

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Горбатюк Наталья Олеговна

**ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СУММЫ ТРИТЕРПЕНОВЫХ
КИСЛОТ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских

наук, доцент

Черников Максим Валентинович

ПЯТИГОРСК – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПОИСКУ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1 Современные представления о патогенезе атеросклероза.....	15
1.2 Медикаментозная гиполипидемическая терапия атеросклероза и ее осложнения	21
1.3 Поиск гиполипидемических препаратов растительного происхождения.	25
1.4 Биологическая активность тритерпеновых соединений и перспективы их использования в качестве гиполипидемических препаратов.....	31
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Материалы	36
2.1.1 Характеристика объектов исследования	36
2.1.2 Лабораторные животные.....	37
2.2 Методы.....	37
2.2.1 Определение «острой» токсичности субстанций	37
2.2.2 Первичная оценка гиполипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы	42
2.2.3 Изучение гиполипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы при алиментарной гиперлипидемии	43
2.2.4 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на некоторые показатели липидного и белкового обменов у интактных животных.....	45
2.2.5 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на желчеобразовательную и желчсекреторную функции печени у интактных животных.....	45

2.2.6 Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы	46
2.2.6.1 Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели острого экссудативного воспаления.....	46
2.2.6.2 Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели хронического аутоиммунного воспаления.....	46
2.2.7 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на всасывание холестерина	48
2.2.8 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на интенсивность липолиза в жировой ткани <i>in vivo</i>	48
2.2.9 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на липолитическую активность сыворотки крови лабораторных животных ...	48
2.2.10 Изучение влияния тритерпеноидов облепихи и тритерпеноидов клюквы на процессы свертывания в крови у животных и на фоне витаминной модели гиперлипидемии	49
2.2.11 Лабораторные методы исследования.....	50
2.2.11.1 Определение содержания триглицеридов в сыворотке крови и гомогенате печени.....	50
2.2.11.2 Определение общего холестерина в сыворотке крови и гомогенате печени.....	50
2.2.11.3 Определение содержания β - и пре- β -липопротеинов в сыворотке крови.....	51
2.2.11.4 Определение содержания холестерина α -липопротеинов сыворотки крови.....	51
2.2.11.5 Определение содержания холестерина β -липопротеинов сыворотки крови.....	52
2.2.11.6 Определение содержания общих липидов в сыворотке крови	52
2.2.11.7 Определение содержания фосфолипидов в печени	53

2.2.11.8 Определение содержания фосфолипидов в крови	53
2.2.11.9 Тимоловая проба сыворотки крови.....	53
2.2.11.10 Определение содержания общего белка в сыворотке крови и гомогенате печени.....	54
2.2.11.11 Определение содержания нуклеиновых кислот в печени	54
2.2.11.12 Определение содержания глюкозы в сыворотке крови	54
2.2.11.13 Определение интенсивности спонтанного гемолиза эритроцитов.	55
2.2.11.14 Определение содержания ТБК-активных продуктов в β - липопротеинах и пре- β -липопротеинах.....	55
2.2.11.15 Определение содержания свободного холестерина в крови	56
2.2.11.16 Определение содержания свободного глицерина в крови	56
2.2.11.17 Определение содержания свободных жирных кислот в крови.....	56
2.2.11.18 Определение содержания липазы в сыворотке крови.....	57
2.2.11.19 Оценка желчсекреторной функции печени	57
2.2.11.19.1 Определение скорости секреции желчи.....	57
2.2.11.19.2 Определение содержания холестерина и желчных кислот в желчи	58
2.2.12 Статистическая обработка результатов исследования.....	58

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУММЫ ТРИТЕРПЕНОИДОВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ	60
3.1. Результаты определения «острой» токсичности	60
3.2 Первичная оценка гипополипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы	65
3.3 Изучение гипополипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы при алиментарной гиперлипидемии	70
3.3.1 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на состояние липидного обмена при хронической алиментарной гиперлипидемии	70

3.3.2 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на состояние белкового и углеводного обмена при хронической алиментарной гиперлипидемии.....	76
3.4 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на показатели липидного и углеводного обменов при курсовом введении интактным животным	79
3.5 Заключение	83
ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МЕХАНИЗМОВ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОИДОВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ	86
4.1 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на желчеобразовательную и желчсекреторную функции печени у интактных животных.....	86
4.2 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на всасывание холестерина	89
4.3. Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот из плодов облепихи и клюквы на липолиз в жировой ткани лабораторных животных при курсовом введении	90
4.4 Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот из плодов облепихи и клюквы на липолитическую активность сыворотки крови лабораторных животных при курсовом введении	94
4.5 Заключение	97
ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕЙОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ СУММЫ ТРИТЕРПЕНОИДОВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ	99
5.1 Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы.....	99
5.1.1 Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели острого каррагенинового отека	99
5.1.2 Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели хронического воспаления	101

5.2 Изучение влияния ТО и ТК на состояние системы гемостаза здоровых животных и животных с экспериментальной гиперлипидемией.....	106
5.2.1 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у животных и на фоне алиментарной гиперлипидемии	106
5.2.2 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у животных и на фоне витаминной модели гиперлипидемии	109
5.2.3 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у здоровых животных.....	110
5.3 Изучение мембраностабилизирующей активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы и их влияние на интенсивность перекисного окисления липидов при алиментарной гиперлипидемии	117
5.4 Заключение	121
ГЛАВА 6 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	123
ВЫВОДЫ	145
Практические рекомендации.....	147
Список литературы.....	148

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКОД – ацил-коэнзим-А-оксидаза
АКС – ацил-коэнзим-А-синтетаза
АТФ – аденозинтрифосфат
ГК – глицеринкиназа
ГОД – глюкозооксидазы
ГФО – глицеринфосфатоксидаза
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИЛ – интерлейкины
КФК – концентрационный фотоэлектрический колориметр
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПЛ – липопротеинлипаза
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
МДА – малоновый диальдегид
ОХС – общий холестерин
ПОД – пероксидаза
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ТБК-активные продукты – продукты свободно-радикального окисления, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой
ТК – тритерпеноиды клюквы
ТО – тритерпеноиды облепихи
ТП – тимоловая проба
ТГ – триглицериды
ФЛ – фосфолипиды
ХО – холестериноксидаза
ХС – холестерин
ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности
ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности
ХС-ЛПОНП – холестерин липопротеинов очень низкой плотности
ХЭ – холестеринэстераза
цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
ТВHBA – 2,4,6,-трибром-3-окси-бензойная кислота
TODB–N,N-бис(4-сульфобутил)-3-метилаланин

ВВЕДЕНИЕ

Среди причин смертности населения в России, как и в большинстве развитых стран, ведущее место занимают сердечно-сосудистые заболевания и их осложнения. Показатели фатальных исходов болезней сердца и кровеносных сосудов среди мужчин и женщин трудоспособного возраста России – самые высокие в Европе [3, 81]. Несмотря на планомерную работу Российской медицинской ассоциации, которая позволила снизить смертность от данной группы заболеваний за последние 5 лет на 18%, в большей степени за счет лиц трудоспособного возраста, Россия в 2014 году от болезней системы кровообращения потеряла 940,5 тысяч человек, и на их долю приходилось 50% всех ненасильственных смертей [23]. В то же время, по имеющимся данным, в США в 2009 году на умерших от сердечно-сосудистых заболеваний приходилось 32,3% от общего количества смертей [162]. Одной из основных причин возникновения болезней системы кровообращения является атеросклеротическая модификация стенок кровеносных сосудов, которая к моменту проявления клинической симптоматики заболевания уже значительно выражена [12, 17, 80, 162].

Многочисленные экспериментальные, клинические и эпидемиологические исследования свидетельствуют, что одним из главных факторов риска развития атеросклероза являются нарушения обмена липидов. Патогенетической роли дислипидемий посвящено большое количество специальных исследований, подтверждающих убедительность липидно-инфильтрационной гипотезы развития атеросклероза. Эпидемиологические исследования показывают, что высокие уровни холестерина в сыворотке крови приводят к повышенному риску ишемической болезни сердца (ИБС), в то время как низкие уровни данного показателя соответствуют низкой частоте ИБС [203]. В соответствии с эпидемиологическими исследованиями данные рандомизированных клинических испытаний показывают, что уменьшение концентрации холестерина в сыворотке крови снижает риск развития ИБС и нарушений мозгового кровообращения [133, 151, 170, 202].

Профилактические действия, направленные на предотвращение развития атеросклеротических поражений сосудов и связанных с ними заболеваний, включают в себя немедикаментозное и медикаментозное устранение последствий факторов риска, влияющих на возникновение и течение атеросклероза; и влияние на ключевые патогенетические механизмы заболевания [33, 51, 71, 155, 162]. В настоящее время гиполипидемическая лекарственная терапия признаётся главным способом сдерживания развития атеросклероза и его осложнений. В этой связи гиполипидемические средства следует рассматривать и как антиатеросклеротические. В настоящее время для коррекции дислипидемий в основном используются синтетические лекарственные средства – статины, фибраты, секвестранты желчных кислот, ингибиторы всасывания холестерина, никотиновая кислота [162, 226]. Ряд возникающих побочных эффектов и осложнений, которые сопутствуют длительной гиполипидемической терапии, не всегда позволяют добиться ожидаемого эффекта и приводят к возникновению необходимости коррекции выбранной тактики лечения [151, 162, 172, 271].

Это делает целесообразным поиск новых активных соединений. Причем предпочтение следует отдавать веществам, обладающим полипотентностью [239], т.е. способностью действовать одновременно на различные звенья патогенеза атеросклероза, а не только на гиперлипидемию. Перспективными в этом отношении являются растительные объекты, для многих из которых экспериментально доказана гиполипидемическая и/или антисклеротическая активность [140].

В этом плане представляет интерес изучение тритерпеноидных соединений, выделенных из растительного сырья и обладающих широким спектром фармакологической активности, в том числе и гиполипидемическим действием [101, 103, 104, 134, 136, 181, 213, 214, 225, 230, 250, 263].

Степень разработанности проблемы

В последние годы растет интерес к препаратам растительного происхождения во всем мире. Растительные объекты могут оказаться перспективным источником для получения гиполипидемических препаратов или

могут быть применены в качестве компонентов диетического рациона, способного уменьшать выраженность дислипидемии [113, 159, 200, 206, 209, 219, 246, 285]. В ряде исследований доказана эффективность растительных тритерпеноидов в условиях гиперхолестеринемии [96, 230, 283], болеутоляющий эффект [104], антибактериальная, противогрибковая, противовирусная [103, 157, 160, 182], противовоспалительная [183, 187, 233] и антидиабетическая активность [96, 221, 280, 281], кардиопротекторное [229, 238], гепатопротекторное и противоопухолевое/цитотоксическое действие [64, 106, 112, 165, 263, 284]. Тритерпеноиды могут оказывать влияние на формирование иммунного ответа [61, 179, 180, 277]. Большая часть исследований гиполипидемической активности растительных препаратов проводится зарубежными учеными и в исследованиях чаще всего оценивается эффективность, и меньше внимания уделяется фармакодинамическим особенностям биологически активных соединений. Перспективными источниками, богатыми на содержание тритерпеновых кислот, являются плоды облепихи (*Hippophaë rhamnoides* L.) и клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.), для которых имеются данные о возможной гиполипидемической активности, но экспериментальных доказательств в настоящий момент времени недостаточно.

Цель исследования

Экспериментальное обоснование гиполипидемического действия суммы тритерпеновых кислот, полученных из шрота плодов облепихи и клюквы.

Задачи исследования

1. Оценить эффективность и установить эффективную дозу исследуемых субстанций:
 - на модели твиновой гиперлипидемии;
 - в условиях экспериментальной алиментарной гиперлипидемии.;
 - в условиях экспериментальной витаминной гиперлипидемии.
2. Выявить некоторые особенности механизма гиполипидемического и антиатеросклеротического действия исследуемых субстанций. Изучить влияние исследуемых субстанций на:

- состояние показателей углеводного, липидного, белкового обменов в норме;
- всасывание холестерина;
- липопротеинлипазную активность крови;
- интенсивность липолиза в тканях;
- интенсивность свободнорадикальных процессов в условиях экспериментальной гиперлипидемии;
- желчеобразовательную функцию печени;
- состояние свертывающей системы в норме и в условиях экспериментальной гиперлипидемии.

3. Изучить противовоспалительную активность исследуемых субстанций на моделях острого и хронического воспаления.

Новизна исследования

Впервые для суммы тритерпеновых кислот, выделенных из шрота плодов облепихи и клюквы:

- показана эффективность в условиях экспериментальной твиновой и алиментарной гиперлипидемии;
- установлено гиполипидемическое действие при курсовом введении здоровым животным и изучена динамика изменения показателей, характеризующих состояние липидного обмена;
- показано стимулирующее влияние на желчеобразовательную функцию печени;
- установлено, что курсовое 30-дневное введение тритерпеноидов облепихи (ТО) и тритерпеноидов клюквы (ТК) здоровым животным потенцирует постгепариновую липолитическую активность сыворотки крови;
- выявлены способность снижать интенсивность перекисного окисления на фоне алиментарной гиперлипидемии и мембранопротекторное действие.
- доказана противовоспалительная активность в условиях применения на моделях острого и хронического воспаления;

- показана способность устранять развивающийся дисбаланс свертывающей системы, спровоцированный атерогенной диетой (алиментарная гиперлипидемия), пероральным введением витамина D₂ и холестерина, оказывать нормализующее действие на продолжительность свертывания крови.

Научно-практическая ценность работы

Полученные результаты показали наличие выраженной гиполипидемической активности суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы при введении в условиях экспериментальной гиперлипидемии. В связи с чем возможно использование исследуемых субстанций для создания лекарственных препаратов для профилактики и лечения дислипидемий и ингибирования атерогенеза.

Реализация результатов

По результатам исследований разработано информационное письмо и получены акты внедрения от ЗАО «МФПДК «БИОТЭК» (акт от 27.05.2015 г.), ООО «Молекулярные технологии» (акт от 01.06.2015 г.). Получена экспертная оценка о возможности внедрения от ООО «Технология лекарств» (от 09.06.2015 г.).

Методология и методы исследования

В соответствии с поставленными задачами использованы современные информативные подходы. Исследование гиполипидемической активности и влияния на основные патогенетические механизмы атерогенеза проводилось в соответствии с утвержденным планом работы, стандартными операционными процедурами и требованиями нормативной документации:

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики";

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. (Хабриев Р.У, 2005, Миронов А.Н., 2012).

Положения, выносимые на защиту

1. Высокая эффективность тритерпеновых кислот, выделенных из шрота плодов облепихи и клюквы, установленная на моделях экспериментальной гиперлипидемии, позволяет рекомендовать их для создания лекарственных препаратов в целях профилактики и лечения дислипидемий и атеросклероза.

2. В механизме гиполипидемического действия исследуемых соединений существенное значение имеет их способность стимулировать элиминацию холестерина путем увеличения его использования для синтеза желчных кислот и потенцировать активность постгепариновой липопротеинлипазы крови.

3. Сумма тритерпеновых кислот, полученных из шрота облепихи и клюквы, обладает плеiotропными эффектами, которые могут способствовать повышению эффективности антиатерогенной терапии: снижение интенсивности свободно-радикальных процессов и мембранопротекторное действие, противовоспалительная активность и способность оказывать нормализующие влияние на измененные в условиях экспериментальной гиперлипидемии показатели состояния системы гемостаза.

Личный вклад

Автор провел детальное изучение имеющихся литературных данных по проблематике диссертации в отечественных и зарубежных источниках. Принимал активное участие в планировании эксперимента, разработке протокола и дизайна исследования, выполнении стандартных операционных процедур, выборе методов. Автором выполнена экспериментальная часть работы по изучению эффективности гиполипидемического действия исследуемых субстанций на моделях гиперлипидемии и изучению некоторых фармакодинамических аспектов действия. Автор провел статистическую обработку первичных данных, описание и интерпретацию полученных экспериментальных результатов, подготовил научные публикации по результатам работы.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокий уровень достоверности результатов работы подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, полученных в результате исследований, реализацией поставленных задач на высоком уровне, с использованием широкого набора современных инструментальных методов исследования и корректным использованием статистического аппарата анализа. Выводы работы логически вытекают из существа полученных результатов. Материалы исследования представлены на 68-й научной конференции по фармации, фармакологии и подготовке провизоров «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (22-23 января 2013 г., г. Пятигорск), 69-й научной конференции по фармации, фармакологии и подготовке провизоров «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (27-31 января 2014 г., г. Пятигорск), международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы в научной работе и образовательной деятельности» (30 мая 2015 г., г. Тамбов), III международной научно-практической конференция "Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук" (25 апреля 2016 г., Praha, Czech Republic), 74 открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (24 мая 2016 г., г. Пятигорск).

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, 5 из них – в российских рецензируемых научных журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикаций результатов диссертаций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 10 графических рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, глав описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов и научно-практических рекомендаций. Библиографический указатель содержит 86 отечественных и 203 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПОИСКУ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА

1.1 Современные представления о патогенезе атеросклероза

Атеросклероз представляет собой сложный, многоэтапный патологический процесс, поражающий внутреннюю оболочку (интиму) артерий. Интима содержит тонкую прослойку соединительной ткани и отграничена от мышечной оболочки артерии (медии) внутренней эластической мембраной, а от просвета сосуда – монослоем эндотелиальных клеток, образующих сплошную гладкую неадгезивную поверхность.

В настоящее время существуют гипотезы, описывающие механизмы возникновения и прогрессирования атеросклероза. Одной из самых аргументированных и доказанных является гипотеза «Ответ на повреждение», согласно которой атеросклеротический процесс возникает как ответная реакция на повреждение эндотелия сосудов. В соответствии с этой теорией выделяют четыре последовательных этапа: первый – дисфункция, повреждение эндотелия; второй – адгезия и диапедез моноцитов; третий – формирование пенистых клеток; четвертый – миграция и пролиферация гладкомышечных клеток сосудов [5, 47].

Однако экспериментальные данные последних лет, посвященные патофизиологии взаимодействия липопротеинов крови со стенкой сосуда, показали, что взаимодействие между аполипопротеинами и рецепторами клеток эндотелия происходит на более ранних этапах, чем повреждение эндотелия. Так возникла гипотеза «Ответ на удерживание частиц». При этом считают, что наиболее мелкие и атерогенные субфракции липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) могут свободно проникать через эндотелиальный барьер и накапливаться в субэндотелиальном пространстве. При минимальной степени окисления частицы воздействуют на эндотелий, вызывая экспрессию молекул межклеточной адгезии и молекул адгезии сосудистых клеток, моноцитарного колониестимулирующего фактора, тканевого фактора, моноцитарного

хемоаттрактивного протеина, активатора ингибитора плазминогена. Более существенное окисление ЛПНП приводит к выраженной модификации частиц и интенсивному захвату их макрофагами [47]. В любом случае развивающаяся дисфункция эндотелия играет существенную роль в формировании атеросклеротического процесса.

Эндотелий выполняет роль полунепроницаемой мембраны, которая, с одной стороны, является барьером между кровью и сосудистой стенкой, а с другой – обеспечивает двунаправленный транспорт веществ между ними. На эндотелиальном слое локализованы специализированные рецепторы, чувствительные к различным соединениям, в частности, к ЛПНП [31, 50]. Эндотелиальные клетки образуют ряд вазоактивных соединений, в том числе эндотелий-зависимый фактор релаксации (окись азота) и простациклин, играющие немаловажную роль в регуляции функциональной активности сосудов [1].

Многие из факторов риска атеросклероза (курение, гиперлипидемия, ожирение, хронические системные инфекции, повышенная концентрация С-реактивного белка, гемодинамические факторы и т.д.) ассоциированы с дисфункцией эндотелия [153, 231, 243]. Дисфункциональные расстройства эндотелия представляют собой комплексную проблему, включающую в себя нарушения синтеза и уменьшение биодоступности вазодилататоров и повышение выброса вазоконстрикторов, таких как, например, эндотелин [116]. Дисфункция эндотелия сопровождается нарушением тонуса сосудов, модуляцией процессов воспаления, пролиферации, работы свертывающей и противосвертывающей систем, что и определяет его участие на всех этапах развития атеросклероза [93, 248]. За дисфункцией эндотелия следует инфильтрация внутренней оболочки кровеносных сосудов циркулирующими моноцитами, которые после трансформируются в макрофаги, поглощающие окисленные липопротеиды низкой плотности с их последующей деструкцией. Это приводит к накоплению в макрофагах эфиров холестерина с последующим их превращением в пенистые клетки, которые дают начало липидным полоскам. Макрофаги секретируют ряд

сигнальных молекул, стимулирующих переход из меди в интиму гладкомышечных клеток и фибробластов, и как следствие интенсификацию синтеза соединительнотканых структур [54, 58].

Многочисленные экспериментальные, клинические и эпидемиологические исследования свидетельствуют, что одним из главных факторов риска развития атеросклероза являются нарушения обмена липидов. Патогенетической роли дислипидемий посвящено большое количество специальных исследований, подтверждающих убедительность липидно-инфильтрационной гипотезы развития атеросклероза. Эпидемиологические исследования показывают, что высокие уровни ХС в сыворотке приводят к повышенному риску ишемической болезни сердца, в то время как низкие уровни коррелируют с низкой частотой ИБС [203]. В соответствии с эпидемиологическими исследованиями, данные рандомизированных клинических испытаний показывают, что снижение концентрации ХС в сыворотке крови снижает риск развития ишемической болезни сердца и нарушений мозгового кровообращения [133, 151, 170, 202].

