответственно.

В свою очередь применение сибутрамина вызывало снижение уровня глюкозы через 60 мин на 30%. Через 90 минут эффекта как такового не наблюдалось.

Изменения в углеводном обмене у экспериментальных животных, сопровождались изменениями в липидном обмене. Уровень триглицеридов у животных на фоне применения «диеты кафетерия» увеличивался в 4,5 раза и превышал физиологический уровень, концентрация холестерина при этом также увеличивалась (в 1,5 раза), но пограничный уровень (как фактор риска) достигнут не был. Эти изменения характерны для начальных стадий развития сахарного диабета 2 типа, и модель в целом может служить не только для оценки аппетита, но и как модель метаболических нарушений связанных с образом жизни.

По сравнению с контрольной группой, экстракт бадана снижал содержание триглицеридов в сыворотке крови у животных на 55%.

Следует отметить, что применение сибутрамина гидрохлорида не вызывало снижение уровня триглицеридов. Потребление высококалорийной диеты может приводить к развитию депрессии, что и наблюдалось в ходе исследования - отмечалось снижение ориентировочно-исследовательской активности и эмоционального статуса.

В ходе исследования было установлено, что на модели «диета кафетерия» наиболее эффективным оказался исследуемый экстракт бадана, на фоне применения которого, наблюдалось выраженное и устойчивое снижение потребления пищи. Также на фоне применения экстракта Бадана снижалась масса тела животных. Установлено, что данный препарат подавлял аппетит животных, нормализуя при этом липидный и углеводный обмена.

Сибутрамина гидрохлорид также имел влияние на потребление пищи, однако этот эффект был менее выраженным и устойчивым, чем у препаратов растительного происхождения. Кроме этого, сибутрамина гидрохлорид не предотвращал развитие нарушений в углеводном и липидном обмене, связанных с «диетой кафетерия».

## Глава 4 . ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

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., Селезнева А.И. и др., 2012). Так на модели стрептозотоцин-индуцированного диабета проводили оценку исследуемых препаратов на утилизацию глюкозы и антиоксидантный статус (Ковалева М. А., Иванова С. 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  $O_2$  и  $NO$  (рис. 31).

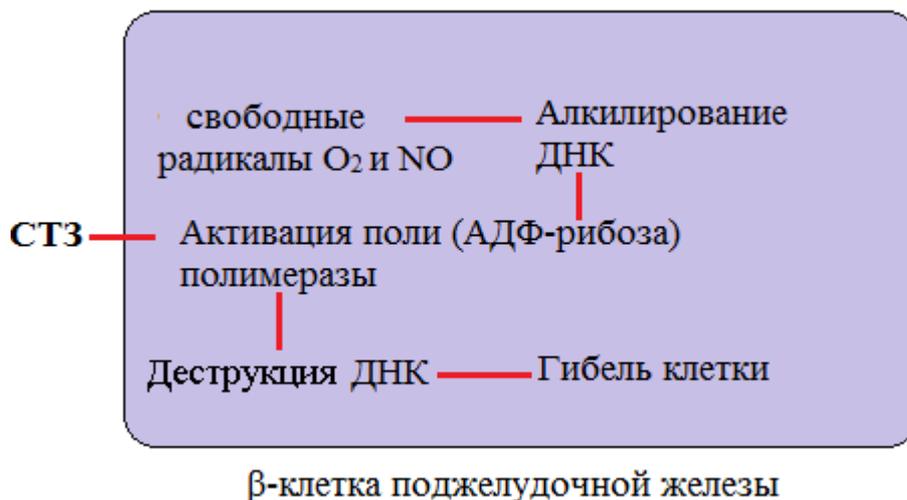


Рисунок 31 – Схема механизма действия стрептозотоцина в β-клетке поджелудочной железы

В результате происходит алкилирование ядерной ДНК, что приводит к запрограммированной гибели клетки (Okamoto H., 1981).

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.

На модели экспериментального СТЗ индуцированного диабета смешенного типа нами установлены не только фармакологические эффекты, но и наиболее вероятные механизмы действия тестируемых объектов.

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). На 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., Иванова С. А и др., 2013).

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 тестируемого 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 Hodgson J.M., 2002 описано позитивное влияние убидекаренона на эндотелиальную функцию, снижение систолического давления и образование гликозилированного гемоглобина за счет увеличения концентрации оксида азота. В работах Minogi et al. была выдвинута гипотеза о том, что в синтезе немитохондриального эндогенного коэнзима Q10 участвует белок, содержащий пренил-трансферазный домен (Ubiad1). В исследованиях авторы доказали, что для синтеза эндогенного оксида азота необходимо достаточное количество коэнзима Q10 в митохондриях и структурах аппарата Гольджи (Minogi et al., 2013). Таким образом, антигипергликемический эффект убидекаринона, выявленный в наших исследованиях может определяться как митохондриальным эффектом исследуемого препарата, так и возможным увеличением синтеза коэнзима Q10 в мембранах аппарата Гольджи эндотелиальных клеток.

Учитывая, что в тесте «принудительное плавание» экстракт бадана не вызывал гипергликемии и лактоацидоза его антигипергликемическое действие, установленное на модели экспериментального диабета смешанного типа, связано с механизмом действия обусловленным активацией захвата глюкозы клетками.

С целью дальнейшего понимания молекулярного механизма действия убидекаренона его антигипергликемическое действие было изучено на модели неонатального стрептозотоцин-индуцированного диабета. В условиях данной модели полностью не завершено формирование поджелудочной железы, а также не сформированы транспортные белки. Однако в этом исследовании установлен еще более выраженный антигипергликемический эффект, который сопровождался гиполлипидемическим действием и препятствовал статистически значимому увеличению диаметра адипоцитов.

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).

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

Говоря о возможном молекулярном механизме 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).

## ВЫВОДЫ

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

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.

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

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

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.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК	-	Активные формы кислорода
АТФ	-	Аденозинтрифосфат
ВГ	-	Восстановленный глутатион
ВОЗ	-	Всемирная организация здравоохранения
ГИП	-	Глюкозозависимый инсулиотропный полипептид
ГПП-1	-	Глюкагоноподобный пептид-1
ГЛЮТ	-	Глюкозные транспортеры
ГСК-3	-	Киназа 3 гликогенсинтазы
ДПП-4	-	Дипептидилпептидазы-4
ДНК	-	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМТ	-	Индекс массы тела
ИР	-	Инсулинорезистентность
ИРС	-	Субстраты инсулинового рецептора
ЛПВП	-	Липопротеинов высокой плотности
ЛПНП	-	Липопротеинов низкой плотности
МДА	-	Малонового диальдегида
МС	-	Метаболический синдром
НТГ	-	Нарушение толерантности к глюкозе
ПГНХМ	-	Комплексный препарат из панциря зеленых морских ежей <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>
СД	-	Сахарный диабет
СЖК	-	Свободные жирные кислоты
СМ	-	Сульфонилмочевина
СМОА	-	Стабильные метаболиты оксида азота
СР	-	Свободные радикалы
СРО	-	Свободнорадикальное окисление
СТЗ	-	Стрептозотцин
ТГ	-	Триглицериды

ФТК-3	-	Фосфатидилинозитол 3-киназы
ЦТК	-	Цикл трикарбоновых кислот
ADA	-	American Diabetes Association
HbA1c	-	Гликозилированный гемоглобин
КоQ10	-	Коэнзим Q <sub>10</sub>
LDL	-	Low density lipoprotei
PAI-1	-	Активатор плазмогена-1
PI-3K	-	фосфатидилинозитол-3-киназы
PPAR- $\gamma$	-	Peroxisome proliferator-activated receptors
SHR	-	Spontaneously hypertensive rat
TNF	-	Tumor necrosis factor
Ubiad1	-	белок, содержащий пренил-трансферазный домен

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айзенберг, Л.В. Использование вазопростана и изокета для лечения легочной гипертензии в послеоперационный период у кардиохирургических больных/ В.М. Магилевец, А.В. Фомичева, Д.А. Косолапов и др. // Вестник интенсивной терапии. – 2004. – № 2. – С. 75-78.
2. Дедова, И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом/ И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. – М.: 2013 – 120 с.
3. Аметов, А.С. Перспективы развития диабетологии/ А.С.Аметов // Терапевт, архив – 2005 – Т.7, № 10. – С. 5-9.
4. Аметов, А.С. Усилия и ограничения в реализации национальных программ по сахарному диабету/ А.С.Аметов // Русский медицинский журнал. – 1995. – Т.1, № 1. – С. 45-46.
5. Аметов, А.С. Роль  $\beta$ -клеток в регуляции гомеостаза глюкозы в норме и при сахарном диабете 2 типа/ А.С.Аметов // Сахарный диабет. – 2008. – Вып. 4. – С. 6-11.
6. Аминева, Н.В. Коагуляционные признаки эндотелиального стресса у больных СД 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией/ Н.В. Аминева, М.Т. Сальцева, О.В. Занозина и др. // Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т.48, № 4. – С. 27-30.
7. Аронов, Д.М. Что важно знать практическому врачу об убихиноне (коэнзим Q10). Антиоксидантный препарат Кудесан. Применение в кардиологии (Часть 2)/ Д.М. Аронов // Кардиология. – 2006. – № 12.– С. 4-19.
8. Балева, Е.С., Кром И.Л., Алешкина О.Ю. Объективизация отдалённого клинического прогноза больных ишемической болезнью сердца/ Е.С. Балева, И.Л. Кром, О.Ю. Алешкина // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 7 (Ч. 3). – С. 511-513.

9. Дедов, И.И. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика/ И.И. Дедова, М.В. Шестаков // М.: «Издательство «Медицинское информационное агенство». – 2011. – 416 с.
10. Берштейн, Л.М. «Метаболически здоровые» лица с ожирением и метаболические признаки ожирения у лиц с нормальной массой тела: что за этим стоит?/ Л.М. Берштейн, И.Г. Коваленко // Проблемы эндокринологии. – 2010. – Вып. 3. – С. 47-51.
11. Бизенкова, М.Н. Патогенетическое обоснование целесообразности использования цитофлавина при ишемическом повреждении миокарда/ М.Н. Бизенкова, Н.П. Чеснокова, М.Г. Романцов // Фундаментальные исследования. – 2006. – №4. – С. 20-24.
12. Благодосклонная, Я.В. Эндокринология/ Я.В. Благодосклонная, Е.В. Шляхто, А.Ю. Бабенко – СПб: «СпецЛит», 2004. – С. 277-338.
13. Брюханов, В.М. Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления в крови у крыс/ В.М. Брюханов, И.В. Смирнов, А.А. Бондарев и др. // Биомедицина. – 2011. – №1. – С. 41-49.
14. Василькова, Т.Н. Влияние различных типов жиротложения на состояние сердечно-сосудистой системы/ Т.Н. Василькова, Т.Б. Баклаева, С.И. Матаев // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2014. – Т. 75, №1. – С. 45-49.
15. Воронина, Т.А. Экспериментальная психофармакология ноотропов/ Т.А. Воронина // Книжное издательство «Фармакология ноотропов (экспериментальное и клиническое изучение)». – М.: 1989. – С. 8-20.
16. Гинсар, Е.А. Распространенность метаболического синдрома и его структура в зависимости от массы тела у работающих мужчин г. Мирного/ Е.А. Гинсар, В.Г. Селятицкая, Ю.В. Лутов // Профилактическая медицина. – 2010. – Т. 13, №1. – С. 37-41.