Гиперхолестеринемия сопровождается и структурными изменениями эндотелия: увеличение доли ХС и значения, показывающего соотношение уровня холестерина и фосфолипидов в мембране эндотелия; и как следствие, расстройством барьерной функции эндотелия [14, 26, 45]. В результате возникает избыточная инфильтрация интимы ЛПНП [76, 91]. Следует отметить, что проходящие через эндотелий ЛПНП подвергаются окисленной деструкции, и в интиме преимущественно накапливаются окисленные ЛПНП, которые оказывают повреждающее воздействие на сосудистую стенку [256].

Несмотря на наличие определенных корреляций уровня ХС и степени атеросклеротического поражения сосудов и, соответственно, манифестации клинической картины атеросклероза в различных проявлениях, имеются данные о возможности возникновения ИБС вследствие атеросклероза коронарных артерий у лиц с нормальным уровнем общего холестерина (ОХС) (примерно 1/3 пациентов). Это объясняется несколькими причинами. Во-первых, в процессе эволюции у человека сформировался определенный тип обмена липидов с

«избыточным» уровнем ХС, то есть нормальный уровень ХС является потенциально опасным при наличии других факторов риска. Достаточным для нормальной жизнедеятельности является значительно более низкий уровень ХС, чем он присутствует в норме. Во-вторых, уменьшение в крови концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП) также имеет существенное значение в развитии атеросклероза. В-третьих, формирование повышенной атерогенности холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), даже при нормальных значениях его концентрации. Это связано с неоднородностью ЛПНП и увеличением фракции более атерогенных (маленькие, плотные, низкое сродство к рецепторам, увеличенное время нахождения в плазме). В-четвертых, высокий уровень триглицеридов (ТГ). Таким образом, установлено, что не только гиперлипидемия (гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия), но и дислипидемия, а именно: изменение соотношения отдельных фракций липопротеинов крови могут играть существенную роль в процессе атерогенеза [9, 36, 40, 47].

В последнее время появилось множество доводов в пользу воспалительной теории атерогенеза. Изменения, присущие местной воспалительной реакции, характерны для всех стадий атеросклероза [196, 198, 207, 218]. Атеросклероз – это хроническое иммуновоспалительное заболевание, протекающее с участием иммунцитов, медиаторов воспалительного процесса и иммунологических реакций. Проникающие в интиму моноциты превращаются в макрофаги под влиянием ряда биологически активных веществ, в том числе синтезируемых эндотелием [216]. Часть макрофагов не модифицируется в пенистые клетки и активно секретирует провоспалительные медиаторы (фактор некроза опухолей, интерлейкины, хемоаттрактанты). Макрофаги и тучные клетки выделяют факторы пролиферации гладкомышечных клеток и регулируют рост фиброатеромы [196, 218]. Воспалительная теория теснейшим образом связана и дополняет гипотезу «Ответ на повреждение» – повреждение эндотелия сосудов под действием различных факторов проявляется в виде стандартной реакции воспаления.

Ведущая роль в реализации межклеточных коммуникаций в условиях атеросклеротического иммунного воспаления принадлежит цитокинам. Цитокины состоят из более чем 50 секретируемых факторов, которые регулируют основные биологические процессы, включая рост тела, период лактации, ожирение, и гемопоэз [117]. Цитокины сгруппированы в несколько классов: интерлейкины (ИЛ) (33 установлены на сегодняшний день), факторы некроза опухоли ($-\alpha$, $-\beta$), интерфероны, колониестимулирующие факторы, трансформирующие факторы роста и хемокины. Все перечисленные классы участвуют в атерогенезе. Из медиаторов межлейкоцитарного взаимодействия наибольшее значение при атеросклерозе имеют ИЛ-1, ИЛ-6, фактор некроза опухоли- α [270].

Атеросклероз сопровождается нарушениями иммунологических показателей: ростом активности гуморального звена иммунитета на фоне дефицита Т-клеточного звена. На фоне гиперфункции В-клеток отмечается высокий уровень в крови циркулирующих иммунных комплексов и иммуноглобулинов, а так же уменьшение доли Т-клеток в крови [37, 41].

Не маловажное значение в развитии атеросклероза играют аутоиммунные комплексы липопротеинов и антител [60, 111]. Имеется ряд антигенных стимулов, которые связаны с патогенезом атеросклероза. Хотя большинство антигенных стимулов, которые локализованы в атеросклеротических бляшках, приходят из модифицированных эндогенных молекулярных комплексов, иммунный ответ очень похож на воспалительные реакции против микроорганизмов [212, 287]. К наиболее изученным эндогенным и экзогенным антигенам, участвующим в атерогенезе, относятся следующие: аутоантигены – окисленные ЛПНП [90, 178, 204], бета-2-гликопротеин [89, 158, 194], липопротеин (а) [108], липопротеинлипаза (ЛПЛ) [102], белки теплового шока [130, 201], коллаген [131, 254, 274], фибриноген [205]; микробные антигены – *Porphyromonas gingivalis* [258], *Chlamydia pneumonia* [65, 121, 125, 126, 171], *Bacteroides forsyntus* [189], *Streptococcus mutans* [137], *Helicobacter pylori* [94, 129], *Escherichia coli* [154], *Cytomegalovirus* [88, 141], *Herpes simplex* [138, 139].

Одним из факторов стимуляции атерогенеза является усиление процессов перекисидации. Так впервые информация о возможности накопления перекисных продуктов в атеросклеротических бляшках была опубликована J. Glavind и соавт. в 1952 году. Авторы считали, что окислительно модифицированные молекулы липидов способны оказывать цитотоксическое влияние на стенку кровеносных сосудов и потенцировать атерогенез [22]. В дальнейшем рядом авторов было установлено, что интенсификация неспецифического контакта атерогенных липопротеинов с биомембранами связана с их структурной перестройкой, сопровождающейся конформационными изменениями аполипопротеинов. Факторами, вызывающими модификацию, являются активация процессов перекисного окисления липидов и избыточная продукция перекисных соединений [4, 55, 58, 235, 249, 260]. Основными модифицирующими факторами являются вторичные продукты ПОЛ – в частности, малоновый диальдегид (МДА) [278]. Подтверждением существенной роли перекисидации в процессе атерогенеза является положительная корреляция между липидными показателями и уровнем перекисных соединений в крови и стенках кровеносных сосудов [6, 227].

Образующиеся перекисные соединения блокируют гликолиз и аэробное окисление в клетках [4]. Окисленные ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов (ФЛ), триглицеридов (ТГ) и эфиров ХС атерогенных ЛПНП способствуют формированию более полярных ФЛ, стимулирующих макрофаги и ряд факторов повреждения стенки сосудов [124].

Микроциркуляторные и гемореологические изменения регистрируются уже на начальных стадиях дислипидемических расстройств. Их своевременное медикаментозное устранение является эффективным профилактическим мероприятием, направленным на предотвращение развития атеросклероза [11, 12, 67].

Результаты многочисленных экспериментальных, патоморфологических и клинических исследований убедительно продемонстрировали, что в основе прогрессирования атеросклероза и возникновения его наиболее грозных осложнений лежит повреждение атеросклеротической бляшки с разрывами ее

поверхности и формированием внутрисосудистого тромбоза (атеротромбоз) [78]. В связи с чем терапия антиагрегантами и антикоагулянтами является оправданным способом вторичной профилактики сердечно-сосудистых осложнений [40, 50, 224, 249, 272].

1.2 Медикаментозная гиполипидемическая терапия атеросклероза и ее осложнения

Дислипидемические изменения это один из немногих механизмов атерогенеза, на который в данный момент времени медицина может реально оказывать влияние [13]. Особое значение в патогенезе атеросклероза имеет нарушение метаболизма липидов, в первую очередь ХС [161]. С помощью гиполипидемической и, прежде всего, гипохолестеринемической терапии можно добиться следующего:

- профилактики атеросклероза, если лечение проводится в детском возрасте при наличии семейных форм гиперлипидемии;
- задержки дальнейшего развития атеросклеротических поражений артерий;
- удаления ХС из бляшек, что делает их менее опасными в смысле образования на их поверхности тромбов;
- частичной или значительной регрессии атеросклеротических поражений [33].

В настоящее время для профилактики и лечения атеросклероза и его осложнений применяют следующие группы препаратов [30, 34, 42, 75, 162]:

1. Статины конкурентно ингибируют 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазу – фермент, играющий ключевую роль в биосинтезе ХС. В результате снижается концентрация ХС в гепатоцитах, что способствует экспрессии рецепторов к ЛПНП в печени. Препараты статинов являются довольно безопасными средствами [228]. Тем не менее при всех положительных эффектах терапия статинами может сопровождаться развитием побочных эффектов. Это выражается в повышении уровня трансаминаз, миопатии [22, 29, 84, 146, 191]. Около 10% больных, проходящих терапию статинами, жалуются на миалгию, миастению, что иногда приводит к отказу от применения статинов и

необходимости замены на другие гиполипидемические препараты [147]. Повышение активности трансаминаз не является признаком гепатотоксичности, но в случае развития гиперферментемии может потребоваться исследование состояния печени [109]. Имеются данные о способности статинов индуцировать развитие сахарного диабета [251]. Риск развития сахарного диабета является незначительным, и возможность его проявления свойственна пациентам с пограничными диабетическими состояниями. У ряда пациентов отмечены нарушения когнитивной функции [253].

2. Фибраты (фенофибрат, ципрофибрат). Основной механизм действия фибратов связан с увеличением активности ЛПЛ и, как следствие, – снижением уровня ТГ в плазме. Кроме того, фибраты ингибируют синтез ХС в печени. При использовании этой группы препаратов возможно развитие следующих нежелательных побочных эффектов: нарушения в работе желудочно-кишечного тракта, миалгии и т.д. Длительный прием фибратов может привести к формированию внутрипеченочного холестаза [40, 58, 259].

3. Секвестранты желчных кислот (холестирамин, колестипол, вазозан). Эти препараты являются анионообменными смолами, не всасываются из кишечника и связывают желчные кислоты, препятствуя их реабсорбции. Это приводит к усилению синтеза желчных кислот в печени с использованием ХС. Прием препаратов данной фармакологической группы может привести к развитию следующих побочных эффектов: нарушению всасывания жирорастворимых витаминов и ряда лекарственных препаратов, запорам, диспепсии, увеличению концентрации ТГ в плазме, снижению эффективности с течением времени [6, 40, 85].

4. Антиоксиданты (пробукол) активируют нерецепторный путь удаления ХС-ЛПНП; проявляют антиоксидантное действие, предотвращая ПОЛ; активируют обратный транспорт ХС. Однако они обладают сравнительно слабой гиполипидемической активностью, преимущественно влияя на концентрацию ХС-ЛПНП [49].

5. Никотиновая кислота ингибирует в печени диацилглицеролацилтрансферазу-2, уменьшая секрецию ЛПОНП, тем самым приводя к снижению ЛПВП и ЛПНП, ингибирует мобилизацию липидов из жировой ткани и способствует увеличению ХС-ЛПВП [195]. При использовании в дозе 2 г уменьшается концентрация ТГ на 20-40%, ХС-ЛПНП на 15-18% и отмечается рост концентрации ХС-ЛПВП на 15-35% [195]. Данные о применении никотиновой кислоты в качестве гиполипидемического средства довольно ограничены [119]. В нескольких крупных клинических исследованиях установлено увеличение эффективности противосклеротической терапии при использовании комбинации статинов с никотиновой кислотой [149]. В клинической практике встречаются кожные реакции, гиперурикемия препятствует возможности длительного применения никотиновой кислоты.

6. Средства, блокирующие обратный транспорт ХС из тонкого кишечника на уровне клеточной стенки эпителия кишечника (эзетимиб) [20, 48]. Эзетимиб – первый лекарственный препарат, селективно ингибирующий абсорбцию ХС и не влияющий на всасывание других жирорастворимых соединений. Взаимодействуя с белком NPC1L1, эзетимиб блокирует всасывание ХС на уровне ворсинчатой каймы кишечника. Далее развивающиеся эффекты похожи на реакцию от приема сесквестрантов желчных кислот – активация на поверхности гепатоцитов рецепторов ЛПНП и, как следствие, снижение их концентрации в крови. Клинические данные свидетельствуют об уменьшении концентрации ХС-ЛПНП при приеме эзетимиба на 15-22%. Комбинированная терапия со статинами более эффективна, чем монотерапия статинами или эзетимибом [257]. Не сообщалось о развитии серьезных нежелательных явлений при приеме эзетимиба. Чаще всего из побочных явлений следует отметить рост уровня трансаминаз печени и миалгии.

В подавляющем большинстве случаев грамотная комбинированная терапия позволяет корректировать нарушенные показатели липидного обмена, однако в ситуациях, когда терапевтические методы воздействия на гиперлипидемию малоэффективны или плохо переносятся пациентом, возможно использование радикальных методов. Одним из возможных является экстракорпоральное

удаление липопротеинов. Одним из современных методов коррекции тяжелых дислипидемий является ЛПНП-аферез, представляющий собой иммуноадсорбционный способ удаления атерогенных липопротеинов из плазмы крови [66].

Перспективными для терапии атеросклероза являются принципиально новые подходы генной терапии дислипидемических состояний [33].

Обобщая все вышеизложенное, можно сказать, что в развитие атеросклероза и атеротромбоза, т.е. морфологических поражений, затрудняющих и перекрывающих кровотоки в артериях жизненно важных органов, вовлечены многие ткани и системы организма человека: эндотелий, гладкомышечные клетки, макрофаги, превращающиеся в пенистые клетки, клетки крови, в первую очередь тромбоциты и моноциты, липопротеины плазмы крови, синтезирующиеся из липидных и белковых компонентов в печени и кишечнике. При развитии атеросклеротического повреждения артериальной стенки происходят каскады ферментативных реакций взаимопревращения веществ. А витамины и микроэлементы в большинстве своем являются кофакторами этих реакций, поэтому недостаток витаминов хоть и не является видимой причиной таких заболеваний, как атеросклероз, но вполне резонно предположить, что восполнение дефицита витаминов может и должно лежать в основе построения любой антиатеросклеротической терапии [35, 242].

Определенное место в профилактике и лечении гиперлипидемии, а соответственно и атеросклероза, занимают и такие виды терапии, как снижение избыточной массы тела при ожирении [66], соблюдение диеты с низким содержанием жиров и употребление продуктов с полиненасыщенными омега-3 жирными кислотами, обладающими антиатерогенными свойствами; санаторно-курортное лечение [5], а также применение растительных лечебно-профилактических средств (полиспонин, трибуспонин и различные БАД) [24].

Несмотря на многообразие гиполипидемических средств, проблема поиска новых лекарственных препаратов указанного действия остается достаточно

актуальной, так как ни одно из имеющихся средств полностью не удовлетворяет требованиям практической медицины.

1.3 Поиск гиполипидемических препаратов растительного происхождения

В последние годы растет интерес к препаратам растительного происхождения во всем мире. Растительные объекты могут оказаться перспективными источником для получения гиполипидемических соединений или могут быть применены в качестве компонентов диетического рациона, способного уменьшать выраженность дислипидемии. Исследования показывают, что более 1000 растений, используемых в традиционной медицине по всему миру, могут влиять на липидный спектр крови. Обработка литературы, представленной в иностранных источниках, позволила получить информацию о недавних исследованиях, проводимых в этой области по оценке эффективности растительных объектов в условиях первичных и вторичных дислипидемий.

Учеными установлено, что серосодержащая аминокислота, выделенная из лука (*Allium sera* Linn.) обладает антидиабетическими и гиполипидемическими эффектами. Ежедневное введение в дозе 200 мг/кг массы тела в течение 45 дней крысам с алоксановым диабетом позволило контролировать уровень глюкозы и липидов в крови и тканях, нормализовало в печени активность гексокиназы, глюкозо-6-фосфатазы и гидроксиметилглутарилредуктазы [200].

Ряд исследований, проводимых на животных, и регистрация ряда биохимических показателей после приема человеком в пищу чеснока (*Allium sativum* Linn.) показали, что он может снизить степень влияния множества факторов риска, которые играют решающую роль в возникновении и прогрессировании атеросклероза, включая уменьшение содержания ОХС, ХС-ЛПНП, ТГ и концентрации фибриногена в сыворотке крови [110].

Водная вытяжка сельдерея пахучего (*Apium graveolens* Linn.) значительно снижает уровень ОХС и ХС-ЛПНП у крыс, находящихся на диете с высоким содержанием жиров в течение двух месяцев. Вытяжка проявляет гипотензивное действие [206].

Использование спаржи (*Asparagus racemosus*) в качестве кормовой добавки (5% от веса корма) для животных привело к снижению общих липидов (29%), ОХС (29%), ТГ (39%), ХС-ЛПНП (33%), ЛПОНП (39%), индекса атерогенности (37%) и повышению ХС-ЛПВП. Увеличение ее до 10% в рационе сопровождалось дальнейшим уменьшением концентрации в крови общих липидов (64%), ОХС (38%), ТГ (52%), ХС-ЛПНП (44%), ЛПОНП (52%) и индекса атерогенности (49%) [285].

Спиртовые и водные экстракты баухинии пестрой (*Bauhinia variegata* Linn) эффективно снижают уровень ХС в плазме, ТГ, ЛПНП и ЛПОНП и повышают уровень ЛПВП плазмы у крыс с экспериментальной тритоновой дислипидемией [246].

Из ацетонового экстракта листьев акации желтой (*Cassia glauca* Lam.) хроматографически выделенное индивидуальное соединение с тривиальным названием Сg-1, которое эффективно нивелировало вторичную гиперхолестеринемию, сформировавшуюся на фоне модели стрептозоцинового сахарного диабета [219].

Водный экстракт эмбелии кислой (*Embelia ribes* Burm) при введении в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг в течение 30 дней устраняет последствия метиониновой интоксикации, снижая уровни гомоцистеина, лактатдегидрогеназы, ОХС, ТГ, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП и увеличивая ХС-ЛПВП в сыворотке крови [113].

Экстракт из листьев моринги масличной (*Moringa oliefera* Lam.) уменьшает уровень ХС в крови, печени и почках у крыс, находящихся на гиперхолестеринемической диете [159].

Гиполипидемическое действие филлантуса (*Phyllanthus niruri* L.) было изучено на тритониндуцированной и алиментарной холестериновой гиперлипидемии крыс. Липиды сыворотки крови были снижены после перорального введения экстракта (250 мг/кг) на тритоновой модели. Длительное введение экстракта (100 мг/кг) животным совместно с ежедневным скармливанием ХС (25 мг/кг) привело к снижению уровня общих липидов, ЛПОНП и ЛПНП у экспериментальных животных. Механизм действия данного

экстракта опосредуется через ингибирование печеночного биосинтеза ХС, увеличение фекальной экскреции желчных кислот и активности плазменной лецитинхолестеринацилтрансферазы [197].

Водный экстракт другого вида филлантуса (*Phyllanthus reticulatus* Hook f non Linn.) (250 мг/кг и 500 мг/кг) существенно снижает уровень ТГ, ХС-ЛПОНП, ОХС, ХС-ЛПНП и окислительного стресса через 45 дней введения совместно с атерогенной диетой [217].

Спиртовой экстракт из надземной части одной из разновидностей салвадоры (*Salvadora oleoides* Linn.) способствует существенному снижению в крови глюкозы, а также оказывает положительное влияние на липидный профиль при аллоксан-индуцированном сахарном диабете у крыс в конце периода лечения (21 день) [173].

Восьминедельное введение комплекса флавоноидов надземной части чабера садового (*Satureja hortensis* Linn) совместно с ХС кроликам значительно ослабляло подъем ХС в сыворотке крови, по сравнению с контрольной группой [185].

Возможный защитный эффект экстракта плодов паслена черного (*Solanum nigrum* Linn.) был исследован на модели этанол-индуцированной токсичности у крыс. Экспериментальные животные находились в состоянии алкогольного опьянения (7,9 г/кг/день) в течение 30 дней. Экстракт назначался в дозе 250 мг/кг массы тела параллельно с этанолом. Введение экстракта привело к улучшению антиоксидантного статуса и нормализации липидного профиля. Эти изменения были сопоставимы с эффектами препарата сравнения силимарина (25 мг/ кг массы тела) [105].

Спиртовое извлечение из коры терминалии (*Terminalia arjuna* Rob.) значительно повышает время лизиса эритроцитов, удлиняет протромбиновое время и снижает в сыворотке крови уровень ХС у пациентов с ИБС. Порошок коры понижает систолическое артериальное давление и индекс массы тела, снижает уровень циркулирующих катехоламинов и повышает концентрацию в крови ХС-ЛПВП. Таким образом защищает сосуды от катехоламиновой агрессии и препятствует их негативному влиянию на липидный обмен [142].

Был исследован этанольный экстракт из обезжиренных семян пажитника сенного (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) Исследования *in vitro* показали, что этанольный экстракт обладал способностью ингибировать таурохолевую и дезоксихолевую кислоты, и эта способность была дозозависимой. В двух отдельных экспериментах введение экстракта крысам с экспериментальной гиперхолестеринемией по 30 мг/кг или 50 мг/кг в течение 4-недельного периода вызвало снижение уровня ХС в плазме крови (18%-26%) и тенденцию к снижению концентрации ХС в печени. Предположительно механизм действия экстракта аналогичен эффектам секвестрантов желчных кислот [264].