17. Голиков, А.П. Свободно-радикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами/ А.П. Голиков, С.А.Бойцов, В.П. Михин и др. // Лечащий врач. – 2003. – №4. – С. 35-37.
18. Головченко, В.В. Структурное исследование бергенана, пектина из бадана толстолистного *Bergenia crassifolia*/ В.В. Головченко, О.А. Бушнева, Р.Г. Оводова и др. // Биоорганическая химия. 2007. –Т. 33. №1. –С. 54–63.
19. Государственная фармакопея Российской Федерации XII издания// Часть 1. – М.: 2007. – 416 с.
20. Государственная фармакопея СССР XII издание // Вып. 2. – М.: 1990. – 399 с.
21. Гривенникова, В.Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями/ В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 245–246.
22. Дедов, И.И. От имени рабочей группы. Российский национальный консенсус «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение»/ И.И. Дедов, В.И. Краснопольский, Г.Т. Сухих // Сахарный диабет. – 2012. – №4. – С. 4-10.
23. Деримедв, Л.В., Бухтиярова И.П. Антиоксиданты в терапии сахарного диабета/ Л.В. Деримедв, И.П. Бухтиярова // Провизор. – 2007. – Вып. № 24. – С.14-19.
24. Доскина, Е.В. Современная комбинированная терапия сахарного диабета 2 типа, или борьба с «неподдающимся пациентом»/ Е.В.Доскина // Эффективная фармакотерапия. – Вып. 9 – 2014. – С. 51-56.
25. Ефимов, А.С. Сахарный диабет/А.С. Ефимов, Я.Л. Германюк // Киев: «С.П.Генес». – 1983. – 224 с.
26. Капелько, В.И. Исследования действия Кудесана при повреждении сердечной мышцы, вызванной стрессом. Применение антиоксидантного препарата кудесан (коэнзим Q10 с витамином Е) в кардиологии/ В.И. Капелько, Э.К. Рууге // М.: – 2002. – 122 с.

27. Касаткина, С.Г. Значение дисфункции эндотелия у больных сахарным диабетом 2 типа/ С.Г. Касаткина, С.Н. Касаткин // *Fundamental research*. – 2011. – №7. – С. 248-252.
28. Ковалева, М.А. Эффективность убидекаринона при метаболическом синдроме и артериальной гипертензии в эксперименте/ М.А. Ковалева, А.И. Селезнева, М.Н. Макарова и др. // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2012. – №4. – С. 81-88
29. 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/ М. А. Ковалева, С. А. Иванова, М. Н. Макарова // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т.76. №8. – С. 27-32.
30. Крутиков, И.Ф. Архитектоника поджелудочной железы человек в норме и патологии: Авторефер. дис... доктора медицинских наук/ И.Ф. Крутиков. – Л., 1971. – 35 с.
31. Лупинская, З.А. Эндотелий. Функция и дисфункция/ З.А. Лупинская, А.Г. Зарифьян, Т.Ц. Гурович и др. // Бишкек: КРСУ. – 2008. – 373 с.
32. Медведев, О.С. Коэнзим Q10 в кардиологической практике – теоретические основы и результаты клинических исследований/ О.С. Медведев, Е.И. Каленикова, Е.А. Городецкая и др. // *РМЖ*. – 2009. – Т.17, №18. – С. 1177-1181.
33. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови/ В.А. Метельская, Н.Г. Гумано // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2005. – №6. – С. 15-18.
34. Михайлова, А.В. Гипоксические тренировки в спорте (восстановление спортивной работоспособности и аэробной выносливости) – новый подход/ А.В. Михайлова, С.Ю. Золичева, К.А. Камаев // *Наука и спорт: современные тенденции*. – 2013. – №1. – С. 96-104

35. Национальные рекомендации ВНОК и-ОССН по диагностике и лечению ХСН (третий пересмотр) // Сердечн. недостаточность. – 2010. – Т.11., №1. – С. 3-62.
36. Олейник, С.А. Антигипоксанты в спортивной медицине и практике спортивной подготовки/ С.А. Олейник, Н.А, Горчакова, Л.М. Гунина // Спортивная медицина. – 2008. – № 1. – С. 66-73.
37. Панькив, В.И. Инкретины: новая веха в лечении сахарного диабета 2-го типа. Возможности ситаглиптина в достижении компенсации сахарного диабета 2-го типа/ В.И. Панькив // Международный эндокринологический журнал. – 2011. – № 6. – С. 38.
38. Писарев, В.Б. Ультраструктурные изменения  $\beta$ -клеток панкреатических островков при сахарном диабете на фоне введения БАД / В.Б. Писарев, Г.Л. Снигур, А.А. Спасов и др. // Морфологические ведомости. – 2010. – №1. – С. 78-81.
39. Рекомендации экспертов всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (второй пересмотр) // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2009. – № 8. – С. 6-9.
40. Романцова, Т.И. Влияние метформина на массу тела у больных сахарным диабетом 2 типа, получающих аналоги инсулина/ Т.И. Романцова, Т.Ш. Джавахишвили, О.В. Роик // Сахарный диабет. – 2013. – № 1. – С. 48-51.
41. Саратиков, А.С. Родиола розовая – ценное лекарственное растение: Золотой корень/ А.С. Саратиков, Е.А. Краснов // Томск. – Издательство томского университета. – 1987. – 254 с.
42. Симоненко, В.Б. Клиническое значение выявления инсулинорезистентности у женщин с метаболическим синдромом/ В.Б. Симоненко, Е.И. Соколов, А.А. Зыкова и др. // Кардиология. – 2006. – №4. – С. 24-29.

43. Снигур, Г.Л. Алгоритм патогистологического исследования поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете/ Г.Л. Снигур, А.В. Смирнов // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2010. – № 3. – С. 58-59.
44. Снигур, Г.Л. Сравнительные аспекты ультраструктурных изменений инсулоцитов панкреатических островков при экспериментальном сахарном диабете/ Г.Л. Снигур, А.В. Смирнов, М.В. Шмидт и др. // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – № 1. – С. 108-111.
45. Снигур, Г.Л. Апоптоз инсулоцитов парапанкреатических островков и пути его фармакокоррекции/ Г.Л. Снигур, А.А. Спасов, М.П. Воронкова // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2012. – Вып. 2. – С. 6-8.
46. Строев, Ю.И. Классические и современные представления о метаболическом синдроме. Часть 2. Патогенез/ Ю.И. Строев, М.В. Цой, Л.П. Чурилов и др. // Вестник Санкт-Петербургского Университета. – 2007. – Вып. 4. – С. 3-13.
47. Федосеева, Л.М. Анализ арбутина подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного (*Bergenia crassifolia* (L.) Fitch.), произрастающего на Алтае/ Л.М. Федосеева // Химия растительного сырья. – 2003. – № 1. – С. 73-77.
48. Хазанов, В.А. Кинетические характеристики системы энергопродукции головного мозга крыс при постгипоксической энцефалопатии и ее коррекции экстрактом бадана толстолистного/ В.А. Хазанов, Н.Б. Смирнова // Бюллетень экспериментальной биологической медицины. – 2000. – Т. 129, №1. – С. 73-75.
49. Чекушина, И.В. Возрастные особенности содержания миелиновых волокон в нервах селезеночного сплетения человека/ И.В. Чекушина // Архив анатомии. – 1986. – Вып. 2. – С. 57-61.

50. Чибисов, С.М. Метаболический синдром: больше вопросов, чем ответов/ С.М. Чибисов, С.И. Рапопорт, Д.Б. Колесников и др. // Клиническая медицина. – 2008. – № 6. – С. 30-35.
51. Чистяков, Д.А. Гены антиоксидантной защиты и предрасположенность к сахарному диабету/ Д.А. Чистякова, К.В. Савостьянов, Р.И. Туракулов // Сахарный диабет. – 2000. – №3. – С. 4-12.
52. Шилов, А.М. Место статинов в коррекции нарушений липидного обмена у пациентов с метаболическим синдромом/ А.М. Шилов, М.В. Мельник, А.О. Осия // Лечащий врач. – 2010. – № 4. – С. 68-71.
53. Эскина, К.А. Влияние силимарина и янтарной кислоты на метаболические нарушения при экспериментальном сахарном диабете: автореферат дис. ... канд.мед.наук: 14.00.25, 14.00.16 / Эскина Ксения Аркадьевна. – Т., 2007. – 23 с.
54. Abe Wickrama, K.R. Oral hypoglycaemic, antihyperglycaemic and antidiabetic activities of Sri Lankan Broken Orange Pekoe Fannings (BOPF) grade black tea (*Camellia sinensis* L.) in rats/ K.R. Abe Wickrama, W.D. Ratnasooriya, A.M. Amarakoon // Journal of Ethnopharmacology. – 2011. – Vol. 135. – P. 278-286.
55. Altman, D.G. How to randomize/ D.G. Altman, J.M. Bland // BMJ. – 1999. – Vol. 11. – P. 319.
56. American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes-2013 // Diabetes Care. – 2013. – Vol. 36 (Supplement 1). – 789 p.
57. Azadbakht, M. Biological activity of leaf extract and phenolglycoside arbutin of *Pyrus boissieriana* Buhse/ M. Azadbakht, A. Marston, K. Hostettmann et al. // Journal of Medicinal Plants. – 2004. – №3. – P. 9-14.
58. Baggio, L.L. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis/L.L. Baggio, Q. Huang, T.J. Brown T.J. et al. // Diabetes. – 2004. –

№9. – P. 2492-2500.

59. Ballabh, B., Chaurasia O.P., Ahmed Z., Singh S.B. Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh used against kidney and urinary disorders/ B. Ballabh, O.P. Chaurasia, Z. Ahmed et al. // Journal of Ethnopharmacology. – 2008. – N 118. – P. 331-339.

60. Banning, D.P. Respiratory burst dependent activation of the blood- born mutagen Mel Qx by inflammatory cells of the rat pleural cavity/ D.P. Banning, N.J. Gooderham // Mutagenesis and Experimental Toxicology. – 1991. – Vol. 10. – P. 485-486.

61. Bast, G.R. Oxidants and antioxidants state of the art/ G.R. Bast, C.J. Haenen, A. Doelman // American Journal of Medicine. – 1991. – Vol. 91. – P. 26-136.

62. Bayens, J.W. Oxidative stress in diabetes/ J.W. Bayens, S.R. Thorpe // Antioxidants in Diabetes Management (Ed. Packer. New York: M. Dekker Inc.). – 2000. – P. 58-66.

63. Bergman, R.N. Insulin Resistance: Insulin Action and Its Disturbances in Disease/ R.N. Bergman // English Journal of Medicine. – 2005. – Vol. 353. – P. 2201-2209.

64. Belliere, J. Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death/ J. Belliere, F. Devun, C. Cottet-Rousselle et al. // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. – 2012. – Vol. 44 (1). – P. 207-212.

65. Bhagavan, H.N. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations/ H.N. Bhagavan, R.K. Chopra // Mitochondrion. – 2007. – Vol. 7. – P. S78-88.

66. Bohm, B.A. Flavonoids of some species of *Bergenia francoa*, *Parnassia* and *Lepuropetalon*/ B.A. Bohm, L.S. Donevan, U.G. Bhat // Biochemical Systematics and Ecology. – 1986. – Vol. 14. – P. 75-77.

67. Bray, G.A. Medical consequences of obesity/ G.A. Bray // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2004. – N 89. – P. 2583-2589.