Установлено, что сок свежей травы мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* Linn.) вызывает дозозависимое достоверное снижение уровня ОХС, ТГ, ХС-ЛПНП и ХС-ЛПОНП в крови у здоровых животных по сравнению с контролем [144].

Исследована активность растения спермакоце (*Spermacoce hispida*) на модели тритоновой дислипидемии. Крысам с индуцированной гиперлипидемией вводили перорально этанольный экстракт в дозе 200 мг/кг массы. После приема экстракта спермакоце отмечено значительное снижение уровня ХС, ФЛ, ТГ, ЛПНП, ЛПОНП и значительное повышение уровня ЛПВП в сыворотке крови, по сравнению с нелечеными животными [101].

Изучение гиполипидемической активности густого экстракта лука медвежьего на твиновой модели гиперлипидемии у крыс показало, что введение экстракта в дозе 200 мг/кг оказывает нормализующее влияние на состояние показателей липидного обмена в крови, проявляется отчетливый гипохолестеринемический эффект, сопоставимый с препаратом сравнения фенофибратом («Трайкор») [32].

Водный и этанольный экстракты индийской крапивы (*Acalypha indica* Linn.) улучшают липидный профиль сыворотки крови у крыс, находящихся на атерогенной диете, снижая ОХС, ТГ, ХС-ЛПНП и повышая ХС-ЛПВП, таким образом, улучшая значения индекса атерогенности [247].

Учеными были исследованы эфирные, хлороформные, этанольные и водные экстракты листьев понгамии перистой (*Pongamia pinnata*) на тритоновой

гиперлипидемии и при диетическом атерогенезе. Хлороформный экстракт показал наибольший эффект, значительно снижая уровень липидов в сыворотке крови: ОХС, ТГ, ЛПНП, ЛПОНП и увеличение ЛПВП у крыс на обеих моделях [261].

Манго (*Mangifera indica* L.) традиционно используется как антидиабетическое, антиоксидантное, противовирусное, кардиотоническое, гипотензивное, противовоспалительное, антибактериальное, антигрибковое, глистогонное, антипаразитарное, противоопухолевое, спазмолитическое, жаропонижающее, антидиарейное, противоаллергическое, иммуномодулирующее, гиполипидемическое, гепатопротекторное, гастропротекторное средство в традиционной индийской медицине. Экспериментальное исследование показало, что введение водного экстракта листьев манго крысам на высокохолестериновой диете достоверно снизило содержание ОХС сыворотки, ТГ, ЛПНП, ЛПОНП [99].

Четыре полисахаридных фракции (FMPS1, FMPS2, FMPS3 и FMPS4) фортунеллы (*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle), изолированные с помощью колоночной хроматографии, обладают гиполипидемической активностью, зависящей от состава моносахаридов, гликозидных связей, молекулярной массы и конформации цепи [79, 193].

Растение традиционной китайской медицины аралия (*Aralia taibaiensis*) давно используется народной медициной Китая для лечения травматических повреждений, ревматической артралгии, нефрита, отеков, гепатита и сахарного диабета. Выполнено исследование сахароснижающей, гиполипидемической и антиоксидантной деятельности сапонинов, на крысах с диабетом второго типа. По сравнению с диабетической контрольной группой, введение сапонинов в дозе 320 мг/кг сопровождалось значительным падением уровня глюкозы крови натощак, гликозилированного гемоглобина, креатинина, мочевины, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, ОХС, ТГ, ХС-ЛПНП и МДА, достоверному повышению уровня инсулина в сыворотке крови, супероксиддисмутазы и восстановленного глутатиона. Введение сапонинов здоровым животным не вызывает данных изменений [97].

Водный экстракт зантоксилума (*Zanthoxylum heitzii*) (225 мг/кг, 300 мг/кг и 375 мг/кг), вводимый крысам, находящимся на гиперхолестеринемической диете, препятствует атеросклеротическому поражению аорты, увеличению ОХС и ТГ, ЛПНП и ЛПОНП [177].

Листья фикуса (*Ficus glumosa*) на севере Камеруна используются для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, в качестве еды и в качестве стимулятора для производства молока у женщин и животных. Введение водного экстракта в течение 4 недель наряду с холестериновой диетой предотвратило значительное повышение ОХС, ХС-ЛПНП, ХС-ЛПОНП в крови, а в печени и аорте – ТГ и ОХС [175].

Метанольный экстракт листьев бетель (*Piper betel*) показал выраженную гипополипидемическую активность при пероральном введении белым беспородным крысам в дозе 250 мг/кг массы тела на фоне алиментарной нагрузки липидами [174].

Лотос орехоносный (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) используется для лечения гиперлипидемии, гипергликемии и ожирения. Биохимические исследования *in vitro* показали, что флавоноиды лотоса ингибируют активность свиной панкреатической липазы, α -амилазы и α -глюкозидазы. Кроме того, флавоноиды после введения животным значительно снижали уровень липидных компонентов: ОХС, ТГ, ХС-ЛПНП [186].

Гипополипидемический и антигиперлипидемический эффекты водного экстракта пахиптеры (*Pachyptera hymenaea*) были изучены после введения здоровым животным и животным с дието-индуцированной гиперлипидемией в течение 28 дней. Пероральный прием дозы в 200 мг/кг/день, выражался значительным снижением у здоровых животных в плазме ХС-ЛПНП, ТГ и ОХС на 44,0%, 27,9% и 28,1% соответственно, по сравнению с крысами интактной группы. Введение 400 мг/кг/день крысам с воспроизведенной гиперлипидемией, привело к снижению в плазме крови ОХС, ХС-ЛПНП и ТГ, на 66,1%, 60,0% и 57,6% соответственно. Эти эффекты были соизмеримы с эффектом аторвастатина [176].

Таким образом, в последнее время проводится огромная работа по скринингу значительной массы растительных объектов с целью выявления способных оказывать нормализующее влияние на показатели липидного обмена. Исследования демонстрируют, что биологически активные соединения (как индивидуальные, так и многокомпонентные извлечения), выделенные из растений, зачастую с гиполипидемической активностью обладают и другими фармакологическими эффектами [82, 215, 276]. Анализ литературных данных последних лет показал, что подавляющее большинство таких исследований проводится зарубежными учеными.

1.4 Биологическая активность тритерпеновых соединений и перспективы их использования в качестве гиполипидемических препаратов

Терпеноиды являются активными метаболитами, образующимися преимущественно в растительных клетках и выполняющие в основном защитные функции [62].

Растительные тритерпеноиды, как ни один другой класс соединений, обладают широчайшим спектром активности. В ряде исследований доказана их эффективность в условиях гиперхолестеринемии [96, 230, 283], болеутоляющий эффект [104], активность антибактериальная, противогрибковая, противовирусная [103, 157, 160, 182], противовоспалительная [183, 187, 233] и антидиабетическая [96, 221, 280, 281]; кардиопротекторное [229, 238], гепатопротекторное и противоопухолевое/цитотоксическое действие [64, 106, 112, 165, 263, 284]. Тритерпеноиды могут оказывать влияние на формирование иммунного ответа [61, 179, 180, 277]. Причем, они способны не только модулировать характер иммунных реакций, но и противостоять формированию вторичных иммунодефицитов [61].

Довольно хорошо изучено противовоспалительное действие ряда представителей тритерпеноидов. Ключевыми моментами в механизме этого действия данных соединений является их мембранопротекторные (повышение плотности упаковки ФЛ в мембранах за счет лиофильности) свойства [77] и влияние на высвобождение медиаторов воспаления. Тритерпеноиды способны

блокировать липооксигиназные и циклооксигиназные механизмы синтеза воспалительных медиаторов [183, 233], снижать продукцию сериновых протеиназ [187] и металлопротеиназ [87], уменьшать выраженность хемотаксиса иммунцитов [100], степень участия системы комплемента в воспалительном процессе [234] и выделение провоспалительного интерлейкина (ИЛ-1) [232]. Также противовоспалительную активность тритерпеноидов связывают с их стероидоподобным действием [190].

Большое количество исследований посвящено противоопухолевому действию тритерпеноидов [112, 263]. Они способны ингибировать ДНК-модулирующие ферменты [134, 136, 184, 275], протеинкиназы C, уменьшая степень фосфорилирования антиапоптотического белка Bcl-XL [122, 148]. Имеются данные о возможности тритерпеноидов повышать чувствительность опухолевых клеток к химиотерапии [250].

Изучение гепатопротекторной активности тритерпеноидов выполнялось в условиях моделирования экспериментальных токсических повреждений печени различными химическими агентами [64, 83, 106, 165]. В качестве одного из основных механизмов гепатопротекторного действия веществ рассматривается их способность влиять на составляющие про-антиоксидантного равновесия, которое на фоне интоксикации гепатотропными ядами практически всегда смещается в сторону прооксидации. Тритерпеноиды в условиях экспериментальных гепатопатий снижают активность ПОЛ [168, 169, 220, 240, 279].

В исследуемых объектах (сумма тритерпеновых кислот облепихи и сумма тритерпеновых кислот клюквы) до 75% приходится на олеаноловую и урсоловую кислоты. В доступных литературных источниках имеется ряд публикаций об экспериментальных исследованиях активности данных индивидуальных тритерпеноидов.

Олеаноловая и урсоловая кислоты – это тритерпеновые соединения, широко распространенные в пищевых продуктах, лекарственных травах и других растениях, это низко токсичные соединения, которые используются в косметологии и биологически активных добавках.

В настоящее время изучена активность более чем 120 растительных источников, основным биологически активным соединением которых является олеаноловая кислота [282]. Гепатопротекторный эффект ее впервые был зарегистрирован в 1975 году в исследовании растения традиционной китайской медицины *Swertia mileensis* [289]. Один из трех компонентов, выделенных из этого растения, – олеаноловая кислота, является наиболее эффективной защитой от тетрахлорметанового поражения у крыс. С тех пор для нее были дополнительно продемонстрированы возможности предотвращения CCl_4 -индуцированного гепатонекроза, жирового гепатоза и дистрофии [266], а также хронического цирроза, вызываемого сочетанным введением этанола и тетрахлорметана [273]. Олеаноловая кислота защищает печень от повреждения не только тетрахлорметаном, но и ацетаминофеном, кадмием, галактозамином [211, 237, 245]. Однако, не всегда эффективна в плане снижения гепатотоксичности этилового спирта и диметилнитрозамина [210]. Урсоловая кислота также проявила гепатопротекторную активность в ряде исследований с экспериментальными гепатопатиями [156, 167]. После положительных результатов, достигнутых в клинических исследованиях, олеаноловая кислота успешно используется в Китае как препарат для лечения заболеваний печени у человека [166, 286, 288].

Противовоспалительный эффект ее доказан в тесте каррагинин-индуцированного и формалинового отека лапы крыс, а также был подтвержден на модели острого воспаления индуцированного введения декстрана и на модели адьювантного артрита [100, 132]. Олеаноловая кислота уменьшает кислото-индуцированную и гистамин-индуцированную проницаемость сосудов у крыс [132]. Урсоловая кислота оказалась эффективной на модели каррагининового отека, а также уменьшала количество корчей, стимулированных уксусной кислотой [265]. Механизмы противовоспалительных эффектов обеих кислот связывают со следующими аспектами фармакодинамики: блокада высвобождения гистамина из тучных клеток [95, 115], ингибирование липоксигеназной и

циклооксигеназной активности [123], подавление экспрессии определенных онкогенов [150].

Кислоты олеаноловая и урсоловая определяются как активные компоненты растения бирючина блестящая (*Ligustrum lucidum*) и препятствуют мутагенезу под действием бензопирена в клетках бактерий [192]. Урсоловая кислота, выделенная из айвы японской (*Eriobotrya japonica* Lindl.), ингибирует афлатоксин-индуцированный мутагенез в клетках сальмонел [282]. В ряде исследований установлено, что урсоловая и олеаноловая кислоты ингибируют экспериментально инициированные опухоли [188, 223].

Работы по изучению гиполипидемической и антиатеросклеротической активности урсоловой кислоты и ее производных впервые были опубликованы в России в начале 80-х годов [10, 15] прошлого века. В сыворотке крови животных с гиперлипидемией увеличивается концентрация ЛПВП, тогда как уровень ЛПНП, наоборот, падает после введения олеаноловой кислоты [145, 213].

Для олеаноловой и урсоловой кислот характерны противоязвенные эффекты. Термически-, химически- (аспирин, индометацин, уксусная кислота) и стресс-индуцированные язвы у крыс уменьшились после лечения олеаноловой кислотой [262].

Олеаноловая кислота в дозе 50 мг/кг и 100 мг/кг при введении до и после аллоксан-индуцированного диабета снижает уровень гипергликемии; интенсивность подъема глюкозы после инъекции адреналина также уменьшается после приема олеаноловой кислоты [163, 236].

Таким образом, тритерпеноиды представляют собой весьма интересную группу природных соединений, обладающих довольно широким спектром фармакологической активности, нашедшим подтверждение в экспериментальных работах. Данный класс соединений включает в себя огромное количество индивидуальных представителей, из которых олеаноловая и урсоловая кислоты являются часто встречаемыми в растениях соединениями, которые, как видно из данных литературы, также проявляют биологическую активность.

Перспективным источником получения тритерпеновых соединений являются шрот плодов клюквы и облепихи, представляющий собой отходы, образующиеся при использовании плодов в фармацевтической и пищевой промышленности. Выход тритерпеновых соединений составляет до 5%.

Клюква (*Vaccinium oxycoccos* L.) и ее плоды давно находятся под пристальным наблюдением фармакогностов и фармакологов. И в настоящее время продолжает проводиться ряд исследований фармакологической активности различных извлечений, выделенных из клюквы.

Доказана эффективность клюквенного сиропа в клинических исследованиях у детей с рецидивирующей инфекцией мочевых путей. Активность сиропа была связана с высокими уровнями гидроксибензойной кислоты в моче, снижающей гидрофобность поверхности штаммов *E. Coli* [241]. В ряде работ показана способность компонентов клюквы препятствовать развитию заболеваний урогенитальной сферы инфекционного происхождения [152, 244, 267].

Клюква ингибирует накопление липидов в жировой ткани, модулируя секрецию лептина и адипонектина в адипоцитах [128]. Доказана способность спиртового экстракта плодов клюквы уменьшать уровень ХС и степень атеросклеротического поражения сосудов [92].

Было установлено антипролиферативное действие различных извлечений из клюквы и клюквенного сока в отношении клеточных линий рака толстой кишки и молочной железы [143, 268].

Препараты на основе облепихи (*Hippophaë rhamnoides* L.) широко используются в традиционной медицине для лечения заболеваний желудка, сердечно-сосудистых проблем, повреждения печени, травм сухожилий и связок, заболеваний кожи и язв. Фармакологические свойства облепихи были исследованы *in vitro* и *in vivo*: выявлена цитозащитная, иммуномодулирующая, гепатопротекторная, радиозащитная, антиатерогенная, противоопухолевая активности, а также противомикробное действие [107, 164, 269].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Характеристика объектов исследования

Тритерпеноиды облепихи (ТО) (производство ООО «СиНаМ», Россия) – аморфный порошок от белого до желто-кремового цвета. Умеренно растворим в спирте этиловом 95% и хлороформе, мало растворим в ацетоне и этилацетате, очень мало растворим в воде. Содержание суммы урсоловой и олеаноловой кислот не менее 75%.

Тритерпеноиды клюквы (ТК) (производство ООО «СиНаМ», Россия) – аморфный порошок от белого до желто-кремового цвета. Умеренно растворим в спирте этиловом 95% и хлороформе, мало растворим в ацетоне и этилацетате, очень мало растворим в воде. Содержание суммы урсоловой и олеаноловой кислот не менее 75%.

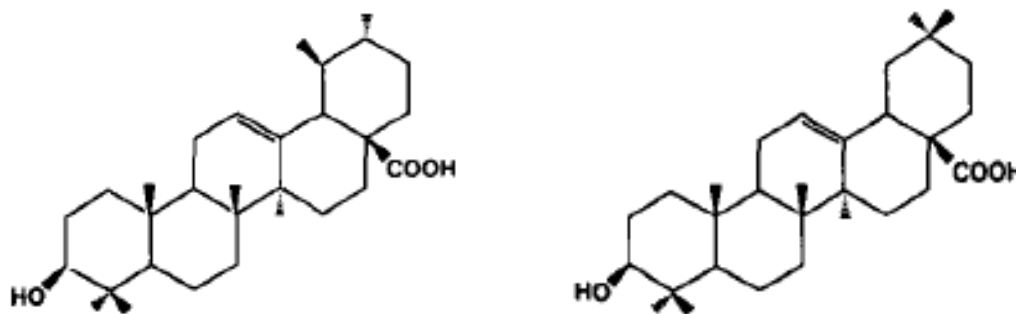


Рисунок 1 – Структурные формулы: урсоловая кислота, олеаноловая кислота

Схема получения: 17 кг шрота облепихи или клюквы заливают 51 л метилтретбутилового эфира, настаивают в течение 5 часов. Экстракт сливают, экстракцию повторяют 2 раза. Объединенные экстракты упаривают, полученный остаток промывают петролейным эфиром, раствор примесей в котором отделяют, к осадку после промывки петролейным эфиром прибавляют воду, отгоняют с водяным паром остатки неполярного растворителя для повторного использования, водную суспензию фильтруют, сушат, получают осадок с содержанием тритерпеновых кислот не менее 75 вес.% (титриметрически), кислотное число 1,4 мг КОН/г. К шроту добавляют воду, нагревают и отгоняют с водяным паром метилтретбутиловый эфир для повторного использования [63].

2.1.2 Лабораторные животные

Исследования выполнены на 468 аутбредных крысах Wistar обоего пола весом 180,0-280,0 г. Животные получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН, проходили двухнедельный карантин и содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Во время эксперимента животные содержались в контролируемых условиях: температура окружающего воздуха $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, относительная влажность $65\pm 5\%$ [44]. Для размещения крыс применяли макролоновые клетки Т-3, оборудованные стальными решетчатыми крышками, с кормовым углублением. В качестве подстилочного материала при содержании крыс применяли древесные опилки. Животные содержались на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к корму (полнорационный комбикорм – рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных, ГОСТ Р 50258-92, производитель ООО «Лабораторкорм») и воде. Подстил, клетки и аксессуары, поилки для питья, менялись еженедельно [2, 18, 19]. После карантина животных ранжировали по массе тела и распределяли по группам. Разброс по массе тела в пределах группы и между опытными группами в одной экспериментальной серии не превышал 10% [69]. Маркировка животных выполнялась путем проставления цветных меток. Все манипуляции с животными осуществляли с соблюдением принципов Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» [28].

2.2 Методы

2.2.1 Определение «острой» токсичности субстанций

«Острую» токсичность исследуемого препарата определяли в соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ [72].

«Острая» токсичность была изучена на белых крысах Wistar обоего пола весом 180-200 г. Были выделены группы крыс обоего пола (по 6 животных в

каждой), которым вводили дозы 5000 мг/кг, 15000 мг/кг и 30000 мг/кг. Перед пероральным введением (атравматичным зондом в желудок) ТО и ТК животных лишали пищи за 12 часов. При выполнении манипуляций по обеспечению выбранного режима дозирования технически возможным было обеспечение разового введения водной суспензии ТК и ТО максимально в дозе 5000 мг/кг в связи с технологическими особенностями приготовленной суспензии и учетом максимальных объемов, допустимых для разового перорального введения крысам определенной весовой категории. Для достижения более высокого уровня доз прибегали к дробному введению суспензии ТК и ТО с интервалом между введениями 2 часа. Технически максимально возможная для введения доза составила 30000 мг/кг. Вещества предварительно суспендировали в воде очищенной с добавлением в качестве стабилизатора твина-80 (0,2 мл на 10,0 г субстанции). Контрольные группы животных получали эквивалентное количество дистиллированной воды с аналогичным количеством твина-80.

Наблюдение за опытными животными проводилось в течение 2-х недель, в первый день непрерывно. Фиксировалось общее состояние крыс, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координация движений, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частота и глубина дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, консистенция фекальных масс, потребление корма и воды, динамику изменения массы тела. Общее состояние и поведенческие реакции экспериментальных животных регистрировали через 1 час, через 1 и 7 суток после введения исследуемых субстанций при их расположении в клетке, при взятии на руки и размещении на открытой площадке. Регистрировали показатели по схеме, приведенной в таблице 2.2.1.

Оценку двигательной активности, уровня тревожности и состояния ЦНС животных определяли через сутки после введения субстанций по методу «открытого поля».