68. Bray, G.A. Pharmacological treatment of the overweight patient/ G.A. Bray,

F.L. Greenway // *Pharmacological Reviews*. – 2007. – N 59. – P. 151-184.

69. Butler, A.E. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes/ A.E. Butler , J. Janson , S. Bonner-Weir et al. // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52(1). – P. 102-110.

70. Cadenas, E. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells/ E. Cadenas, P. Hochstein, L. Ernster // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*– 1992. – Vol. 65. – P. 97-146.

71. Caimari, A. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions/ A. Caimari, P. Oliver, J. Keijer et al. // *OMICS*. – 2010. – N 14. – P. 129-141.

72. Carlson A.J. Toxicity studies on hydroquinone/ A.J. Carlson, N.R. Brewer // *Proceedings of the Society for Experimental Biology (New York)*. – 1953. – Vol. 84. – P. 684-688.

73. Chernetsova, E.S. ID-CUBE direct analysis in real time high resolution mass spectrometry and its capabilities in the identification of phenolic components from the green leaves of *Bergenia crassifolia*/ E.S. Chernetsova, E.A. Crawford, A.N. Shikov et al. // *L. Rapid Communications in Mass Spectrometry*. – 2012. – Vol. 26. – P. 1329-1337.

74. Cowie, C.C. Physical and metabolic characteristics of persons with diabetes. *Diabetes in America*. 2<sup>nd</sup>ed. Washington (DC)/ C.C. Cowie, M.I. Harris // *National Institutes of Health*. – 1995. – P. 117-164.

75. Cuendet, M. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention/ M. Cuendet, M. Pezzuto // *Drug Metabol. Drug Interact.* – 2000. – Vol.17, №1. – P. 109-157.

76. Cummings, D.E. Genetics and pathophysiology of human obesity/ D.E. Cummings, M.W. Schwartz // *Annual Review of Medicine*. – 2003. – Vol. 54. – P. 453-471.

77. De La Garza, A.L. Natural inhibitors of pancreatic lipase as new players

- inobesitytreatment/ A.L. De La Garza, F.I. Milagro, N. Boque // *Planta Medica*. – 2011. – Vol. 77. – P. 773-785.
78. Deisinger, P.J. Human exposure to naturally occurring hydroquinone/ P.J. Deisinger, T.S. Hill, J.C. English // *Journal of Toxicology and Environment Health*. – 1996. – N 47. – P. 31-46.
79. Demeterco, C. Adult human beta-cell neogenesis?/ C. Demeterco, E. Hao, S.H. Lee et al. // *Diabetes Obesity Metabolism* – 2009. – Vol. 11. – P. 46-53.
80. Dhalwal, K. Simultaneous quantification of bergenin, catechin, and gallic acid from *Bergenia ciliata* and *Bergenia ligulata* by using thin-layer chromatography/ K. Dhalwal, V.M. Shinde, Y.S. Biradar et al. // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2008. – N 21. – P. 496-500.
81. Elfhag, K. Sibutramine treatment in obesity: initial eating behaviour in relation to weight loss results and changes in mood/ K. Elfhag, S. Rössner, B. Barkeling et al. // *Pharmacol Res*. – 2005. – Vol. 51(2). – P. 159-163.
82. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups/ G.L. Ellman // *Archiv Biochemistry Biophysics* – 1959. – Vol. 82. – P. 70-71.
83. Ernster, L. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms/ L. Ernster, P. Forsmark-Andree // *Clinical Investigation*. – 1993. – Vol. 71. – P. 60-65.
84. Fedoseeva, L.M. Study of flavonoids in red leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. growing in Altai/ L.M. Fedoseeva, E.V. Timokhin // *Himija rastitel'nogo syrja*. – 1999. – N 4. – P. 81-84.
85. Fedoseyeva, L.M. Antimicrobial activity of dry extract from leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. with respect to pathogens of some upper respiratory inflammatory diseases/ L.M. Fedoseyeva, S.I. Kerasheva, E.V. Karabasova // *Rastitel'nye Resursy*. – 2000. – N 36. – P. 153-157.
86. Finucane, M.M. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants/ M.M. Finucane, G.A.

- Stevens, M.J. Cowan et al. // *Lancet*. – 2011. – Vol. 377. – P. 557-567.
87. Fitchett, D. The Metabolic Syndrome is an Important Concept in Therapeutic Decision Making: PRO Canadian/ D. Fitchett // *Journal of Cardiology*. – 2014. – Vol. 102. – P. 1456–1463.
88. Gadde, K.M. Cannabinoid-1 Receptor Antagonist, Rimonabant, for Management of Obesity and Related Risks/ K.M. Gadde, D.B. Allison // *Circulation*. – 2006. – Vol. 29. – P. 974-984.
89. Gallagher, A.M. The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion/ A.M. Gallagher, P.R. Flatt, G. Duffy // *Nutrition Research*. – 2003. – Vol. 23. – P. 413-424.
90. Garber, A. Metformin-glibenclamide versus metformin plus rosiglitazone in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin monotherapy/ A. Garber, E. Klein, S. Bruce et al. // *Diabetes Obes Metab*. – 2006. – Vol. 8. – P. 156-163.
91. Golovchenko, V.V. Structural study of bergenan, a pectin from *Bergenia crassifolia*/ V.V. Golovchenko, O.A. Bushneva, R.G. Ovodova et al. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2007. – Vol. 33. – P. 47-56.
92. Gonzalez-Castejon, M. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: a review/ M. Gonzalez-Castejon, A. Rodriguez-Casado // *Pharmacological Research*. – 2011. – Vol. 64. – P. 438-455.
93. Gupta, A.K. Compliance, safety, and effectiveness of fixed-dose combinations of antihypertensive agents: a meta-analysis/ A.K. Gupta, S. Arshad, N.R. Poulter // *Hypertension*. – 2010. – № 55. – P. 399-407.
94. Guz, Y. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes/ Y. Guz, I. Nasir, G. Teitelman // *Endocrinology*. – 2001. – Vol. 142(11). – P. 4956-4968.
95. Hasegawa, G. Overt diabetes induced by overeating in neonatally STZ-treated impaired glucose tolerant mice: long-term follow study/ G. Hasegawa, H. Mori, M. Sawada et al. // *Endocrinol Jpn*. – 1989. – Vol. 36(4). – P. 471-479.

96. Hellstrom, J.K. Blood pressure - lowering properties of chokeberry (*Aronia mitchurinii*, var, Viking)/ J.K. Hellstrom, A.N. Shikov, M.N. Makarova // Journal of Functional Foods. – 2010. – N 2. – P. 163-169.
97. Hers, H.G. The control of glycogen metabolism in the liver/ H.G. Hers // Annu. Revolution Biochemistry. – 1976. – N 45. – P. 167.
98. Heyne, A. An animal model of compulsive food-taking behavior/ A. Heyne, C. Kiesselbach, I. Sahún et al. // Addict Biology. – 2009. – N 14. – P. 373–383.
99. Hodgson, J.M. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes/ J.M. Hodgson, G.F. Watts, D.A. Playford et al. // Europin Journal Clinical Nutr. – 2002. – Vol. – 56(11). – P. 1137-1142.
100. Hwang, N. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance/ N. Hwang, E.D. Rosen, E.S. Lander et al. // Vasc Pharmacy. – 2007. – N 46. – P. 456-462.
101. Ibarraa, A. *Fraxinus excelsior* seed extract FraxiPure™ limits weight gains and hyperglycemia in high-fat diet-induced obese mice/ A. Ibarraa, N. Baia, K. Hea // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 18. – P. 479-485.
102. Islam, S. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study/ S. Islam, H. Choi // Pharmacology. – 2007. – № 79. – P. 243-249.
103. Jellinge, P.S. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance/ P.S. Jellinge // Clinical Cornerstone. – 2007. – Vol. 8 (Suppl. 7). – P. 30-42.
104. Khazanov, V.A. Kinetic characteristics of the energy production system in rat brainunderconditions of posthypoxic encephalopathy and its correction with *Bergeniae crassifoliae* extracts/ V.A. Khazanov, N.B. Smirnova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2000. – N 1. – P. 63-65.
105. Kim, A.Y. Dose dependent effects of lycopene enriched tomato-wine on liver and adipose tissue in high-fat diet fed rats/ A.Y. Kim, Y.J. Jeong, Y.B. Park et al. // Food Chemistry. – 2012. – Vol. 130. – P. 42-48.

106. Koji, Y. Proliferation and differentiation of pancreatic  $\beta$ -cells: ultrastructural analysis of the pancreas in diabetic mice induced by selective alloxan perfusion/ Y. Koji, M. Junichiro, W. Masako // *Medical Electron Microscopy*. – 1997. – Vol. 30, №. 3. – P. 170-175.
107. Korner, J. Pharmacological approaches to weight reduction: therapeutic targets/ J. Korner, L.J. Aronne // *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 2004. – N 89. – P. 2616-2621.
108. Kuklinski, B. Coenzyme Q10 and antioxidants in acute myocardial infarction/ B. Kuklinski, E. Weissenbacher, A. Fähnrich // *Molecular Aspects Medicine*. – 1994. – № 15. – P. 143-147.
109. Kulinsky, V.I. The glutathione system. II. Other enzymes, thiol-disulfide metabolism, inflammation, and immunity, functions/ V.I. Kulinsky, L.S. Kolesnichenko // *Biomedical Chemistry*. – 2009. – Vol. 3. – P. 211-220.
110. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes/ S. Lenzen // *Diabetologia*. – 2008. – Vol. 51. – P. 216-226.
111. Li, R.W. A new anti-inflammatory glucoside from *Ficus racemosa*/ R.W. Li, D.N. Leach, S.P. Myers et al. // *L. Planta Medica*. – 2004. – Vol. 70. – P. 421-426.
112. Lim, H.K. Effects of berberin, the major constituent of *Mallotus japonicus* against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats/ H.K. Lim, H.S. Kim, H.S. Choi et al. // *Pharmacology*. – 2001. – Vol. 63. – P. 71-75.
113. Mugoni, V. Ubiad1 Is an Antioxidant Enzyme that Regulates eNOS Activity by CoQ10 Synthesis/ V. Mugoni, R. Postel, V. Catanzaro et al. // *Cell*. – 2013. – Vol.152. – P. 504-518.
114. Mithieux, G. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet/ G. Mithieux, L. Guignot, J.C. Bordet // *Diabetes*. – 2002. – Vol.51. – P. 139-143.
115. Miyazaki, Y. Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in type II diabetic patients/ Y. Miyazaki, L. Glass, C. Triplitt et al. // *Diabetologia*. – 2001. – N 44. – P. 2210-2219.