Таблица 2.2.1 – Показатели общего состояния и поведенческих реакций крыс при исследовании «острой» токсичности (самцы/самки)

№	Показатель	Экспериментальные группы			
		Контроль	ТО (ТК) 5000 мг/кг	ТО (ТК) 15000 мг/кг	ТО (ТК) 30000 мг/кг
1	2	3	4	5	6
Наблюдения в руках					
1.	Реакция на взятие в руки				
	нет реакции				
	низкая реакция				
	умеренная реакция				
	высокая реакция				
2.	Вокализация				
	нет				
	после перемещения из клетки				
	в течение взятия в руки				
	в течение перемещения и взятия в руки				
3.	Палпебральное закрытие, состояние глазной щели				
	Веки широко открыты				
	птоз				
	Веки полностью закрыты				
Осмотр животных в клетке					
4.	Глаза				
	норма				
	ксерофтальмия				
	слезотечение				
	нагноение				
	воспаление				
	отечность				
	экзофтальм				
5.	Зрачковый статус (относительно условий освещения комнаты). Лаборант наблюдает состояние зрачков				
	норма				
	мидриаз				
	миоз				
6.	Уши				
	норма				
	покраснение				
	нагноение				
	воспаление				
	бледность				
7.	Зубы				
	норма				
	выпадение зубов				
	сломанные зубы				

Продолжение таблицы 2.1.1

1	2	3	4	5	6
	изменение цвета зубов				
8.	Нос				
	норма				
	бледность				
	покраснение				
	умеренные выделения				
	обильные выделения				
9.	Слюнотечение				
	норма				
	гиперсаливация				
	ксеростомия				
10.	Дыхание				
	норма				
	поверхностное				
	периодическое				
	одышка				
	патологические звуки				
	нарушение носового дыхания				
11.	Внешний вид шерсти				
	норма				
	взъерошенность				
	выпадение шерсти				
	утрата блеска				
	неестественный цвет				
	грязная шерсть				
12	Тонус мускулатуры				
	нет				
	низкий				
	умеренный				
	высокий				
13	Конечности				
	норма				
	бледность				
	покраснение				
	отечность				
Наблюдение на открытой площадке					
14	Двигательная активность				
	норма				
	повышена				
	возбуждение				
	нарушение реакции				
	снижена				
	утрата позы				
	заторможенность				
15	Осанка, положение				
	типичный диапазон				

Окончание таблицы 2.2.1

1	2	3	4	5	6
	положений (загребание подстила лапами, поднимание, ходьба)				
	нетипичный диапазон положений (низкая, сутулая, обессиленная осанка)				
16	Отклонения походки – тип и серьезность				
	норма				
	атаксия				
	нарушение координации				
	подергивания				
	тремор				
	судороги				
	ретропульсия (заторможенная походка)				
	ходьба на цыпочках				
17	Другое необычное поведение				
	отсутствует				
	присутствует				
18	Конституция				
	норма				
	истощение				
	неправильное телосложение				
	ожирение				
Разное					
19	Кровотечение				
	нет				
	умеренное				
	тяжелое				
	источник				
20	Выделения				
	норма				
	изменение цвета				
	наличие крови				
21	Другое				
	нет				
	травма				
	пальпируемые образования				
	покусы				
	смерть				
	умерщвлено в агонии				

«Открытое поле» представляло собой круглую арену диаметром 90 см и высотой 50 см. Пол арены был расчерчен тремя концентрическими

окружностями, находящимися на равном расстоянии друг от друга, и восьмью диаметрами. При испытании животных помещали в центр арены и в течение 3 минут при комнатном освещении наблюдали за ними, оценивая поведение по следующим поведенческим характеристикам: уринации, дефекации, чесанию и умыванию (грумингу), замиранию, количеству стоек в центре поля и у барьера, количеству переходов из сегмента в сегмент и пробегов. Все показатели поведения объединяли по функциональным признакам в 2 группы: «эмоциональное напряжение» и «двигательная активность». Составляющими эмоционального напряжения служили такие вегетативные реакции, как уринация (количество луж) и дефекация (количество болюсов). Слагающими компонентами двигательной активности служили число пробегов, переходов, стоек и умываний.

Расчет LD₅₀ планировали производить с использованием пробит-анализа по методу Прозоровского.

Динамику прироста массы животных оценивали, регистрируя на электронных весах массу перед введением субстанций и через две недели. На 15 сутки животных выводили декапитацией под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг). После эвтаназии проводили некропсию и исследование макроскопической картины внутренних органов.

2.2.2 Первичная оценка гиполипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы

Изучение гиполипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы проведено в опытах на 80 крысах-самцах массой 250-280 г в соответствии с методическими указаниями фармакологического комитета по изучению гиполипидемического и антиатеросклеротического действия фармакологических веществ [70]. С целью скрининга гиполипидемической активности исследуемых субстанций и выявления оптимальной терапевтической дозы использовали твиновую модель гиперлипидемии: однократное внутрибрюшинное введение твина-80 в дозе 250 мг/100 г массы тела.

Официально исследуемые субстанции не используются как гиполипидемические средства, поэтому их терапевтические дозы неизвестны.

Выбор доз для изучения указанного действия может основываться на предварительном определении LD₅₀. В соответствии с методическими рекомендациями, после определения «острой» токсичности препарата, для исследования избирается какая-то определенная часть от LD₅₀, но не более 1/10 части. «Острая» токсичность субстанций нами была изучена в опытах на крысах обоего пола при пероральном введении препарата, т.к. именно такой путь предполагается для экспериментального изучения. Но определить значение LD₅₀ для данных веществ не представилось возможным, так как при введении технически возможной максимальной дозы 30 г/кг не погибло ни одно животное за весь срок наблюдения. Нами в произвольном порядке были выбраны дозы: 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 500 мг/кг.

Исследуемые вещества в виде водной суспензии вводили в выше указанных дозах опытным группам крыс перорально в течение 10 дней до введения твина-80. Предварительное введение было направлено на насыщение действующими веществами ряда органов и тканей, связанных с метаболизмом липидов, что широко используется в случаях однократного применения агента, индуцирующего развитие гиперлипидемии [70]. На 10-й день животным внутрибрюшинно вводили твин-80 и через 12 часов осуществляли забой путем декапитации. Контрольной группе животных вводили в течение такого же срока воду очищенную, которая используется для приготовления суспензии веществ, на 10-й день – внутрибрюшинно – твин-80, и через 12 часов осуществляли забой. Перед забоем животные голодали в течение 12 часов.

В сыворотке крови определяли содержание ОХС, ТГ и общих липидов, содержание атерогенных ЛПНП (β-липопротеинов) и ЛПОНП (пре-β-липопротеинов).

2.2.3 Изучение гиполипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы при алиментарной гиперлипидемии

Изучение гиполипидемического действия тритерпеноидов облепихи и клюквы проведено на модели хронической алиментарной гиперлипидемии при их лечебно-профилактическом введении на 56 крысах-самцах массой 180-200 г.

Крысы находились на стандартном рационе питания. Животным опытных групп в утренние часы вводили ХС в дозе 1 г/кг, растворенный в подогретой смеси свиного жира и подсолнечного масла в соотношении 4:1. Во второй половине дня животным вводили еще одну дозу смеси жиров. Общее количество жиров составило 3,3 г на одно животное массой 200,0 г в сутки, в результате чего доля простых липидов в рационе была увеличена примерно до 40%. На такой диете крысы находились в течение 1 месяца. С первого дня эксперимента и до его окончания на фоне липидной нагрузки начинали вводить исследуемые вещества в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг один раз в сутки за 1 час до введения жиров. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество растворителя, на котором готовилась суспензия исследуемых веществ (вода очищенная+твин-80). В качестве препарата сравнения использовали ципрофибрат («Липанор», Санофи Винтроп-Жантйи, Франция), относящийся к группе фибратов, которые в опытах на лабораторных животных применяются в дозе 50 мг/кг [70]. «Липанор» вводили по той же схеме, что и исследуемые субстанции.

По истечении одного месяца животных после 24 часового голодания мортифицировали путем декапитации. Для оценки действия исследуемых субстанций определяли следующие биохимические показатели: в крови – содержание общих липидов, ТГ, β -липопротеинов и пре- β -липопротеинов, ОХС, холестерина α -липопротеинов, холестерина β -липопротеинов, уровень тимоловой пробы, общего белка, глюкозы, концентрацию ТБК-активных продуктов в β -липопротеинах и пре- β -липопротеинах, гемолиз по Ягеру; в печени – содержание ХС, ФЛ, общего белка, нуклеиновых кислот, ТГ [43].

За сутки до окончания эксперимента для характеристики функционирования системы гемостаза в условиях гиперлипидемии у опытных животных определяли коагулограмму. Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе Н334 (АО Краснодарский ЗИП, Россия). По полученным коагулограммам определяли начало и конец свертывания крови, продолжительность процесса свертывания крови (в сек).

2.2.4 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на некоторые показатели липидного и углеводного обменов у здоровых животных

Данная экспериментальная серия выполнена на 24 крысах-самцах. Исследуемые субстанции вводили здоровым животным в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 2-х месяцев. В качестве контроля служили животные, получавшие эквивалентное количество растворителя (вода дистиллированная+твин-80). Для оценки действия исследуемых субстанций определяли следующие биохимические показатели: в крови: содержание ОХС, свободного холестерина, холестерина α -липопротеинов, холестерина β -липопротеинов, свободного глицерина, ТГ, свободных жирных кислот, ФЛ, глюкозы; в печени – содержание ХС, ФЛ, ТГ. Определение биохимических показателей сыворотки крови выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray, Китай) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы DiaSys (Германия).

За сутки до окончания эксперимента для характеристики функционирования системы гемостаза под влиянием курсового введения тритерпеноидов у опытных и контрольных животных определяли коагулограмму.

2.2.5 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на желчеобразовательную и желчсекреторную функции печени у здоровых животных

Оценку желчевыделительной и желчеобразовательной функций печени проводили на 24 крысах-самцах через сутки после 14-дневного введения ТО и ТК в дозе 100 мг/кг. В качестве контроля использовали здоровых животных, получавших 14 дней растворитель, на котором готовилась суспензия тритерпеноидов (вода очищенная + твин-80). В качестве препарата сравнения использовали желчегонный препарат растительного происхождения фламин (ООО фармкомпания «Здоровье», Украина) в терапевтической дозе 12,4 мг/кг, рассчитанной с учетом межвидового коэффициента пересчета доз для данного вида животных. Исследуемые субстанции и препарат сравнения вводили за 1 час

до кормления. Интенсивность желчевыделения определяли в остром опыте по количеству желчи, выделившейся в течение 3 часов [46]. В суммарной порции желчи определяли содержание желчных кислот и ХС.

2.2.6 Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы

2.2.6.1 Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели острого экссудативного воспаления

Исследование противовоспалительной активности проведено на 24 крысах-самцах в соответствии с методическими указаниями [70]. Для этого использована методика воспроизведения острого экссудативного воспаления. Оценка влияния тритерпеноидов на острое экссудативное воспаление проведена на модели каррагенинового отека.

Исследуемые вещества вводили в дозе 100 мг/кг в течение 7 дней. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак (Nemofarm koncern A.D., Югославия) в дозе ED_{50} , составляющей 8 мг/кг [70]. Каррагениновый отек воспроизводили на 7 сутки эксперимента через 1 час после перорального введения веществ субплантарным (под подошвенный или плантарный апоневроз) путем введения 0,1 мл 1% раствора каррагенина. Выраженность воспалительной реакции оценивали по изменению объема лапы, который измеряли онкометрически перед введением каррагенина и через 3 часа после индукции воспаления. Противовоспалительный эффект препаратов оценивали по уменьшению отека лапы, который выражали в процентах по отношению к контролю.

2.2.6.2 Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели хронического аутоиммунного воспаления

Оценка противовоспалительной активности проведена на 48 крысах-самцах. Исследования выполнялись на модели хронического воспаления, развивающегося в результате субплантарного введения в правую заднюю лапу крыс 0,1 мл полного

адьюванта Фрейнда (Sigma, США), при использовании лечебно-профилактической и лечебной схем введения исследуемых объектов.

При исследовании влияния субстанций на воспаление при лечебно-профилактическом введении животные были распределены в следующие группы (по 6 в каждой): контрольные животные, животные с лечебно-профилактическим введением ТО, животные с лечебно-профилактическим введением ТК, животные с лечебно-профилактическим введением препарата сравнения (диклофенак 8 мг/кг).

ТО и ТК вводили перорально раз в сутки в виде водной суспензии в дозе 100 мг/кг по лечебно-профилактической схеме (7 дней до введения адьюванта и 14 дней после). Интенсивность воспалительной реакции регистрировали онкометрически. Измерение объема правой задней конечности производили перед введением адьюванта и далее раз в 2 дня, левой – перед введением, на 3 и на 14 сутки.

При исследовании влияния субстанций на воспаление при использовании лечебной схемы введения животные были распределены в следующие группы (по 6 в каждой): контрольные животные, животные с лечебной схемой введения ТО, животные с лечебной схемой введения ТК, животные с лечебной схемой введения препарата сравнения (диклофенак 8 мг/кг).

ТО и ТК вводили перорально раз в сутки в виде водной суспензии в дозе 100 мг/кг по лечебной схеме (в течение 12 дней, начиная с 14 дня после введения адьюванта). Интенсивность воспалительной реакции регистрировали онкометрически. Измерение объема правой и левой лапки производили перед инъекцией адьюванта и на 25 сутки.

По окончании наблюдения определяли количество лейкоцитов в крови и лейкоцитарную формулу на ветеринарном гематологическом анализаторе BS2800vet (Mindray, Китай). Для гематологических исследований кровь отбирали из подъязычной вены.

2.2.7 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на всасывание холестерина

Влияние тритерпеноидов на всасывание ХС из желудочно-кишечного тракта изучали путем определения содержания ХС в крови подъязычной вены до, через 2 и 4 часа после введения ХС в виде водной суспензии в дозе 200 мг/кг с суммой тритерпеноидов облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг или одного ХС у интактных животных (контроль) [70]. Эксперимент выполнен на 18 крысах-самцах.

2.2.8 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на интенсивность липолиза в жировой ткани *in vivo*

Исследования выполнены на 24 крысах-самцах Wistar массой 230-250 г. ТО и ТК вводили перорально раз в сутки в виде водной суспензии (стабилизатор твин-80) в дозе 100 мг/кг в течение 30 суток. Контрольной группе животных вводили растворитель в эквивалентном количестве. В качестве препарата сравнения использовали фенофибрат («Трайкор», Лаборатория Фурнье С.А., Франция) в дозе 12,5 мг/кг по схеме введения сходной с ТО и ТК. Через 1 час после последней дозы исследуемых соединений вводили внутривенно раствор адреналина [70]. Перед инъекцией адреналина и через 30 минут после осуществляли забор крови из подъязычной вены. В крови определяли содержание свободного глицерина и глюкозы. Определение биохимических показателей сыворотки крови выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray, Китай) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы DiaSys (Германия).

2.2.9 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на липолитическую активность сыворотки крови лабораторных животных

Исследования выполнены на 24 крысах-самцах Wistar массой 230-250 г. ТО и ТК вводили перорально раз в сутки в виде водной суспензии (стабилизатор твин-80) в дозе 100 мг/кг в течение 30 дней. Контрольной группе животных вводили растворитель в эквивалентном количестве. В качестве препарата сравнения использовали фенофибрат («Трайкор», Лаборатория Фурнье С.А., Франция) в

дозе 12,5 мг/кг по схеме введения сходной с ТО и ТК. Через 1 час после последнего введения исследуемых соединений у животных осуществляли предварительный забор крови из подъязычной вены и в хвостовую вену вводили гепарин в дозе 100 ЕД/кг массы тела животного [70]. Через 10 минут осуществляли умерщвление животных декапитацией и забор крови путем свободного истечения. В сыворотке крови определяли активность липазы и содержание свободных жирных кислот на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray, Китай) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы DiaSys (Германия).

2.2.10 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у животных и на фоне витаминной модели гиперлипидемии

Исследование выполнено на 60 крысах-самцах. Животным на протяжении пяти суток перорально через зонд вводили Холестерин (Panheas®) в дозе 40 мг/кг, и эргокальциферол в дозе 350000 ЕД/кг в подсолнечном масле (Белай И.М., Остапенко А.А., 2011; Yousufzai S.Y.K.M., 1976). ТО и ТК начинали вводить за 10 дней до воспроизведения, а затем на фоне моделирования дислипидпротеинемии. В качестве препаратов сравнения использовали фенофибрат («Трайкор», Лаборатория Фурнье С.А., Франция) в дозе 12,5 мг/кг и розувастатин («Крестор», ООО «АстраЗенека ЮК Лимитед», Великобритания) в дозе 1,7 мг/кг по схеме введения, сходной с ТО и ТК.

Через сутки после заключительного введения ХС и эргокальциферола осуществляли забор крови из подъязычной вены для коагулографических исследований. Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе Н334 (АО "Краснодарский ЗИП", Россия). По полученным коагулограммам определяли начало и конец свертывания крови, продолжительность процесса свертывания крови (в сек).

2.2.11 Лабораторные методы исследования

2.2.11.1 Определение содержания триглицеридов в сыворотке крови и гомогенате печени

Содержание ТГ в сыворотке (ммоль/л) определяли энзиматическим колориметрическим методом, основанном на гидролизе ТГ липазой с образованием жирных кислот и эквимольного количества глицерина. Глицерин при наличии АТФ, гексокиназы и глицерофосфатоксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Пероксидаза катализирует окисление хромогенных субстратов перекисью водорода в присутствии хлорфенола с образованием окрашенного продукта, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации ТГ в пробе. Для определения ТГ использовали стандартный набор реактивов производства «ДДС» ("АО ДИАКОН ДС", Россия) и «DiaSys» (Германия) и автоматический биохимический анализатор BS-380 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronic Co. Ltd., Китай).

Количество ТГ в гомогенате печени (мкмоль/г) измеряли по Gottfrieds S.P., Rosenberg B. в модификации Сентебовой Н.А. [72]. Стандартный раствор триолеина для определения содержания ТГ содержал 80% воды для устранения ошибки экстрагирования. Гомогенат печени готовили на 0,9% растворе NaCl в соотношении 1:7.

2.2.11.2 Определение общего холестерина в сыворотке крови и гомогенате печени

ХС в сыворотке крови определяли по методу Илька С. (первичная оценка гиполипидемического действия) [39]. Расчет производили по стандартному раствору ХС. Второй метод определения концентрации ХС в сыворотке крови (остальные экспериментальные серии) заключался в проведении ферментативного фотометрического теста CHOD-PAP с использованием стандартного набора реактивов «DiaSys» (Германия). При гидролизе эфиров ХС холестеринэстеразой (ХЭ) образуется свободный ХС. Образовавшийся в результате гидролиза и имеющийся в пробе ХС окисляется кислородом воздуха

под действием холестериноксидазы (ХО) с образованием эквимольных количеств перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации ХС в пробе и измеряется фотометрически. Определение проводили на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray» с использованием стандартных наборов производства «DiaSys».

Из гомогената печени ХС извлекали хлороформ-метанольной смесью 2:1 [118]. Определение ХС проводили по реакции Либермана-Бурхарда (Liebermann L., Burchard H.) [39] и выражали в мг/г печени. Расчет производили по стандарту. Гомогенат печени готовили, как описано выше.

2.2.11.3 Определение содержания β - и пре- β -липопротеинов в сыворотке крови

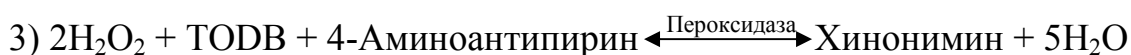
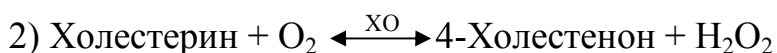
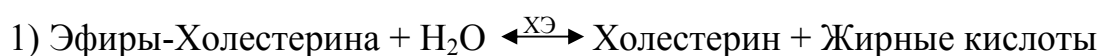
Определение β - и пре- β -липопротеинов сыворотки крови проводили турбидиметрически по Бурштейну М. и Самай Ф. [25, 73, 120]. Метод основан на способности β - и пре- β -липопротеинов образовывать с гепарином комплекс, который осаждается без денатурации в присутствии хлористого кальция. Степень мутности, измеряемая на КФК-2, КФК-3 при длине волны 720 нм, пропорциональна содержанию β - и пре- β -липопротеинов. Содержание β - и пре- β -липопротеинов выражали в г/л.

2.2.11.4 Определение содержания холестерина α -липопротеинов сыворотки крови

Принцип метода определения ХС-ЛПВП [73] заключается в том, что хиломикроны, ЛПНП и ЛПОНП осаждаются гепарином в присутствии марганца хлорида. После центрифугирования в супернатанте остается фракция ЛПВП, которая количественно исследуется с использованием набора «ЭКОлаб» (Россия) для определения ХС (первичная оценка гиполипидемического действия).

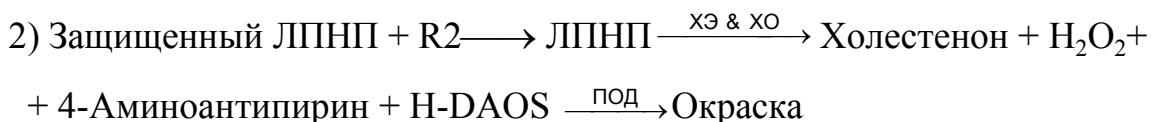
Также определение ХС-ЛПВП проводили с использованием набора реактивов производства «UTS» (ЗАО «А/О Юнимед», Россия) на

автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray». Измерение основано на прямом методе определения ХС-ЛПВП, без стадий осаждения и центрифугирования (остальные экспериментальные серии). Метод определения основан на способности ряда детергентов переводить ХС-ЛПВП в растворимое состояние, что позволяет ему вступать в реакции с ХЭ, ХО и хромогенами в водной среде, в то время, как ЛПНП, ЛПОНП и хиломикроны не вступают в реакции с этими ферментами из-за образования конгломератов на поверхности детергента. ХС-ЛПВП определяется с помощью следующих реакций:



2.2.11.5 Определение содержания холестерина β-липопротеинов в сыворотке крови

Определение содержания холестерина β-липопротеинов в сыворотке крови проводили расчетным методом по уравнению Фридвальда 3. (первичная оценка гипополипдемического действия) или гомогенным методом прямого измерения ХС-ЛПНП без осаждения (остальные экспериментальные серии). На первом этапе липопротеины, не относящиеся к ЛПНП, подвергаются воздействию ферментов, в то время как ЛПНП селективно защищены. На втором этапе ЛПНП освобождаются и селективно определяются с помощью цветной ферментативной реакции.