116. Morgan, C.R. Immunoassay of insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic and diabetic rats/ C.R. Morgan, A. Lazarow // *Diabetes*. – 1963. – Vol. 12. – P. 115-125.
117. Morris, M.J. Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: temporal response in obesity induced by palatable diet/ M.J. Morris, H. Chen, R. Watts // *International Journal Obesity*. – 2008. – N 32. – P. 249-258.
118. Muller, S. Action of metformin on erythrocyte membrane fluidity in vitro and in vivo/ S. Muller, S. Denet, H. Candiloros // *European Journal of Pharmacology*. – 1997. – Vol. 337. – P. 103-110.
119. Musi, N. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes/ N. Musi, M.F. Hirshman., J. Nygren et al. // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – P. 2074-2081.
120. Nakayama, T. The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed: possible physiological significance of specific cleavage by caspase 3/ T. Nakayama, M. Hattori, Keiko Uchang et al. // *Biochem. Journal*. – 2004. – Vol. 377. – P. 299-307.
121. Nazir, N. Immunomodulatory effect of berberin and norberberin against adjuvant- induced arthritis - a flow cytometric study/ N. Nazir, S. Koul, M.A. Qurishi // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2007. – Vol. 112. – P. 401-405.
122. Nesto, R.W. Thiazolidinedione use, fluid retention and congestive heart failure: a consensus statement from the American heart association and American diabetes association/ R.W. Nesto // *Diabetes care*. – 2004. – N27. – P. 256-263.
123. Nystrom, F.H. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity/ F.H.Nystrom, M.J Quon // *Cell Signal*. – 1999. - Vol. 11(8). – P. 563-574.
124. Okamoto, H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin dependant diabetes/ H. Okamoto // *Molecular Cell Biochemistry* – 1981. – N 37. – P. 43-61.
125. Onakpoya, I. Efficacy of herbal supplements containing *Citrus aurantium*

and synephrine alkaloids for the management of overweight and obesity: a systematic review/ I. Onakpoya, L. Davies, E. Ernst // Focus on Alternative and Complementary Therapies. – 2011. – N 16. – P. 254-260.

126. Patten, S.B. Major depressive episodes and diet pills. Review/ S.B. Patten // Expert Opin Pharmacother. – 2002. – Vol. 3(10). – P. 1405-1409.

127. Padwal, R.S. Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine and rimonabant/ R.S. Padwal, S.R. Majumdar // Lancet. – 2007. – Vol. 369. – P. 71-77.

128. Piacente, S. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity/ S. Piacente, C. Pizza, N. DeTommasi et al. // Journal of Natural Products. – 1996. – Vol. 59. – P. 565-569.

129. Pipe, A. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance/ A. Pipe // Clinical Journal of Sport Medicine. – 2004. – N 14. – P. 188-189.

130. Popov, S.V. Immunostimulating activity of pectic polysaccharide from *Bergenia crassifolia* (L) Fritsch/ S.V. Popov, G.Y. Popova, S.Y. Nikolaeva // Phytotherapy Research. – 2005. – N 19. – P. 1052-1056.

131. Porsolt, R.D. Behavioral despair in mice: A primary screening test for antidepressants/ R.D. Porsolt, A. Bertin // Archives international pharmacodynamics therapeutics. – 1977. – Vol. 229. – P. 327-336.

132. Pozharitskaya, O.N. Separation and evaluation of free radical-scavenging activity of phenol components of green, brown, and black leaves of *Bergenia crassifolia* by using HPTLC-DPPH method/ O.N. Pozharitskaya, S.A. Ivanova, A.N. Shikov et al. // Journal of Separation Science. – 2007. – Vol. 30. – P. 2447-2451.

133. Quintus, J. Urinary excretion of arbutin metabolites after oral administration of bearberry leaf extracts/ J. Quintus, K.-A Kovar, P. Link // Planta Medica. – 2005. – N 71. – P. 147-152.

134. Reed, J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death/ J.C. Reed // Journal Cell Biology. – 1994. – Vol.124. – P. 1-6.

135. Rogers, P. Meal patterns and food selection during the development of obesity in rats fed a cafeteria diet/ P. Rogers // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 1984. – N 8. – P. 441-453.
136. Rolls, B.J. Persistent obesity in rats following a period of consumption of a mixed, high energy diet/ B.J. Rolls, E.A. Rowe, R.C. Turner // *Journal Physiology* – 1980. – N. 298. – P. 415-427.
137. Rose, P. Dietary antioxidants and chronic pancreatitis/ P. Rose, E. Fraine, L. P. Hunt // *Human nutrition. Clinical nutrition*. – 1986. – Vol. 40. – P. 151-164.
138. Roselli, M. Phytochemical, antioxidant and anti- $\alpha$ -glucosidase activity evaluations of *Bergenia cordifolia*/ M. Roselli, G. Lentini, S. Habtemariam // *Phytotherapy Research*. – 2011. – Vol. 26. – P. 908-914.
139. Saleh, D.O. Streptozotocin-induced vascular and biochemical changes in rats: effects of rosiglitazone/ D.O. Saleh, A.R. Bayoumi, W.I. El-Eraky et al. // *Metformin Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. – 2013. – Vol. 51, Issue 2. – P. 131-138.
140. Sedlak, J. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent/ J. Sedlak, R.H. Lindsay // *Analyt. Biochemistry* – 1968. – Vol. 25. – P. 192-205.
141. Sell, H. The adipocyte–myocyte axis in insulin resistance/ Sell H., D. Dietze-Schroeder, J. Eckel // *Trends in Endocrinology and Metabolism*. – 2006. – Vol. 17. – P. 416-422.
142. Shahaboddin, M.-E. *Pyrus brossieriana* Buhse leaf extract: an antioxidant, antihyperglycaemic and antihyperlipidemic agent/ M.-E. Shahaboddin, M. Pouramir, A.-A. Moghadamnia et al. // *Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 126. – P. 1730-1733.
143. Shikov, A.N. Proceedings of International Symposium HPTLC/ A.N. Shikov, V.G. Makarov // *Basel*. – 2011. – Vol. 74. – P. 68
144. Shikov, A.N. Chemical composition of extracts from green, brown and black leaves of *Bergenia crassifolia*/ A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, H.J.D. Dorman //

Planta Medica. – 2007. – Vol. 73. – P. 897.

145. Shikov, A.N. Examination of adaptogenic effect of infusions of *Bergenia crassifolia* black and fermented leaves in the forced swimming test/ A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, M.N. Makarova // Planta Medica. – 2008. – Vol. 74. – P. 908.