2.2.11.6 Определение содержания общих липидов в сыворотке крови

Определение содержания общих липидов в сыворотке крови проводили стандартным набором реактивов фирмы «Lachema» (Чешская Республика).

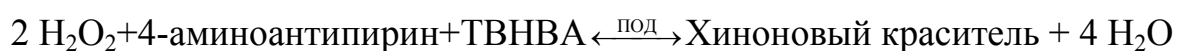
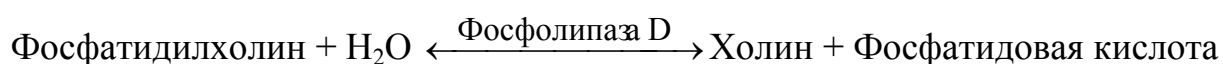
Принцип метода основан на том, что липиды и жирные кислоты, ФЛ и ХС взаимодействуют после гидролиза серной кислотой с фосфованилиновым реактивом с образованием красного окрашивания.

2.2.11.7 Определение содержания фосфолипидов в печени

Использовали метод, основанный на определении концентрации неорганического фосфата («Р»), освободившегося при кислотном гидролизе. ФЛ извлекали из гомогената печени хлороформ-метанольной смесью 2:1 [118]. Содержание ФЛ выражали в мг неорганического фосфора, выделившегося после минерализации липидов по Фиске-Суббароу, как описано [7], на 1 г ткани печени. Измерение содержания неорганического фосфата проводили реакцией с молибдатом аммония и рассчитывали по калибровочному графику. Гомогенат печени готовили, как описано выше.

2.2.11.8 Определение содержания фосфолипидов в крови

Определение содержания ФЛ крови проводили ферментативным колориметрическим методом с использованием набора реактивов производства «DiaSys» на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray». В основе метода лежит следующая реакционная схема:



2.2.11.9 Тимоловая проба сыворотки крови

Постановка тимоловой пробы (ТП) проводилась с использованием стандартных наборов реактивов производства «Lachema» по Хуэрго и Попперу [43]. Метод основан на способности сывороточных β-глобулинов, γ-глобулинов и липопротеинов осаждаться при pH 7,55 тимоловым реактивом. В зависимости от количества и взаимного соотношения отдельных белковых фракций при реакции возникает помутнение, интенсивность которого измеряют

фотометрически при 660 нм. Результаты рассчитывали по калибровочному графику и выражали в единицах помутнения.

2.2.11.10 Определение содержания общего белка в сыворотке крови и гомогенате печени

Общий белок в сыворотке крови определяли биуретовым методом, который основан на образовании белками и пептидами в щелочной среде с раствором двухвалентной меди окрашенного комплекса, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию белка. Использовали стандартный набор реактивов фирмы «ДДС» ("АО ДИАКОН ДС", Россия).

Белок в гомогенате печени определяли по методу Лоури и соавт. в модификации Миллера [221]. Содержание белка определяли по калибровочной кривой и выражали в мг/г. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

2.2.11.11 Определение содержания нуклеиновых кислот в печени

Определение нуклеиновых кислот проводили спектрофотометрически в гомогенате печени, полученном путем гомогенизации навески печени с 0,2 М хлорной кислотой, по разнице экстинкций при 270 и 290 нм [73] и рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{мкгф}} = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19} \quad (1)$$

где 0,19 – поглощение 1 мкг фосфора нуклеиновых кислот, содержащегося в 1 мл раствора. Для пересчета количества нуклеинового фосфора использовали коэффициент 10,3

$$C_{\text{мкгн.к.}} = C_{\text{мкгф}} \cdot 10,3 \quad (2)$$

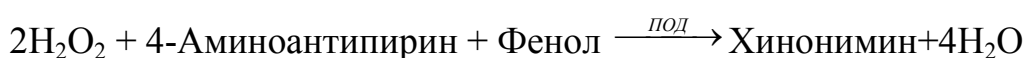
Результаты выражали в мг/г печени.

2.2.11.12 Определение содержания глюкозы в сыворотке крови

Содержание глюкозы определяли в сыворотке крови ферментативным методом [39], используя стандартные наборы реактивов ООО «Агат-Мед» (Россия), и выражали в ммоль/л сыворотки крови. Расчет производили по стандартному раствору глюкозы (первичная оценка гипополипидемического действия).

Также применяли ферментативный фотометрический тест «GOD-PAP» с использованием глюкозооксидазы набора реактивов «DiaSys» (остальные экспериментальные серии).

Принцип определения глюкозы: ферментативным окислением в присутствии глюкозооксидазы (ГОД). Окрашенный индикатор хинонимин образуется из фенола и 4-аминоантипирина под действием пероксида водорода при каталитическом воздействии пероксидазы (ПОД) (реакция Триндера).



2.2.11.13 Определение интенсивности спонтанного гемолиза эритроцитов

Интенсивность спонтанного гемолиза определяли по Ягеру. Метод основан на измерении при 540 нм экстинкции внеэритроцитарного гемоглобина, поступающего в среду вследствие спонтанного лизиса мембран эритроцитов. Интенсивность гемолиза рассчитывали по формуле и выражали в %:

$$X = (E_1 + E_2) \cdot 100 / 2 \cdot E_3 \quad (3)$$

где X – степень гемолиза, %;

E_1 и E_2 – экстинкции первой и второй проб;

E_3 – экстинкция третьей пробы [73].

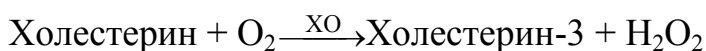
2.2.11.14 Определение содержания ТБК-активных продуктов в β -липопротеинах и пре- β -липопротеинах

β -липопротеины осаждали фосфотольфрамовой кислотой в присутствии ионов магния. В осадке определяли содержание ТБК-активных продуктов по методу Ohkawa Н.О. и соавт. [278], разработанному для гомогенатов ткани и других биологических образцов. Метод основан на превращении гидроперекисей продуктов перекисного окисления в малоновый диальдегид и окрашивании последнего с тиобарбитуровой кислотой. Спектры окрашенных

бутанольных экстрактов измеряли на СФ-46. Расчет производили по разности экстинкций при 535 нм и 520 нм, используя коэффициент молярной экстинкции МДА $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Результаты выражали в мкмоль МДА/л.

2.2.11.15 Определение содержания свободного холестерина в крови

Определение содержания свободного ХС в крови проводили ферментативным фотометрическим тестом «CHOD-PAP» с использованием набора реактивов производства «DiaSys» на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray». Окрашенным индикатором является хинонимин, который образуется из 4-аминоантипирина, 4-хлорфенола и перекиси водорода под каталитическим воздействием пероксидазы (реакция Триндера).



2.2.11.16 Определение содержания свободного глицерина в крови

Определение содержания свободного глицерина в крови проводили с помощью колориметрического ферментативного метода с использованием набора реактивов производства «DiaSys» на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray». Индикатором является хинонимин, который образуется из 4-аминоантипирина и 4-хлорфенола под действием перекиси водорода при каталитическом участии пероксидазы.



Увеличение оптической плотности при 546 нм прямо пропорционально концентрации свободного глицерина в образце.

2.2.11.17 Определение содержания свободных жирных кислот в крови

Определение содержания свободных жирных кислот в крови проводили с использованием набора реактивов производства «DiaSys» на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray». Принцип метода основан на взаимодействии незатерифицированных жирных кислот и коэнзима

А в присутствии ацил-коэнзим-А-синтетазы (АКС) с образованием ацилированного коэнзима А. Ацилированный коэнзим А окисляется с помощью ацил-коэнзим-А-оксидазы (АКОД) с выделением перекиси водорода. H_2O_2 образует окрашенный продукт при использовании соединений Триндера в присутствии пероксидазы (ПОД).

Неэтерифиц. жирные к-ты + КоА + АТФ $\xleftarrow{\text{АКС}}$ Ацил-коэнзим А + АМФ + ФФ_1

Ацил-коэнзим А + O_2 $\xleftarrow{\text{АКОД}}$ 2,3-транс-еноил-коэнзим А + H_2O_2

$2\text{H}_2\text{O}_2$ + соединение Триндера $\xleftarrow{\text{ПОД}}$ Краситель + $4\text{H}_2\text{O}$

Измеренная при 546 нм интенсивность красного красителя прямо пропорциональна концентрации неэтерифицированных жирных кислот в образце.

2.2.11.18 Определение содержания липазы в сыворотке крови

Определение содержания липазы в сыворотке крови проводили с использованием набора реактивов производства «DiaSys» на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 фирмы «Mindray». Принцип метода: образующийся в результате реакции метилрезорурфин эфир, самопроизвольно разлагается до метилрезорурфина. Оптическая плотность этого красного красителя прямо пропорциональна активности липазы в образце.

2.2.11.19 Оценка желчесекреторной функции печени

2.2.11.19.1 Определение скорости секреции желчи

Определение скорости секреции желчи проводили по Литвинчук М.Д., Новосилец З.И., 1980, как описано [46]. Подопытных крыс наркотизировали при помощи хлоралгидрата (350 мг/кг). После фиксации на операционном столике проводили вскрытие брюшной полости разрезом в эпигастральной области длиной 1,5-2,0 см. Находили двенадцатиперстную кишку и место вхождения в нее желчного протока. Выше этого места 12-перстную кишку перевязывали, а вторую перевязку делали ниже впадения желчного протока в кишечник. В образовавшийся замкнутый мешочек, куда впадал желчный проток, вставляли трубку-канюлю и собирали желчь в мерную пробирку в

течение 3-х часов. Регистрировали объем выделившейся желчи за каждый час и в целом за 3 часа. Для сохранения эвакуаторной функции желудочно-кишечного тракта с помощью эластичной трубки между проксимальной и дистальной частью кишечника накладывали анастомоз. Желчевыделительную функцию оценивали по объему желчи в мл за 3 часа или в мл желчи за 1 час.

2.2.11.19.2 Определение содержания холестерина и желчных кислот в желчи

Определение содержания желчных кислот и ХС с последующим расчетом холато-холестеринового (Х/Х) коэффициента проводили в одной порции желчи спектрофотометрически, как описано [46]. Данный метод основан на способности раствора хлорного железа в смеси равных объемов ледяной уксусной и концентрированной серной кислот реагировать с ХС и желчными кислотами с образованием продуктов, имеющих максимумы поглощения при различных длинах волн. ХС дает при комнатной температуре максимум поглощения при 480 нм, а желчные кислоты после нагревания при 60°C – при 380-390 нм. Расчет исследуемых компонентов желчи проводили по формуле:

$$C_{\text{жк}} = 114 D_{385} \cdot P; \quad (4)$$

$$C_{\text{хс}} = 50(D_{480} - 0,04 D_{385}) \cdot P, \quad (5)$$

где $C_{\text{жк}}$ – концентрация желчных кислот, г/л; $C_{\text{хс}}$ – концентрация ХС, г/л; D_{385} , D_{480} , D_{385} – величины оптических плотностей при соответствующих длинах волн; P – разведение желчи.

Кроме холато-холестеринового коэффициента, исходя из концентрации желчи и ХС в желчи, рассчитывали общее количество ХС и желчных кислот, выделенное за 3 часа, на 100 г печени.

2.2.12 Статистическая обработка результатов исследования

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики [38]. Для всех показателей вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), которые представлены в итоговых таблицах. Данные проверены на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-

Смирнова. Межгрупповые различия анализировали параметрическими или непараметрическими методами в зависимости от типа распределения. В качестве параметрических критериев использован t-критерий Стьюдента, для множественного сравнения – однофакторный дисперсионный анализ с постробработкой Бонферрони. При ненормальном распределении в качестве непараметрического критерия – U-критерий Манна-Уитни. Различия определялись при 0,05 уровне значимости (p).

Для статистической обработки результатов использовали пакет программ Statistica 6.0, StatPlus 2009 и Microsoft Office Excel 2007.

ГЛАВА 3 ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУММЫ ТРИТЕРПЕНОИДОВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ

3.1 Результаты определения «острой» токсичности

При исследовании «острой» токсичности были выделены группы крыс обоего пола, которым вводили дозы: 5000 мг/кг, 15000 мг/кг и 30000 мг/кг. К введению следующего уровня дозы приступали только после получения результатов по летальности в группе с предыдущей меньшей дозой. При выполнении манипуляций по обеспечению выбранного режима дозирования технически максимально возможным было разовое введение водной суспензии ТК и ТО в дозе 5000 мг/кг в связи с технологическими особенностями приготовленной суспензии и учетом максимальных объемов, допустимых для разового перорального введения крысам определенной весовой категории. Для достижения более высокого уровня доз прибегали к дробному введению суспензии ТК и ТО с интервалом между введениями 2 часа. Технически максимально возможная для введения доза составила 30000 мг/кг.

Наблюдение за животными в ходе эксперимента по определению «острой» токсичности показало, что после введения исследуемых субстанций в вышеуказанных дозах и в течение двух недель после этого, во всех опытных группах не отмечено гибели ни одного животного. Уровень потребления воды и пищи за две недели после введения субстанций достоверно не отличается от значений у контрольных животных. В динамике прироста массы тела за две недели после введения ТК и ТО в подобранных дозах не отмечали достоверных отличий от значений соответствующих контролей (таблица 3.1.1).

Как видно из данных, представленных в таблице 3.1.1, самки и самцы опытных и контрольной групп животных в начале эксперимента достоверно не отличались между собой по исходной массе тела, и колебание в весе в пределах одной группы не превышало 10%. У контрольных животных отмечался стабильный прирост массы тела, который в среднем за 2 недели составил у крыс-самцов 22,7 г, а у самок 17,2 г, в результате чего средняя масса самцов

составила $228,5 \pm 5,93$ г, а самок $207,33 \pm 8,52$ г. Эти данные соответствуют массе крыс 5-месячного возраста, к которым относятся испытываемые животные.

Таблица 3.1.1 – Динамика изменения массы тела крыс после введения суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы при исследовании «острой» токсичности, $M \pm SD$ (г)

Группа (доза)	Исходная масса, г		Масса животных через 2 недели			
	самцы	самки	самцы		самки	
	$M \pm SD$	$M \pm SD$	$M \pm SD$	Δ , г	$M \pm SD$	Δ , г
Контроль, n=6	205,83 $\pm 8,45$	190,17 $\pm 5,91$	228,5 $\pm 5,93$	22,67 $\pm 4,8$	207,33 $\pm 8,52$	17,17 $\pm 6,85$
ТО, 5000 мг/кг, n=6	201,17 $\pm 10,91$	185,5 $\pm 7,58$	221,17 $\pm 12,77$	20,0 $\pm 4,56$	201,0 $\pm 4,56$	15,50 $\pm 4,42$
ТО, 15000 мг/кг, n=6	200,33 $\pm 9,31$	186,83 $\pm 6,08$	222,17 $\pm 8,16$	21,83 $\pm 2,79$	203,17 $\pm 6,94$	16,33 $\pm 1,51$
ТО, 30000 мг/кг, n=6	194,17 $\pm 7,99$	185,17 $\pm 9,20$	213,33 $\pm 10,07$	19,17 $\pm 4,40$	201,33 $\pm 12,26$	16,17 $\pm 3,87$
ТК, 5000 n=6	204,17 $\pm 7,83$	189,50 $\pm 7,56$	224,0 $\pm 13,51$	19,83 $\pm 6,18$	205,67 $\pm 5,89$	16,17 $\pm 6,05$
ТК, 15000 мг/кг, n=6	201,67 $\pm 7,69$	188,67 $\pm 6,80$	223,0 $\pm 10,35$	21,33 $\pm 6,38$	203,33 $\pm 7,61$	14,67 $\pm 2,16$
ТК, 30000 мг/кг, n=6	202,83 $\pm 8,98$	187,67 $\pm 7,63$	223,0 $\pm 7,98$	20,17 $\pm 10,03$	202,83 $\pm 9,28$	15,17 $\pm 3,71$
Примечание: Δ – прирост массы тела; n – количество животных в группе; во всех случаях достоверные отличия отсутствуют ($p > 0,05$; p – уровень достоверной разницы).						

Наблюдение за динамикой изменения веса самцов (таблица 3.1.1) у опытных животных на протяжении двух недель эксперимента показало отсутствие различий между контрольной и опытными группами.

Так в группах, получавших ТО в дозах 5000 мг/кг, 15000 мг/кг и 30000 мг/кг, прирост в массе у самцов составил в среднем 20,0 г, 21,8 г и 19,2 г соответственно, а у самок 15,5 г, 16,3 и 16,2 г. В группах, которым вводили ТК, наблюдалась примерно аналогичная картина: у самцов средний прирост 19,8 г, 21,3 г, 20,2 г, а у самок 16,2 г, 14,7 г и 15,2 г соответственно.

Общее состояние и поведенческие реакции экспериментальных животных наблюдали через 1 час, через 1 и 7 суток после введения исследуемых субстанций при их расположении в клетке, при взятии на руки и размещении на открытой площадке. Во все сроки наблюдения значительных отличий между опытными и соответствующими контрольными животными по оцениваемым показателям выявлено не было.

Неизменным оставались характер и интенсивность двигательной активности, состояние психомоторных реакций, оцениваемых в тесте «открытое поле». Данные по изменению поведенческих реакций и состояния ЦНС через сутки после введения последней дозы ТО и ТК у крыс-самок и крыс-самцов представлены соответственно в таблицах 3.1.2 и 3.1.3. Как следует из данных, представленных в этих таблицах, при введении крысам-самцам ТО и ТК во всех дозах показатели, характеризующие двигательную активность и эмоциональное напряжение, не отличались от таковых у животных контрольной группы. У самок, получавших тритерпеноиды, все показатели, используемые для оценки состояния ЦНС по методу «открытого поля», также не отличались от значений контрольных животных.

Частота и глубина дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, консистенция фекальных масс у этих животных, как в первые сутки, так и на протяжении всего срока наблюдения не отличались от аналогичных характеристик контрольной группы.

Таблица 3.1.2 – Оценка влияния ТО на поведенческую активность крыс по методу «открытого поля» ($M \pm SD$, $n=6$)

Вид активности	Число поведенческих эпизодов							
	Контроль		ТО, 5 000 мг/кг		ТО, 15 000 мг/кг		ТО, 30 000 мг/кг	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Число стоек	10,83 $\pm 1,78$	9,33 $\pm 1,43$	11,17 $\pm 1,47$	8,66 $\pm 1,33$	9,17 $\pm 3,43$	7,67 $\pm 2,84$	8,17 $\pm 2,94$	7,33 $\pm 2,26$
Число пересеченных квадратов	22,17 $\pm$ 3,19	25,83 $\pm 4,83$	26,67 $\pm 5,16$	23,83 $\pm 5,46$	24,67 $\pm 5,41$	20,83 $\pm 6,55$	21,5 $\pm 5,03$	26,66 $\pm 5,36$
Грумминг	3,17 $\pm 0,87$	3,5 $\pm 1,41$	2,83 $\pm 1,22$	3,17 $\pm 1,30$	2,67 $\pm 1,02$	4,17 $\pm 1,72$	3,33 $\pm 1,50$	4,71 $\pm 1,41$
Время «замирания» в центре (сек)	5,33 $\pm 1,17$	4,66 $\pm 1,28$	5,83 $\pm 2,12$	6,16 $\pm 3,44$	5,16 $\pm 1,42$	4,83 $\pm 2,10$	4,0 $\pm 0,73$	3,83 $\pm 1,74$
Уринации	0,83 $\pm 0,31$	1,17 $\pm 0,31$	0,67 $\pm 0,33$	1,0 $\pm 0,45$	0,67 $\pm 0,33$	0,83 $\pm 0,98$	0,5 $\pm 0,34$	1,33 $\pm 0,61$
Число болюсов	1,83 $\pm 0,60$	1,5 $\pm 0,56$	1,5 $\pm 0,43$	1,33 $\pm 0,49$	1,67 $\pm 0,92$	2,16 $\pm 1,05$	2,33 $\pm 0,92$	1,33 $\pm 0,88$
Примечание: во всех случаях достоверные отличия отсутствуют ($p > 0,05$; p – уровень достоверной разницы).								

На 15 сутки после введения субстанций животные выводились из эксперимента декапитацией под хлоралгидратным наркозом. Некропсия и макроскопическое исследование внутренних органов всех опытных животных не выявило патологических изменений. Повреждений кожных покровов в виде скарификаций от расчесов, язвенных поражений, петехий, телеангиоэктозий не обнаружено. Шерстный покров животных гладкий, без изменений.

Таблица 3.1.3 – Оценка влияния ТК на поведенческую активность крыс по методу «открытого поля» ($M \pm SD$, $n=6$)

Вид активности	Число поведенческих эпизодов							
	Контроль		ТК, 5 000 мг/кг		ТК, 15 000 мг/кг		ТК, 30 000 мг/кг	
	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки	самцы	самки
Число стоек	10,83 $\pm 1,78$	9,33 $\pm 1,43$	8,0 $\pm 3,07$	9,33 $\pm 1,98$	11,17 $\pm 3,20$	8,33 $\pm 1,52$	10,17 $\pm 2,30$	7,17 $\pm 2,15$
Число пересеченных квадратов	22,17 $\pm$ 3,19	25,83 $\pm 4,83$	28,83 $\pm 6,25$	31,0 $\pm 5,13$	21,67 $\pm 5,36$	28,66 $\pm 4,75$	25,50 $\pm 5,82$	27,50 $\pm 4,30$
Груминг	3,17 $\pm 0,87$	3,5 $\pm 1,41$	2,0 $\pm 1,44$	2,33 $\pm 1,31$	2,83 $\pm 0,79$	5,16 $\pm 1,58$	3,17 $\pm 0,98$	3,0 $\pm 1,69$
Время «замирания» в центре (сек)	5,33 $\pm 1,17$	4,66 $\pm 1,28$	6,67 $\pm 2,35$	5,83 $\pm 2,75$	6,67 $\pm 2,81$	3,17 $\pm 1,05$	3,67 $\pm 1,28$	3,83 $\pm 0,79$
Уринации	0,83 $\pm 0,31$	1,17 $\pm 0,31$	0,67 $\pm 0,42$	0,67 $\pm 0,49$	0,67 $\pm 0,33$	0,83 $\pm 0,40$	1,0 $\pm 0,52$	1,33 $\pm 0,21$
Число болюсов	1,83 $\pm 0,60$	1,5 $\pm 0,56$	0,67 $\pm 0,21$	1,33 $\pm 0,33$	2,50 $\pm 0,92$	2,83 $\pm 1,01$	2,50 $\pm 1,02$	2,16 $\pm 0,91$
Примечание: во всех случаях достоверные отличия отсутствуют ($p > 0,05$; p – уровень достоверной разницы).								

Слизистые в носовой полости, ротоглотке, гортани бледно-голубые. Эпителий кончика носа, кожные покровы тела и лап с синюшным оттенком. Геморрагии, очажки альтераций в указанных отделах отсутствуют.

Просветы воздухоносных путей свободные. В плевральной полости свободной жидкости не обнаружено. Parietalный листок плевры серовато-розового вида. Синехий между париетальным и висцеральным листками плевры не выявлено. Легкие с поверхности и на разрезе темно-вишневого цвета, без изменений.

Листки перикарда тонкие прозрачные. Сердце упруго-эластичной консистенции на ощупь, темно-вишневого вида. Вены коронарного бассейна с выраженным полнокровием.

Расположение внутренних органов грудной и брюшной полостей без изменений. Париеальный и висцеральный листки брюшины тонкие, матовые.

Листки брюшины сероватого вида, гладкие, блестящие. Макроскопически печень не увеличена в размерах, красно-вишневого вида. Капсула ее гладкая, прозрачная. Воротная вена полнокровная. С разреза печени стекает умеренное количество темно-красной жидкости.

Селезенка серповидной формы обычных размеров.

Почки бобовидной формы, темно-красного цвета. На разрезе хорошо контурируются корковое и мозговое вещество органа. Параренальная клетчатка умеренно выражена.

Надпочечники серовато-кремового вида, округлой формы и прилежат к верхнему полюсу почек. Макроскопическая картина у животных опытных групп, которым вводили ТО и ТК во всех дозах, не отличалась от контрольных животных.

Полученные результаты определения «острой» токсичности исследуемых субстанций на крысах позволяют отнести их по классификации Hodge H.C., Sterner L.H. к 6 классу токсичности – относительно безвредным веществам [8]. Состояние животных, поведение, динамика изменения массы, макроскопическое строение органов не имели межгрупповых отличий.

3.2 Первичная оценка гипOLIпидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы

Как видно из данных, представленных в таблице 3.2.1, однократное внутрибрюшинное введение твина-80 сопровождалось развитием выраженной гиперлипидемии. Так у животных контрольной группы отмечали достоверное по отношению к интактным значениям увеличение содержания общих липидов в крови на 151%, что связано с ростом концентрации в крови β - и пре- β -липопротеинов на 332%, а также ТГ и ОХС на 64% и 52% соответственно. Данные изменения липидного спектра сыворотки крови соответствуют картине гиперлипопротеинемии IIa, по классификации Фредриксона, принятой

Всемирной организацией здравоохранения и основанной на фенотипических характеристиках сыворотки при нарушениях липидного обмена [27].

Таблица 3.2.1 – Влияние ТО и ТК на показатели липидного обмена в крови на фоне твиновой гиперлипидемии у крыс

Группы животных	Показатели							
	Общие липиды крови, г/л		β- и пре-β-липопротеины крови, г/л		Триглицериды крови, ммоль/л		Холестерин крови, ммоль/л	
	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Интактные, n=6	1,31 ±0,302	–	0,73 ±0,317	–	1,29 ±0,185	–	1,22 ±0,275	–
Контроль, n=13	3,29 ±0,570	151 ^Δ	3,15 ±1,355	+332 ^Δ	2,11 ±0,885	+64 ^Δ	1,86 ±0,708	+52 ^Δ
ТО, 10 мг/кг, n=6	3,11 ±0,281	137 ^Δ	2,03 ±0,380	+178 ^Δ	2,02 ±0,414	+57 ^Δ	1,00 ±0,187	-46*
ТО, 50 мг/кг, n=6	2,61 ±0,626	+99 ^Δ	2,32 ±1,050	+218 ^Δ	2,27 ±0,629	+76 ^Δ	0,99 ±0,252	-47*
ТО, 100 мг/кг, n=6	2,41 ±0,356	-27* +84 ^Δ	2,02 ±0,611	+176 ^Δ	1,64 ±0,631	+27	0,94 ±0,286	-49*
ТО, 200 мг/кг, n=6	2,22 ±0,319	-32* +69 ^Δ	1,71 ±0,201	-46* +134 ^Δ	1,30 ±0,163	-38*	0,74 ±0,177	-60* -39 ^Δ
ТО, 500 мг/кг, n=6	2,32 ±0,426	-29* +77 ^Δ	1,92 ±0,228	-39* +163 ^Δ	1,30 ±0,189	-38*	1,33 ±0,194	+9
ТК, 10 мг/кг, n=6	2,92 ±0,302	+123 ^Δ	2,49 ±0,304	+241 ^Δ	2,07 ±0,261	+60 ^Δ	1,31 ±0,207	+7
ТК, 50 мг/кг, n=6	2,33 ±0,347	-29* +123 ^Δ	2,15 ±0,401	+195 ^Δ	1,80 ±0,114	+40 ^Δ	1,15 ±0,269	-38*
ТК, 100 мг/кг, n=6	2,08 ±0,147	-37* +59 ^Δ	2,22 ±0,232	+204 ^Δ	1,57 ±0,125	+22	1,17 ±0,453	-37*
ТК, 200 мг/кг, n=6	2,10 ±0,279	-36* +60 ^Δ	1,84 ±0,142	-42* +152 ^Δ	1,41 ±0,115	+9	1,20 ±0,255	-35*
ТК, 500 мг/кг, n=6	1,79 ±0,018	-45*	1,70 ±0,220	-46* +133 ^Δ	1,44 ±0,180	+12	1,29 ±0,216	-30*
Примечание: n – количество животных в группе ^Δ – p<0,05 – данные достоверны по отношению к интактным значениям, * – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям, p – уровень достоверной разницы.								

Лечебно-профилактическое введение ТО в дозе 10 мг/кг привело к достоверному по сравнению с контролем снижению содержания ХС в сыворотке крови на 46%, причем этот показатель полностью нормализовался, так как достоверно не отличался от значений у интактных животных. Отмечали некоторую тенденцию к снижению содержания в крови β- и пре-β-

липопротеинов, но эти изменения были не достоверны, и их уровень, как и уровень общих липидов и ТГ, был выше аналогичных значений у интактных животных на 178%, 137% и 57% соответственно.

В группе животных, получавших ТО в дозе 50 мг/кг, отмечали восстановление до нормального уровня содержания ХС в крови, остальные из исследуемых показателей оставались на уровне контрольных значений. Содержание общих липидов в крови превышало нормальные значения на 99%, β - и пре- β -липопротеинов на 218%, ТГ на 76%.

Применение ТО в дозе 100 мг/кг сопровождалось достоверным снижением концентрации общих липидов в сыворотке крови на 27%, полностью нормализовался уровень ТГ и ХС в крови. Концентрация β - и пре- β -липопротеинов снизилась на 36%, но эти изменения оказались недостоверными.

Дальнейшее увеличение дозы до 200 мг/кг оказало положительное влияние на все показатели, используемые для характеристики гипополипидемической активности исследуемых субстанций. Наблюдали дальнейшее снижение уровня общих липидов в крови на 32%, концентрации β - и пре- β -липопротеинов на 46%, ТГ на 38% и ХС на 60%, при этом содержание ТГ полностью нормализовалось, а концентрация ХС оказалась даже достоверно ниже значений животных интактной группы на 39%.

Курсовое введение ТО в дозе 500 мг/кг не сопровождалось дальнейшим ростом эффективности гипополипидемического действия. Отмечалось, как и в дозе 200 мг/кг, снижение в сыворотке крови количества общих липидов и β - и пре- β -липопротеинов на 29% и 39% соответственно, нормализация уровня ТГ и ХС.

Таким образом, отчетливый гипохолестеринемический эффект проявлялся при курсовом применении ТО уже в дозе 10 мг/кг, так как в этой дозе содержание ХС не отличалось от значения этого показателя у животных без гиперлипидемии, но остальные показатели не претерпели серьезных изменений относительно нелеченных животных. При переходе к дозе 50 мг/кг сохранялась

такая же тенденция в изменении исследуемых показателей, но дополнительно отмечали снижение, хотя и недостоверное, концентрации общих липидов в крови. Видимое усиление эффективности гиполипидемического действия наблюдали при использовании ТО в дозе 100 мг/кг, так как помимо нормализации содержания ХС в крови, восстановился до нормальных значений уровень ТГ и достоверно снизилась концентрация в крови общих липидов, чего не отмечали при использовании ТО в более низких дозах. Дальнейшее улучшение показателей липидного обмена в крови отмечали при применении дозы 200 мг/кг, но эти значения достоверно не отличались от аналогичных показателей группы животных, получавших ТО в дозе 100 мг/кг. Дальнейшее увеличение дозы не вызвало усиления эффективности. Следовательно, оптимальная терапевтическая доза ТО, установленная на модели твиновой гиперлипидемии, составила 100 мг/кг.

В опытных группах животных, лечение которых проводили ТК, наблюдалась примерно та же картина, что и в случае использования ТО. Курсовое профилактическое введение ТК в дозе 10 мг/кг сопровождалось нормализацией уровня ХС в крови. Содержание общих липидов, ТГ и β - и пре- β -липопротеинов достоверно не менялось, по сравнению с контрольными значениями, и было выше интактного уровня на 123%, 241% и 60% соответственно.

В группе животных, получавших ТК в дозе 50 мг/кг, отмечали дальнейшее снижение концентрации ХС, относительно значений животных, леченных ТК в дозе 10 мг/кг, на 38% по отношению к контрольным величинам и уровня общих липидов на 29%. Остальные из исследуемых показателей остались на уровне контрольных значений.

Использование ТК в дозе 100 мг/кг сопровождалось достоверным снижением концентрации общих липидов в сыворотке крови на 37%, полностью нормализовался уровень ТГ и ХС в крови. Отмечали снижение концентрации β - и пре- β -липопротеинов, но эти изменения были недостоверными.

При использовании дозы 200 мг/кг наблюдали дальнейшее снижение уровня β - и пре- β -липопротеинов, которое составило 42%, по сравнению с контролем, при этом содержание ТГ и ХС, как и при применении дозы 100 мг/кг, не отличалось от интактного уровня.

В группе животных, получавших ТК в дозе 500 мг/кг, достоверно уменьшилось содержание общих липидов на 45%, β - и пре- β -липопротеинов на 46%, ХС на 30%. Уровень ТГ, как и ХС, в крови достиг уровня здоровых животных.

Таким образом, лечебно-профилактическое применение ТК на фоне твиновой гиперлипидемии меняло липидный спектр сыворотки крови подобно тому, как это происходило под влиянием ТО. ТК также проявляли гипохолестеринемический эффект уже в дозе 10 мг/кг. Усиление эффективности гиполипидемического действия, выражающееся в улучшении остальных показателей липидного обмена сыворотки, отмечали при переходе к дозе 100 мг/кг, так как помимо нормализации содержания ХС в крови, восстанавливался до нормальных значений и уровень ТГ. Дальнейшее увеличение дозы до 200 мг/кг и 500 мг/кг сопровождалось некоторым улучшением состояния исследуемых показателей, но эти изменения, как и при введении ТО, достоверно не отличались от изменений показателей животных, которым вводили ТК в дозе 100 мг/кг. Следовательно, оптимальная терапевтическая доза для ТК также составила 100 мг/кг.

3.3 Изучение гиполипидемического действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы при алиментарной гиперлипидемии

3.3.1 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на состояние липидного обмена при алиментарной гиперлипидемии

Как видно из представленных данных (таблица 3.3.1.1), в крови животных контрольной группы, получавших холестериновую диету, отмечалось развитие гиперхолестеринемии, о чём свидетельствовало повышение содержания ОХС на 40%, при этом холестерин β -липопротеинов увеличился на 127%. Достоверных же отличий по отношению к здоровым животным в содержании холестерина α -липопротеинов крови не отмечалось. Уровень β - и пре- β -липопротеинов поднялся на 37%, при этом содержание ТГ оставалось таким же, как и у интактных животных. Это может свидетельствовать о большем возрастании доли именно β -липопротеинов (ЛПНП). Полученные данные согласуются с мнением других исследователей, которые указывают на то, что у животных с экспериментальным атеросклерозом, независимо от способа его воспроизведения, наблюдается всегда выраженная гипер- β -липопротеинемия и, в меньшей степени, гиперпре- β -липопротеинемия. Значительно не изменилась и концентрация общих липидов крови – отмечали некоторую тенденцию к увеличению их количества относительно интактных животных, но эти изменения не были достоверными.

Таблица 3.3.1.1 – Влияние суммы триглицероидных кислот из плодов облепихи и клюквы на состояние показателей липидного обмена в крови на фоне алиментарной гиперлипидемии

Группы животных	Показатели												
	Общие липиды крови, г/л		β- и пре-β-липопротеины крови, г/л		Холестерин крови, ммоль/л		Холестерин α-липопротеинов крови, ммоль/л		Холестерин β-липопротеинов крови, ммоль/л		ТГ крови, ммоль/л		Индекс атерогенности
	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	
Интактные, n=8	2,29 ±0,453	-	0,89 ±0,162	-	1,73 ±0,288	-	0,86 ±0,112	-	0,47 ±0,216	-	0,88 ±0,303	-	1,0
Контроль, n=8	2,67 ±0,531	+16	1,22 ±0,267	+37 ^Δ	2,43 ±0,340	+40 ^Δ	0,97 ±0,121	+13	1,07 ±0,341	+127 ^Δ	0,82 ±0,313	-7	1,5
ТО, 10 мг/кг, n=8	2,61 ±0,990	-2	1,23 ±0,353	+38 ^Δ	2,66 ±0,519	+54 ^Δ	1,02 ±0,113	+19 ^Δ	1,26 ±0,414	+168 ^Δ	0,83 ±0,362	+1	1,6
ТО, 100 мг/кг, n=8	2,16 ±1,102	-19 -39α	1,15 ±0,592	-6	1,65 ±0,519	-32* -42α	0,81 ±0,224	-16	0,47 ±0,384	-56* -72α	0,81 ±0,301	-1	1,0
ТК, 10 мг/кг, n=8	2,99 ±0,731	+12	1,60 ±0,274	+80 ^Δ	2,46 ±0,621	+42 ^Δ	0,95 ±0,128	-2	1,15 ±0,693	+145 ^Δ	0,77 ±0,221	-6	1,6
ТК, 100 мг/кг, n=8	2,61 ±0,933	0	0,99 ±0,285	-19	2,20 ±0,398	+27 ^Δ -24α	0,94 ±0,256	-3	0,90 ±0,224	+91 ^Δ -46α	0,80 ±0,284	-2	1,3
Ципрофибрат, 50 мг/кг, n=8	3,56 ±0,584	+33* +55 ^Δ	1,32 ±0,478	+48 ^Δ	2,89 ±0,508	+67 ^Δ	0,95 ±0,190	-2	1,67 ±0,694	+255 ^Δ	0,61 ±0,214	-33	2,0
Примечание: n – количество животных в группе; ^Δ – p<0,05 – данные достоверны по отношению к интактным значениям; * – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям; α – p<0,05 – данные достоверны по отношению к значениям группы животных, получавших ципрофибрат; p – уровень достоверной разницы.													

Особое место в регуляции липидного обмена при развитии гиперлипидемии отводится печени. Печень – основное место биосинтеза ХС, его окисления и выделения. С печенью связаны процессы этерификации ХС. Синтез и утилизация ФЛ происходит в печени или при её участии. Образование и выделение липопротеинов также осуществляется в печени. Увеличение уровня ХС и β -липопротеинов в крови больных атеросклерозом иногда связано с усилением эндогенного синтеза ХС в печени, что обуславливает повышенное образование атерогенных β -липопротеинов. Повышение уровня ХС в печени тогда приводит к гиперхолестеринемии и гипер- β -липопротеинемии, когда параллельно отмечается задержка в выведении ХС из организма и торможение его распада.

В условиях нашего эксперимента в печени наблюдалось значительное повышение содержания ХС и ТГ на 317% и 86% соответственно с одновременным снижением количества ФЛ в 1,5 раза (-35%). При этом коэффициент холестерин/фосфолипиды возрос в 7 раз (таблица 3.3.1.2).

Таблица 3.3.1.2 – Влияние суммы тритерпеноидных кислот из плодов облепихи и клюквы на состояние показателей липидного обмена в печени крыс на фоне алиментарной гиперлипидемии

Группы животных	Показатели					
	Холестерин печени, мг/г		Фосфолипиды печени, мг/ г		ТГ печени, мкмоль/г	
	M $\pm$ SD	$\Delta\%$	M $\pm$ SD	$\Delta\%$	M $\pm$ SD	$\Delta\%$
1	2	3	4	5	6	7
Интактные, n=8	2,3 $\pm 0,69$	–	20,9 $\pm 2,33$	–	23,1 $\pm 5,81$	–
Контроль, n=8	9,6 $\pm 2,38$	+317 ^Δ	13,5 $\pm 2,19$	-35 ^Δ	42,9 $\pm 8,52$	+86 ^Δ
ТО, 10 мг/кг, n=8	6,5 $\pm 1,00$	-32* +183 ^Δ	16,1 $\pm 2,60$	-23 ^Δ	21,5 $\pm 3,38$	-50*

Окончание таблицы 3.3.1.2

1	2	3	4	5	6	7
ТО, 100 мг/кг, n=8	5,5 ±1,52	-43* +139 ^Δ	18,3 ±1,69	+36*	12,3 ±3,92	-71* -47 ^Δ
ТК, 10 мг/кг, n=8	5,9 ±2,52	-39* +156 ^Δ	15,1 ±3,20	-28 ^Δ	20,5 ±2,65	-52*
ТК, 100 мг/кг, n=8	6,2 ±1,78	-35* +170 ^Δ	16,1 ±3,80	-23 ^Δ	14,4 ±3,11	-66* -38 ^Δ
Ципрофибрат, 50 мг/кг, n=8	7,0 ±1,81	-27* +204 ^Δ	14,8 ±2,82	-29 ^Δ	31,1 ±7,55	-27*
Примечание: n – количество животных в группе; ^Δ – p<0,05 – данные достоверны по отношению к интактным значениям; * – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы.						

Таким образом, алиментарная гиперлипидемия характеризовалась значительным нарушением в обмене липидов и липопротеинов (дислипидопроteinемия атерогенного характера), отражающимся в подъёме уровня ХС в сыворотке крови (гиперхолестеринемия) и печени, увеличением содержанием β- и пре-β-липопротеинов крови, ростом количества ХС в β-липопротеинах, содержания ТГ в печени с одновременным снижением содержания ФЛ в печени.

Лечебно-профилактическое введение ТО в дозе 10 мг/кг привело к достоверному снижению содержания ХС в печени на 32%, хотя уровня нормы при этом достигнуто не было. Содержание же ТГ в печени снизилось на 50% и полностью нормализовалось, так как отсутствовали достоверные отличия между значениями данной опытной группы и интактными животными. В данной дозе (10 мг/кг) тритерпеноидные соединения облепихи не оказали существенного влияния на показатели липидного обмена в сыворотке крови.

Увеличение дозы ТО до 100 мг/кг способствовало снижению соответственно на 32% и 56%, по сравнению с контролем, и полной нормализации содержания ОХС и холестерина β -липопротеинов в крови. Количество ХС в печени уменьшилось на 43%, но интактных значений так и не достигло. В отношении количества β - и пре- β -липопротеинов отмечается тенденция к их снижению, и их значения достоверно не отличались от нормы. В силу данных изменений индекс атерогенности достиг 1,0, как и у интактных животных.

Лечебно-профилактическое влияние суммы ТК в дозе 10 мг/кг на состояние липидного обмена было следующим. Показатели липидного обмена в сыворотке крови не изменились относительно контрольных величин. В печени уровень ХС снизился на 39%, ТГ на 52%, причем содержание ТГ полностью восстановилось до нормы. ФЛ по сравнению с контролем, т.е. животными салментарной гиперлипидемией, выросли на 12%, но эти изменения носили недостоверный характер.