146. Shikov, A.N. Adaptogenic effect of black and fermented leaves of *Bergenia crassifolia* L. in mice/ A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, M.N. Makarova // Journal of Functional Foods. – 2010. – N 2. – P. 71-76.

147. Shikov, A.N. The offline combination of thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography with diode array detection and micrOTOF-Q mass spectrometry for the separation and identification of spinochromes from sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) shells/ A.N. Shikov, V.I. Ossipov, O. Martiskainen, O.N. Pozharitskaya et al. // Journal of Chromatography A. – 2011. – Vol. – 1218(50). – P. 9111-9114.

148. Singleton, V.L. Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent/ V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos // Packer, L. (Ed.), Methods in Enzymology. Academic Press, San Diego, CA. – 1999. – P. 152-178.

149. Skulachev, V.P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics/ V.P. Skulachev // Biochim Biophys Acta. – 1998. – Vol. 1363 (2). – P. 100-124.

150. Stites, T. Pyrroloquinoline Quinone Modulates Mitochondrial Quantity and Function in Mice/ T. Stites, D. Storms, K. Bauerly // Journal Nutrition. – 2006. – Vol. 136. – №2. – P. 390-396.

151. Syväne, M. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent Diabetes mellitus/ M. Syväne, M.R. Taskinen // Lancet. – 1997. – Vol. 350. – P. 20-23.

152. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas/ T. Szkudelski // Physiological Research – 2001. – Vol. 50, №. 6. – P. 536-546.

153. Takada, J. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass/ J. Takada, M.A. Machado, Peres S.B. // *Metabolism*. – 2007. – Vol. 56(7). – P. 977-84.
154. Uchiyama, S. Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo/ S. Uchiyama, Y. Taniguchi, A. Saka // *Nutrition*. – 2011. – Vol. 27. – P. 287-292.
155. UK Prospective Diabetes Study Group: UK Prospective Diabetes Study 16: overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease// *Diabetes*. – 1995. – N 44. – P. 1249-1258.
156. Uysal, K.T. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function/ K.T. Uysal, S.M. Wiesbrock, M.W. Marino // *Nature*. – 1997. – Vol. 389(6651). – P. 610-614.
157. Van Heerden, F.R. *Hoodia gordonii*: a natural appetite suppressant/ F.R. Van Heerden // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2008. – Vol. 119. – P. 434-437.
158. Veerapur, V.P. Antidiabetic effect of *Ficus racemosa* Linn. stem bark in high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: a mechanistic study/ V.P. Veerapur, K.R. Prabhakar, B.S. Thippeswamy et al. // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 132. – P. 186-193.
159. Vereschagin, V.I. Useful Plants of the Western Siberia. Publishing of Academy of Sciences of the USSR/ V.I. Vereschagin, K.A. Sobolevskaya, A.I./Yakubova //Moscow-Leningrad. – 1959. – P. 15-16.
160. Viollet, B. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview/ B. Viollet, B. Guigas, N. Sanz Garcia // *Clinical science (London)*. – 2012. – Vol.122(6). – P. 253-270.
161. Wagner, H. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Part I/ H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich // *Phytomedicine*. – 2009. – Vol. 16. – P. 97-107.
162. Williams, G.M. Inhibition by dietary hydroquinone of acetylaminofluorene induction of initiation of rat liver carcinogenesis/ G.M. Williams, M.J. Latropoulos,

- A.M. Jeffrey // *Food and Chemical Toxicology*. – 2007. – Vol. 45. – P. 1620-1625.
163. Wood, R.D. DNA repair in eukaryotes / R.D. Wood // *Annu Rev Biochem.* – 1996. – Vol. 65. – P. 135-167.
164. Wood, Z.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling / Z.A. Wood, L.B. Poole, P.A. Karplus // *Sciences*. – 2003. – Vol. 300. – P. 650-653.
165. Xia, W. Hypolipidemic and antioxidant activities of Sanchi (*Radix Notoginseng*) in rats fed with a high fat diet/ W. Xia, C. Sun, Y. Zhao // *Phytomedicine*. – 2011. – N 18. – P. 516-520.
166. Xie, J.T. Ginseng berry reduces blood glucose and body weight in db/db mice/ J.T. Xie, Y.-P. Zhou, L. Dey // *Phytomedicine*. – 2002. – N 9. – P. 254-258.
167. Yang, R.L. Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index/ R.L. Yang, Y.H. Shi, G. Hao // *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. – 2008. – Vol. 43. – P. 154-158.
168. Yki-Jarvinen, H. Combination therapy with insulin in type 2 diabetes/ H. Yki-Jarvinen // *Diabetes Care*. – 2001. – N 24. – P. 758–67.
169. Yki-Jarvinen, H. Insulin therapy in type 2 diabetes: role of the long acting insulin glargin analogue/ H. Yki-Jarvinen // *European Journal of Clinical Investigation*– 2004. – N 34(6). – P. 410–416.
170. Yuri, K. S. Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats/ K. S. Yuri, H. O. Paula, Kleber Eduardo de Campos // *Associacao Médica Brasileira*. – 2014. – Vol. 2. – P. 1846-1851.
171. Zhang, Yu. Targeting adipocyte apoptosis: a novel strategy for obesitytherapy/ Yu. Zhang, C. Huang // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2012. – Vol. 417. – P. 1-4.
172. Zhang, Z.Y. PTP1B inhibitors as potential therapeutics in the treatment of type 2 diabetes and obesity/ Z.Y. Zhang, S.Y. Lee // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 2003. – Vol. 12. – P. 223-233.

173. Zhao, J. Chemical composition of the volatiles of three wild *Bergenia* species from western China/ J. Zhao, J. Liu, X. Zhang // Flavour and Fragrance Journal. – 2006. – Vol. 21. – P. 431-434.