С увеличением дозы ТК до 100 мг/кг не отмечали значительного роста эффективности действия в отношении показателей липидного обмена в крови – некоторое уменьшение значения индекса атерогенности за счет невыраженного снижения уровня ОХС и холестерина β -липопротеинов, которое сопровождало применение ТК в дозе 100 мг/кг, но эти изменения были недостоверными. В печени же уровень ХС снизился на 35% ($p < 0,05$), а ФЛ – повысился на 19% ($p > 0,05$). Коэффициент холестерин/фосфолипиды снизился в 1,8 раза. Содержание ТГ печени, как и в случае с ТО в дозе 100 мг/кг, уменьшилось, относительно контроля, на 66% и было меньше значений интактных крыс на 38%.

Введение животным препарата сравнения ципрофибрат в дозе 50 мг/кг значительно уступало по гиполипидемическому действию исследуемым объектам (ТО и ТК). Из всего изученного спектра биохимических показателей нормализовалось лишь содержание ТГ в печени.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что в условиях хронической алиментарной гиперлипидемии лечебно-профилактическое введение тритерпеновых кислот плодов облепихи и плодов клюквы в дозе 100 мг/кг оказывает нормализующее влияние на состояние показателей липидного обмена в крови и печени, проявляя отчетливый гипохолестеринемический эффект, более выраженный у ТО. По сумме исследуемых показателей и ТО, и ТК по эффективности превышают действие препарата сравнения – ципрофибрата.

Полученные результаты опытов послужили основанием для проведения более углубленных исследований фармакологической активности тритерпеновых кислот плодов облепихи и плодов клюквы с экспериментальной моделью алиментарной гиперлипидемии, а также выяснения некоторых сторон механизма гиполипидемического действия на интактных животных.

3.3.2 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на состояние белкового и углеводного обмена при алиментарной гиперлипидемии

Как следует из данных, представленных в таблицах 3.3.2.1 и 3.3.2.2, алиментарная гиперлипидемия сопровождалась нарушением белково-синтетической функции печени, о чём свидетельствовало снижение содержания общего белка в печени на 62% и в сыворотке крови – на 39%, по сравнению с интактными животными, уровень нуклеиновых кислот понизился на 33%.

Среди показателей углеводного обмена в сыворотке крови определяли содержание глюкозы, которое повысилось, по сравнению со здоровыми животными, на 121% (таблица 3.3.2.2).

Введение же тритерпеноидных кислот облепихи и клюквы в дозе 10 мг/кг привело к значительному повышению содержания белка (+222% и +148%) и нуклеиновых кислот (+34% и +30%) в печени, по отношению к контролю. Аналогичная картина наблюдалась и при введении дозы 100 мг/кг тритерпеноидов облепихи и тритерпеноидов клюквы: прирост общего белка печени составил 271% и 266% соответственно, и нуклеиновых кислот – 60% и 38%, по отношению к контролю. При этом содержание белка оказалось даже достоверно выше, чем у интактных крыс на 40% и 38% соответственно при введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг. Содержание нуклеиновых кислот в печени и концентрация общего белка в сыворотке крови нормализовались во всех опытных группах животных, которым вводили тритерпеновые соединения.

Полученные результаты позволяют предположить наличие стимулирующего влияния изучаемых тритерпеноидных соединений на процессы биосинтеза белка в клетке. Стимулирующее действие тритерпеноидов на белково-синтетическую функцию более выражено в дозе 100 мг/кг. За счет этого эффекта тритерпеноидных кислот из плодов облепихи и клюквы, возможно, и проявляется способность к снижению накопления триглицеридов в печени, которое наблюдалось при введении тритерпеновых кислот, поскольку

известно, что одной из причин повышения содержания триглицеридов в печени является снижение синтеза апопротеинов пре- β -липопротеинов [9].

Таблица 3.3.2.1 – Влияние суммы тритерпеноидных кислот из плодов облепихи и клюквы на состояние показателей белкового обмена в печени крыс на фоне алиментарной гиперлипидемии

Группы животных	Показатели			
	Общий белок печени, мг/г		Нуклеиновые кислоты, мг/г	
	M $\pm$ SD	$\Delta\%$	M $\pm$ SD	$\Delta\%$
Интактные, n=8	233,9 $\pm$ 50,99	–	60,1 $\pm$ 8,25	–
Контроль, n=8	88,3 $\pm$ 27,43	-62 Δ	40,1 $\pm$ 11,37	-33 Δ
ТО, 10 мг/кг, n=8	283,9 $\pm$ 63,26	+222*	53,8 $\pm$ 2,58	+34*
ТО, 100 мг/кг, n=8	327,9 $\pm$ 59,78	+271* +40 Δ	64,3 $\pm$ 8,38	+60*
ТК, 10 мг/кг, n=8	218,5 $\pm$ 62,22	+148*	52,1 $\pm$ 8,78	+30
ТК, 100 мг/кг, n=8	323,2 $\pm$ 36,47	+266* +38 Δ	55,3 $\pm$ 18,17	+38
Ципрофибрат, 50 мг/кг, n=8	123,9 $\pm$ 33,63	-47 Δ	40,4 $\pm$ 5,87	-33 Δ
Примечание: n – количество животных в группе; Δ – p<0,05– данные достоверны по отношению к интактным значениям; * – p<0,05– данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы.				

Введение препарата сравнения ципрофибрат не привело к нормализации содержания общего белка и нуклеиновых кислот в печени, которые остались на уровне значений контрольной группы. В сыворотке крови под влиянием данного препарата отмечалось увеличение содержания белка в крови на 55%, по отношению к контролю (таблица 3.3.2.2).

Таким образом, тритерпеноиды облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг способствовали более значительному восстановлению белково-синтетической функции печени, по сравнению с ципрофибратом в дозе 50 мг/кг.

Исследования по изучению влияния ТО и ТК в двух дозах на содержание глюкозы в сыворотке крови в условиях алиментарной гиперлипидемии выявили достоверное снижение ее концентрации в дозе 100 мг/кг на 44% и 40%

соответственно, по сравнению с контрольными значениями (таблица 3.3.2.2). Использование ТО и ТК в дозе 10 мг/кг не оказало влияния на гипергликемию, сопровождающую алиментарную гиперлипидемию. В группе препарата сравнения уровень глюкозы остался неизменным относительно показателя контрольной группы.

Таблица 3.3.2.2 – Влияние суммы тритерпеноидных кислот из плодов облепихи и клюквы на состояние показателей белкового и углеводного обменов в сыворотке крови крыс на фоне алиментарной гиперлипидемии

Группы животных	Показатели					
	Общий белок крови, г/л		Тимоловая проба, ед. SH		Глюкоза крови, ммоль/л	
	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Интактные, n=8	89,2±16,74	–	7,4±2,51	–	2,8±0,37	–
Контроль, n=8	54,4±5,63	-39 ^Δ	6,8±2,71	-8	6,20±1,56	+121 ^Δ
ТО, 10 мг/кг, n=8	80,0±5,44	+47*	7,0±1,99	+3	5,9±1,22	+109 ^Δ
ТО, 100 мг/кг, n=8	79,4±6,01	+46*	6,6±1,64	-3	3,5±0,68	-44*
ТК, 10 мг/кг, n=8	74,2±9,81	+36*	6,5±1,39	-4	6,4±0,83	+129 ^Δ
ТК, 100 мг/кг, n=8	81,7±5,65	+50*	8,1±2,40	+19	3,7±0,076	-40*
Ципрофibrат, 50 мг/кг, n=8	84,5±7,92	+55*	7,3±1,12	+5	6,3±1,00	+125 ^Δ
Примечание: n – количество животных в группе; Δ – p<0,05– данные достоверны по отношению к интактным значениям; * – p<0,05– данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы.						

Таким образом тритерпеноидные кислоты облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг, применяемые на фоне алиментарной гиперлипидемии, стимулируют белково-синтетические процессы, и их прием сопровождается гипогликемическим эффектом.

3.4 Влияние суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы на показатели липидного и углеводного обменов при курсовом введении здоровым животным

Для более детального изучения особенностей фармакодинамики исследуемых соединений нами проведена оценка их влияния на динамику изменения ряда показателей липидного и углеводного обменов при курсовом двухмесячном введении в дозе 100 мг/кг. Определение показателей проводили перед началом эксперимента (исходные значения), через 2 недели, 1 месяц и 2 месяца от начала введения. При оценке исходного уровня исследуемых показателей установлено, что между значениями всех опытных групп отсутствуют достоверные отличия (таблица 3.4.1). Через 2 недели введения ТО и ТК значения всех исследуемых показателей не изменились, так как отсутствовали достоверные отличия от показателей интактной группы и исходных значений в пределах одной группы.

Промежуточное исследование на тридцатые сутки применения субстанций показало, что введение ТО привело к достоверному, по сравнению с контролем, уменьшению концентрации триглицеридов в крови на 26%. Причем данное значение оказалось достоверно ниже исходного уровня и уровня в предыдущий период исследования (2 недели) на 17% и 16%, соответственно. Концентрация холестерина β -липопротеинов крови уменьшилась достоверно, по отношению к исходному уровню, на 19%, при этом это значение не отличалось от показателей контрольной группы. В группе животных, получавших ТК в течение месяца, также отмечено снижение концентрации триглицеридов в крови на 21%, по сравнению с контролем, и уменьшение концентрации холестерина β -липопротеинов на 13%, по отношению к исходным значениям.

Через 2 месяца после введения тритерпеноидов из плодов облепихи наблюдалась картина, аналогичная предыдущему периоду наблюдения – снижение уровня триглицеридов в крови как по отношению к контрольным (на 24%), так и по отношению к исходному уровню (на 15%).

Таблица 3.4.1 – Влияние курсового введения ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на показатели липидного и углеводного обменов в крови

Показатели		Группы животных				
		Контроль, n=8	ТО, 100 мг/кг, n=8		ТК, 100 мг/кг, n=8	
		M±SD	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Общий холестерин крови, ммоль/л	исход.	1,79±0,380	1,86±0,254	+4	1,82±0,193	+2
	2 нед	1,82±0,188	1,63±0,121	-10	1,67±0,099	-8
	1 мес	1,82±0,158	1,68±0,086	-8	1,70±0,126	-7
	2 мес	1,80±0,166	1,65±0,096	-8	1,65±0,082	-8
Свободный холестерин, ммоль/л	исход.	0,42±0,107	0,47±0,080	+12	0,46±0,075	+10
	2 нед	0,44±0,104	0,39±0,104	-11	0,41±0,074	-7
	1 мес	0,45±0,121	0,40±0,062	-11	0,38±0,066	-16
	2 мес	0,42±0,104	0,30±0,036	-29 ^Δ -36 [▲]	0,29±0,055	-31 ^Δ -37 [▲]
Холестерин α-липопротеинов крови, ммоль/л	исход.	0,85±0,165	0,79±0,085	-7	0,73±0,058	-14
	2 нед	0,83±0,117	0,74±0,100	-10	0,75±0,085	-9
	1 мес	0,78±0,086	0,74±0,082	-5	0,76±0,075	-3
	2 мес	0,76±0,114	0,80±0,133	+5	0,82±0,101	+8
Холестерин β-липопротеинов крови, ммоль/л	исход.	0,66±0,154	0,78±0,121	+18	0,74±0,049	+12
	2 нед	0,67±0,113	0,68±0,093	+2	0,70±0,091	+5
	1 мес	0,72±0,093	0,63±0,089	-19 [▲]	0,64±0,086	-13 [▲]
	2 мес	0,69±0,094	0,61±0,044	-22 [▲]	0,63±0,073	-14 [▲]
Свободный глицерин, ммоль/л	исход.	0,09±0,013	0,08±0,023	-11	0,08±0,021	-11
	2 нед	0,09±0,019	0,08±0,026	-11	0,09±0,044	0
	1 мес	0,10±0,014	0,09±0,023	-10	0,08±0,036	-20
	2 мес	0,10±0,015	0,08±0,022	-20	0,09±0,016	-10
Триглицериды крови, ммоль/л	исход.	0,86±0,159	0,85±0,064	-1	0,86±0,074	0
	2 нед	0,89±0,095	0,83±0,073	-7	0,81±0,055	-9
	1 мес	0,94±0,103	0,70±0,084	-26 ^Δ -17 [▲] -16 [•]	0,74±0,074	-21 ^Δ -14 [▲]
	2 мес	0,95±0,157	0,72±0,076	-24 ^Δ -15 [▲]	0,68±0,048	-28 ^Δ -21 [▲]
Свободные жирные кислоты, ммоль/л	исход.	0,80±0,099	0,79±0,122	-1	0,85±0,058	-6
	2 нед	0,84±0,110	0,75±0,117	-10	0,87±0,216	+4
	1 мес	0,88±0,092	0,80±0,153	-9	0,80±0,146	-9
	2 мес	0,89±0,080	0,68±0,094	-24 ^Δ	0,70±0,124	-21 ^Δ
ФЛ, ммоль/л	исход.	1,35±0,113	1,40±0,060	+4	1,36±0,097	+1
	2 нед	1,35±0,104	1,37±0,090	+2	1,36±0,083	+1
	1 мес	1,36±0,078	1,39±0,104	+2	1,41±0,099	-4
	2 мес	1,33±0,093	1,41±0,126	+6	1,40±0,086	-5
Глюкоза, ммоль/л	исход.	4,36±0,288	4,29±0,259	-2	4,41±0,476	-1
	2 нед	4,06±0,149	4,58±0,133	+11	4,53±0,256	+12
	1 мес	4,63±0,296	4,52±0,283	-2	4,49±0,210	-3
	2 мес	4,50±0,248	3,53±0,380	-22 ^Δ -18 [▲] -22 [•]	3,49±0,353	-22 ^Δ -21 [▲] -22 [•]

Окончение таблицы 3.4.1

Примечание: n – количество животных в группе;

Δ – $p < 0,05$ – данные достоверны по отношению к контрольным значениям в соответствующий период наблюдения;

• – $p < 0,05$ – данные достоверны по отношению к предыдущему периоду наблюдения в пределах одной группы;

$\blacktriangle$ – $p < 0,05$ – данные достоверны по отношению к исходным значениям в пределах одной группы;

p – уровень достоверной разницы.

Концентрация холестерина β -липопротеинов крови была достоверно ниже по отношению к исходному уровню на 22%.

После введения ТК в дозе 100 мг/кг в те же сроки наблюдения характер изменений соответствовал изменениям в группе животных, которым вводили ТО, уровень триглицеридов был ниже значений в контрольной группе на 28% и исходных значений на 21%, концентрация холестерина β -липопротеинов, как и после месяца введения, достоверно отличалась только от исходного уровня (-14%).

Помимо вышеуказанных изменений к концу второго месяца введения исследуемых субстанций отмечено достоверное снижение уровня свободного ХС под влиянием ТО на 29% и ТК на 31%, а также концентрации в крови свободных жирных кислот на 24% и 21% соответственно. Причем в случае со свободным ХС значения достоверно отличались и от исходного уровня.

Исследование динамики изменения концентрации глюкозы в сыворотке крови под действием исследуемых тритерпеновых соединений показало наличие гипогликемического эффекта, проявляющегося через 2 месяца введения. Так введение ТО и ТК в дозе 100 мг/кг в обоих случаях привело к снижению концентрации глюкозы на 22%, по сравнению с контролем, и на 18% и 21%, по сравнению с исходными значениями соответственно, но

концентрация глюкозы осталась в пределах физиологической нормы для данного вида животных.

Как видно из данных, представленных в таблице 3.4.2, введение ТО и ТК в течение двух месяцев не привело к изменениям в содержании ХС, ФЛ и ТГ в печени.

Таблица 3.4.2 – Влияние курсового введения суммы тритерпеновых кислот из плодов облепихи и клюквы на состояние показателей липидного обмена в печени

Группы животных	Показатели					
	Холестерин печени, мг/г		Фосфолипиды печени, мг/ г		ТГ печени, мкмоль/г	
	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
1	2	3	4	5	6	7
Контроль, n=8	3,4 ±0,93	–	24,4 ±3,97	–	23,8 ±6,29	–
ТО, 100 мг/кг, n=8	2,9 ±0,22	-15	23,1 ±3,59	-5	20,1 ±2,61	-15
ТК, 100 мг/кг, n=8	3,0 ±0,55	-12	26,7 ±3,00	-9	17,8 ±6,69	-25
Примечание: n – количество животных в группе; ^Δ –p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы.						

Таким образом, курсовое введение ТО и ТК здоровым животным в дозе 100 мг/кг в течение двух месяцев не повлияло на концентрацию ОХС в крови (отмечалась незначительная тенденция к снижению), но привело к уменьшению уровня холестерина β-липопротеинов, по сравнению с исходной концентрацией. Гипотриглицеридемический эффект проявился в равной степени и у ТО, и ТК через месяц введения, сохраняясь до конца эксперимента. Кроме того, для обеих исследуемых субстанций к концу периода наблюдения

было характерным снижение уровня свободного ХС, свободных жирных кислот и глюкозы в крови.

3.5 Заключение

Полученные результаты определения острой токсичности исследуемых субстанций на крысах позволяют отнести их по классификации Hodge Н.С., Sterner L.H. к 6 классу токсичности – относительно безвредным веществам. Состояние животных, поведение, динамика изменения массы, макроскопическое строение органов не отличалось от контрольных животных.

Первичная оценка гиполипидемической активности ТО и ТК, выполненная на модели твиновой гиперлипидемии показала, что отчетливый гипохолестеринемический эффект проявлялся при курсовом применении ТО и ТК уже в дозе 10 мг/кг, что сопровождалось полной нормализацией уровня общего холестерина в крови, остальные показатели не претерпели серьезных изменений относительно значений нелеченных животных. Отчетливое усиление эффективности гиполипидемического действия наблюдали при использовании ТО и ТК в дозе 100 мг/кг, так как помимо нормализации содержания ХС в крови, восстановился до нормальных значений уровень ТГ, а также достоверно снизилась концентрация в крови общих липидов, чего не отмечали при использовании ТО в дозах 10 мг/кг и 50 мг/кг, а ТК в дозе 10 мг/кг. Дальнейшее улучшение некоторых показателей липидного обмена в крови по отношению к контролю отмечали при применении исследуемых субстанций в дозе 200 мг/кг, но эти значения достоверно не отличались от аналогичных показателей группы животных, получавших ТО в дозе 100 мг/кг. Дальнейшее увеличение используемых дозировок до 500 мг/кг сопровождалось положительными сдвигами ряда показателей, но эти изменения, как и при введении дозы 200 мг/кг, достоверно не отличались от значений животных, получавших субстанции в дозе 100 мг/кг. Соответственно оптимальная терапевтическая доза ТО и ТК, оказывающая влияние на большинство исследуемых показателей, составила 100 мг/кг.

Изучение эффективности на фоне хронической алиментарной гиперлипидемии выполняли при введении ТО и ТК в дозах 10 мг/кг (доза, на фоне введения которой было зарегистрировано достоверное гипохолестеринемическое действие на твиновой модели) и 100 мг/кг (оптимальная терапевтическая доза, установленная на твиновой модели).

Лечебно-профилактическое введение ТО и ТК в дозе 10 мг/кг не оказало существенного влияния на показатели липидного обмена в сыворотке крови. В печени отмечали достоверное снижение содержания холестерина и ТГ с полной нормализацией уровня последнего, без влияния на содержание фосфолипидов. При использовании ТО в дозе 100 мг/кг, как и в случае с твиновой моделью, отмечали увеличение эффективности: нормализация концентрации холестерина (общего) и холестерина β -липопротеинов крови и как следствие индекс атерогенности достиг уровня интактных животных и составил 1,0. С увеличением дозы ТК до 100 мг/кг в условиях алиментарной гиперлипидемии не отмечали значительного роста эффективности действия в отношении показателей липидного обмена в крови – некоторое уменьшение значения индекса атерогенности за счет невыраженного снижения уровня ОХС и холестерина β -липопротеинов, но эти изменения были недостоверными.

Таким образом, сравнительная оценка эффективности действия ТО и ТК при их использовании на фоне атерогенной диетической нагрузки показала, что в дозе 10 мг/кг обе субстанции оказывают равноценное действие на показатели липидного обмена в печени и не влияют на измененные маркеры в крови. В дозе 100 мг/кг ТО более эффективно, чем ТК снижает уровень общего холестерина и холестерина β -липопротеинов в крови, так под действием ТО эти показатели нормализовались и достоверно не отличались от интактного уровня, а при использовании ТК прослеживалась динамика к снижению их значений, но эти изменения не были достоверными.

Введение животным препарата сравнения ципрофибрат в дозе 50 мг/кг значительно уступало по гиполипидемическому действию исследуемым объектам. Из всего изученного спектра биохимических показателей липидного

обмена под влиянием фибрата нормализовалось лишь содержание ТГ в печени. Уровень в крови холестерина и холестерина β -липопротеинов был достоверно ниже по сравнению со значениями животных, которым вводили ципрофибрат, при использовании ТО и ТК соответственно на 42% и 24%, 72% и 46%.

Алиментарная гиперлипидемия сопровождается нарушением белково-синтетической функции печени и гипергликемией, а введение тритерпеноидных кислот облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг, стимулируют белково-синтетические процессы, и их прием сопровождается гипогликемическим эффектом.

Для более детального изучения особенностей фармакодинамики исследуемых соединений нами изучено их влияние на динамику изменения ряда показателей липидного и углеводного обменов при курсовом двухмесячном введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг здоровым животным. Введение ТО и ТК здоровым животным в течение двух месяцев не повлияло на концентрацию ОХС в крови (отмечалась незначительная тенденция к снижению), но привело к уменьшению уровня холестерина β -липопротеинов, по сравнению с исходной концентрацией. Гипотриглицеридемический эффект проявился в равной степени и у ТО, и ТК через месяц введения, сохраняясь до конца эксперимента. Кроме того, для обеих исследуемых субстанций к концу периода наблюдения было характерным снижение уровня свободного ХС, свободных жирных кислот и глюкозы в крови.

ГЛАВА 4 ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МЕХАНИЗМОВ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОИДОВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ

4.1 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на желчеобразовательную и желчсекреторную функции печени у здоровых животных

Курсовое введение ТО в течение 10 дней в дозе 100 мг/кг здоровым животным (таблица 4.1.1) вызвало достоверное, по сравнению с контрольными животными, которым вводили эквивалентное количество растворителя, увеличение концентрации в желчи желчных кислот на 42% и общего количества желчных кислот, выделившихся с желчью за 3 часа, на 52%. Такие показатели, как общее количество выделившейся желчи и ХС, концентрация ХС в желчи остались на уровне контрольных животных, так как достоверно не отличались от аналогичных характеристик контрольных животных. В связи с повышением концентрации в желчи желчных кислот увеличилось значение холято-холестеринового коэффициента на 39%, что свидетельствует о положительном изменении антилитогенных свойств желчи.

После введения ТК наблюдали достоверное, по отношению к контрольным животным, увеличение концентрации желчных кислот в желчи на 20% и соответственно их общего количества, выделившегося с желчью за 3 часа острого эксперимента, на 30%, и, как следствие, увеличение значения холято-холестеринового коэффициента на 25%. Остальные показатели, используемые для характеристики влияния ТК на желчевыделительную функцию печени, как и в случае с ТО, остались без изменений.

В группе животных, получавших препарат сравнения «Фламин», наблюдали увеличение общего количества желчи, выделившейся за 3 часа, на 62%. Одновременно достоверно, по сравнению с контрольными животными, снизилась концентрация желчных кислот и ХС в желчи на 29% и 30% соответственно, но в целом это не отразилось на общем количестве желчных

кислот и ХС, выделившихся за 3 часа эксперимента, так как эти показатели достоверно не отличались от контрольных.

Таблица 4.1.1 – Влияние ТО и ТК на желчеобразовательную и желчевыделительную функцию печени в норме

Показатели	Группы животных, n=6						
	Контроль- ные	ТО, 100 мг/кг		ТК, 100 мг/кг		Фламин, 12,4 мг/кг	
	M±SD	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Общее количество желчи за 3 ч. мг/100 г	522,4 ±74,75	560,3 ±59,51	+7	574,6 ±74,70	+10	848,4 ±77,85	+62 ^Δ
ЖК, мг%	704,5 ±48,83	1000,3 ±127,39	+42 ^Δ	844,2 ±49,72	+20 ^Δ	500,4 ±64,82	-29 ^Δ
Холестерин желчи, мг%	39,5 ±5,23	40,0 ±4,67	+1	37,9 ±5,56	-4	27,6 ±3,69	-30 ^Δ
Х/Х коэф.	18,0 ±1,87	25,0 ±4,03	+39 ^Δ	22,6 ±2,83	+25 ^Δ	18,2 ±1,09	+1
Общее количество ЖК за 3 ч., мг/100 г	3,66 ±0,46	5,56 ±0,517	+52 ^Δ	4,77 ±0,277	+30 ^Δ	4,25 ±0,622	+16
Общее количество холестерина за 3 ч., мг/100 г	0,20 ±0,033	0,22 ±0,039	+10	0,22 ±0,022	+10	0,23 ±0,038	+15
Примечание: n – количество животных в группе Δ–p<0,05– данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы; ЖК – желчные кислоты.							

Полученные данные показали, что применение официального средства растительного происхождения – фламина – у здоровых животных сопровождалось выраженным желчегонным эффектом, проявляющимся в

увеличении количества выделившейся желчи. Прирост объема секрета происходит преимущественно за счет водного компонента, так как этот эффект сопровождается достоверным снижением концентрации желчных кислот и ХС в собранной желчи, то есть ее разбавлением. Но это не приводит к уменьшению общего количества выводимых с желчью компонентов (ХС и желчных кислот).

При использовании тритерпеноидов облепихи и клюквы отмечается изменение состава желчи при сохранении скорости и объема секреции, а именно: увеличение концентрации желчных кислот при неизменном содержании ХС. В целом это сопровождается улучшением антилитогенных свойств желчи, о чем свидетельствует повышение значения холято-холестеринового коэффициента. Необходимо отметить, что стимуляция элиминации желчных кислот с желчью может являться одной из составляющих гипохолестеринемического действия исследуемых веществ и этот эффект более выражен при использовании ТО.

Таким образом, фламин в данных экспериментальных условиях в большей степени усиливает желчевыделительную функцию печени, а ТО и ТК стимулируют желчеобразовательную функцию печени у здоровых животных. Увеличение общего количества выделенных с желчью желчных кислот и повышение их концентрации в желчи, наблюдающееся при действии тритерпеновых веществ, свидетельствуют об усилении процессов синтеза в печени желчных кислот и усилении за счет этого экскреции ХС, что связано с переводом ХС в желчные кислоты, поскольку они синтезируются в печени из ХС при участии микросомальных ферментов.

4.2 Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на всасывание холестерина

Как известно, одной из составляющих механизма некоторых гиполипидемических препаратов является их способность образовывать в кишечнике труднорастворимые комплексы с липидами, в том числе и с ХС, не поддающиеся резорбции. Нами изучено влияние ТО и ТК на всасывание ХС из кишечника. В опытах на интактных крысах-самцах после однократного введения ХС (200 мг/кг) (контроль), ТО 100 мг/кг совместно с ХС в той же дозе, ТК и ХС в дозах, аналогичным предыдущим группам; определяли содержание ХС в крови подъязычной вены перед введением, через 2 и 4 часа после запаивания. Результаты исследования представлены в таблице 4.2.1.

Как видно из этих данных, достоверные отличия в содержании ХС в сыворотке крови у животных всех опытных групп перед началом эксперимента отсутствовали. У животных контрольной группы через 2 часа после введения ХС *per os* отмечали увеличение его концентрации в крови на 83%, а по прошествии четырех часов его уровень несколько понизился и достиг 1,64 ммоль/л, что выше исходного значения данной группы на 49%.

При введении животным ХС совместно с ТО концентрация ХС в крови была выше исходного значения через 2 часа на 86% и на 66% через 4 часа. Похожую динамику отмечали и при одновременном сочетанном введении ХС с ТК – превышение первоначального уровня ХС на 72% и 37% соответственно через 2 и 4 часа. При этом отсутствовали достоверные отличия в концентрации ХС между всеми опытными группами при исследовании через 2 и 4 часа после запаивания.

Таким образом, ТО и ТК не оказали влияния на процесс всасывания ХС из желудочно-кишечного тракта.

Таблица 4.2.1 – Влияние ТО и ТК на концентрацию холестерина в крови (при их совместном пероральном введении с холестерином)

Группы животных	Холестерин сыворотки крови, ммоль/л				
	исходный уровень	через 2 часа после введения холестерина		через 4 часа после введения холестерина	
	M±SD	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Контроль, n=6	1,10±0,274	2,01±0,399	+83°	1,64±0,298	+49°
ТО 100 мг/кг, n=6	1,02±0,108	1,90±0,329	+86°	1,70±0,276	+66°
ТК 100 мг/кг, n=6	1,15±0,156	1,98±0,332	+72°	1,58±0,224	+37°
Примечания: n – количество животных в группе, ° –p<0,05– достоверная разница по отношению к исходным значениям; p – уровень достоверной разницы.					

4.3. Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы на липолиз в жировой ткани лабораторных животных при курсовом введении

Формирование первичных и вторичных гиперлипидемий сопровождается изменениями показателей, характеризующих состояние липидного обмена, в основе которых лежат различные механизмы – стимуляция выхода липидов из депо в кровь, нарушение экскреции и утилизации ХС печенью, снижение активности постгепариновой липопротеинлипазы крови и другие.

Стимуляция липолиза и выброс продуктов гидролиза тканевых липидов зависит от состояния механизмов регуляции активности липолитических гидролаз. Различают несколько типов липаз, активность которых регулируется различными факторами: липаза, активируемая адреналином; липаза, действующая в нестимулированной ткани; липаза липопротеинная, активность которой повышается при инкубации с гепарином [70]. Жиромобилизующая

липаза осуществляет гидролиз триглицеридов, обеспечивает поступление в кровь неэтерифицированных жирных кислот с последующим их использованием в качестве энергетического материала. Липазу жировой ткани, кроме адреналина, активируют норадреналин, соматотропный гормон, адренокортикотропный гормон. Липопротеинная липаза обладает как липолитическим, так и липосинтетическим действием в отношении триглицеридов жировой ткани. Кроме гепарина, активность липопротеинлипазы повышает добавление в инкубационную среду инсулина и глюкозы [102, 186]. У человека с нормальным обменом веществ, не страдающего ожирением, и та, и другая липаза, будучи достаточно активными, в известной мере уравнивают процессы липогенеза и липосинтеза. На первой стадии внутриклеточного липолиза происходит гидролиз триглицеридов до диглицеридов, и эта медленная стадия лимитирует скорость всего процесса. Стимулирует его цАМФ, образующийся аденилатциклазой в ответ на гормональную стимуляцию. Мембрана жировой клетки обладает двумя типами рецепторов гормонов. С первыми взаимодействуют катехоламины (адреналин или норадреналин), усиливающие образование цАМФ, а значит, и липолиз, со вторыми взаимодействует инсулин, который снижает концентрацию цАМФ, противодействуя активации аденилатциклазы стимулирующими гормонами, и угнетает таким образом липолиз [283].

При исследовании интенсивности липолиза в жировой ткани, индуцированного введением адреналина, определяли концентрацию в крови одного из конечных продуктов гидролиза триглицеридов – глицерина. О влиянии соединений на липолитические процессы в клетках жирового депо животных судили по степени прироста концентрации данного метаболита. Кроме того, дополнительно регистрировали уровень глюкозы, в регуляции которого катехоламины принимают активное участие.

Парентеральное введение адреналина сопровождалось пятикратным ростом концентрации свободного глицерина в крови во всех экспериментальных группах. Данные изменения достоверно не отличались

между всеми опытными группами и контрольной группой животных (таблица 4.3.1).

Таблица 4.3.1 – Изменение уровня свободного глицерина в сыворотке крови после адреналиновой стимуляции на фоне курсового введения ТО и ТК

Группы животных	Свободный глицерин, ммоль/л		
	до	после	Δ
Контроль, n=8	0,124±0,036	0,516±0,106 [▼]	0,418±0,101
ТК, 100 мг/кг, n=8	0,086±0,016	0,591±0,109 [▼]	0,505±0,111
ТО, 100 мг/кг, n=8	0,143±0,028	0,66±0,077 [▼]	0,518±0,072
Фенофибрат, 12,5 мг/кг, n=8	0,139±0,043	0,624±0,065 [▼]	0,485±0,203
Примечания: n – количество животных в группе; [▼] – p<0,05 – достоверная разница по отношению к исходным значениям; p – уровень достоверной разницы; Δ – разница между значениями показателя до введения и после введения адреналина.			

Как видно из данных (таблица 4.3.2), введение адреналина сопровождалось прогнозируемым, но не достоверным, по отношению к исходному значению, ростом концентрации глюкозы в крови в большей части групп (контроль – 45%, ТК – 28%, ТО – 16%), за исключением животных, получавших фенофибрат. В группе животных, которым вводили препарат сравнения, напротив, отмечено развитие гипогликемии.

В механизмах поддержания пула липидов в крови большое значение имеет мобилизация липидов из жировых депо организма в результате активации липолитических механизмов, и некоторые гиполипидемические препараты (никотиновая кислота) способны подавлять выброс липидов путем подавления внутриклеточного липолиза [195].

Полученные нами результаты свидетельствуют, что на фоне приема ТО, ТК и фенофибрата не происходит нарушений в механизме аденилатциклазной активации липолиза, вызванной введением адреналина.

Таблица 4.3.2 – *Изменение уровня глюкозы в сыворотке крови после адреналиновой стимуляции на фоне курсового введения ТО и ТК*

Группы животных	Глюкоза, ммоль/л		
	до в/в инъекции адреналина	после в/в инъекции адреналина	Δ
Контроль, n=8	4,57±0,50	6,64±1,47	2,07±1,19
ТК, 100 мг/кг, n=8	4,29±0,49	5,48±1,08	1,19±0,42
ТО, 100 мг/кг, n=8	4,77±0,10	5,69±0,83	0,93±0,29
Фенофибрат, 12,5 мг/кг, n=8	4,33±0,03	3,15±0,90*▼	-1,18±0,32*▼
Примечания: n – количество животных в группе, * –p<0,05 – достоверная разница по отношению к контролю; ▼ –p<0,05 – достоверная разница по отношению к исходным значениям; p – уровень достоверной разницы; Δ – разница между значениями показателя после введения адреналина и до введения адреналина.			

В данных исследованиях установлено, что введение исследуемых субстанций и препарата сравнения сопровождается естественной активацией липолиза, причем ее уровень достоверно не отличается от изменений в контрольной группе животных. Таким образом, в данных экспериментальных условиях ТК, ТО и фенофибрат не оказали влияния на тканевой липолиз. Регистрация характера изменений уровня глюкозы, которые представляли интерес с позиции оценки влияния соединений на известные механизмы гуморальной регуляции уровня глюкозы в крови, которая через ряд ключевых

метаболизм имеет тесную связь с обменом липидов. Было установлено, что введение ТК и ТО не оказало влияния на изменение концентрации глюкозы в крови после адреналиновой инициации гипергликемии, а на фоне введения фенофибрата отмечена четкая картина нарушения физиологического механизма стимуляции выхода глюкозы в кровяное русло, так как вопреки ожидаемому стандартному сдвигу концентрации глюкозы в крови в сторону увеличения после инъекции адреналина, отмечали обратную картину – достоверное, по отношению к контролю, снижение ее концентрации.

Таким образом, курсовое введение ТО и ТК не оказывает влияния на гормонально зависимый липолиз в жировых депо животных и не оказывает влияния на механизмы поддержания уровня глюкозы в крови. Курсовое введение фенофибрата в дозе 12,5 мг/кг вызывает нарушение физиологических механизмов регуляции уровня глюкозы в крови и, также, не влияет на интенсивность адреналининдуцированного липолиза.

4.4 Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы на липолитическую активность сыворотки крови лабораторных животных при курсовом введении

В данной экспериментальной серии выполнено изучение еще одной возможной точки приложения действия веществ с гипополипидемической активностью – влияние на липолитическую активность в сыворотке крови при курсовом введении суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы.

Для оценки постгепариновой липолитической активности крови проводили определение степени прироста концентрации свободных жирных кислот и общей активности липазы в сыворотке крови после введения гепарина. Как видно из данных, представленных в таблице 4.4.1, после 30-дневного применения исследуемых веществ и препарата сравнения исходный уровень свободных жирных кислот и активности липазы достоверно не отличался во всех опытных группах.

Определение уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови животных контрольной группы после введения гепарина показало

достоверный, по отношению к исходному значению, двукратный рост концентрации.

Таблица 4.4.1 – Влияние 30-дневного перорального введения суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг на липолитическую активность крови крыс

Группы	Показатели					
	Свободные жирные кислоты, мг/дл			Липаза, ЕД/л		
	до	после	Δ	до	после	Δ
Контроль, n=8	0,63±0,11	1,19±0,14	0,56±0,17	14,17±1,61	18,18±1,59	4,02±0,41
ТК, 100 мг/кг, n=8	0,62±0,13	1,45±0,16*	0,84±0,19 *+50%	13,50±1,87	18,49±1,79	4,99±0,60 *+24%
ТО, 100 мг/кг, n=8	0,64±0,13	1,69±0,37*	1,05±0,28 *+88% ♦+25% ▼+28%	14,83±3,19	21,57±4,35	6,74±1,48 *+68% ♦+35% ▼+36%
Фенофибрат, 12,5 мг/кг, n=8	0,63±0,13	1,45±0,13*	0,82±0,19 *+46%	14,46±1,85	19,40±2,06	4,94±0,96 *+23%
Примечания: n – количество животных в группе; * –p<0,05– достоверная разница по отношению к контролю; ♦ –p<0,05– достоверная разница по отношению к группе животных, получавших ТК; ▼ –p<0,05 – достоверная разница по отношению к группе животных, получавших фенофибрат; p – уровень достоверной разницы. Δ – разница между значениями показателя после введения гепарина и до введения гепарина; Содержание свободных жирных кислот и активность липазы после введения гепарина достоверно отличаются от исходных значений во всех случаях.						

У животных опытной группы отмечали более выраженный подъем уровня свободных жирных кислот, превосходящий данный показатель контрольной группы после введения фенофибрата, ТК и ТО на 46%, 50% и 88% соответственно. Данные изменения коррелировали с приростом активности

липазы в крови опытных животных, которые составили по отношению к приросту в контрольной группе 23% после курсового введения фенофибрата, 24% после введения ТК и 68% после введения ТО.

В метаболизме и регуляции перераспределения экзогенных и эндогенных липидов огромная роль принадлежит липазам крови. Липопротеинлипаза, или внепеченочная липаза, обнаруживается, главным образом, в жировой ткани и скелетных мышцах, где она связана с гликозаминогликанами, локализованными на люминальной поверхности капиллярного эндотелия. Фермент практически отсутствует в крови, однако после инъекции гепарина связь перестает удерживать липопротеинлипазу, и она поступает в кровяное русло, где взаимодействует с хиломикронами и ЛПОНП, гидролизуя триглицериды до составляющих. После введения гепарина в крови происходит закономерный скачок уровня свободных жирных кислот и отмечается рост активности липазы крови. На фоне курсового применения суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы и препарата сравнения отмечен рост постгепариновой липолитической активности плазмы, по сравнению со значениями контрольной группы животных, в среднем на 68%, 24% и 23% соответственно, причем более выраженный в группе животных, получавших сумму тритерпеновых кислот облепихи, т.к. прирост активности липазы крови и концентрации свободных жирных кислот после введения гепарина был выше значений данных показателей в группе животных, получавших препарат сравнения, на 36% 28% соответственно, и животных, получавших сумму тритерпеновых кислот клюквы на 35% и 25% соответственно.

Таким образом, курсовое 30-дневное введение суммы тритерпеновых кислот облепихи (100 мг/кг), суммы тритерпеновых кислот клюквы (100 мг/кг) и фенофибрата (12,5 мг/кг) сопровождается потенцированием в сыворотке крови постгепариновой липолитической активности, более выраженным в группе животных, получавших тритерпеноиды облепихи.

4.5 Заключение

Одним из ключевых этапов при разработке новых лекарственных средств являются фармакодинамические исследования, позволяющие оценить основные механизмы специфической фармакологической активности препаратов. Исследования некоторых механизмов гиполипидемического и/или антисклеротического действия ТО и ТК выполнены на здоровых животных.

Учитывая ключевую роль печени в обмене различных классов липидов, утилизации и выведении холестерина, нами выполнено исследование желчеобразовательной и желчевыделительной функции при курсовом введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг здоровым животным и влияние этих соединений на экскрецию холестерина в сравнении с фламином.

При использовании тритерпеноидов облепихи и клюквы отмечается изменение состава желчи при сохранении скорости и объема секреции, а именно: увеличение концентрации желчных кислот при неизменном содержании холестерина. В целом это сопровождается улучшением антилитогенных свойств желчи, о чем свидетельствует повышение значения холято-холестеринового коэффициента. Увеличение общего количества выделенных с желчью желчных кислот и повышение их концентрации в желчи, наблюдающееся при действии тритерпеновых веществ, свидетельствуют об усилении процессов синтеза в печени желчных кислот и усилении за счет этого экскреции ХС, что связано с переводом ХС в желчные кислоты, поскольку они синтезируются в печени из ХС при участии микросомальных ферментов. Применение фламина у здоровых животных сопровождалось выраженным желчегонным эффектом, проявляющимся в увеличении количества выделившейся желчи. Прирост объема секрета происходит преимущественно за счет водного компонента, так как этот эффект сопровождается достоверным снижением концентрации желчных кислот и ХС в собранной желчи, то есть ее разбавлением. Но это не приводит к уменьшению общего количества выводимых с желчью компонентов (ХС и желчных кислот). Таким образом, стимуляция элиминации желчных кислот с желчью может являться одной из

составляющих гипохолестеринемического действия исследуемых веществ и этот эффект более выражен при использовании ТО.

Установлено, что курсовое 30-дневное введение суммы ТО (100 мг/кг), суммы ТК (100 мг/кг) и фенофибрата (12,5 мг/кг) сопровождается потенцированием в сыворотке крови постгепариновой липолитической активности, более выраженным в группе животных, получавших тритерпеноиды облепихи, и регистрируемой по увеличению в крови концентрации свободных жирных кислот после внутривенного введения крысам гепарина.

Нами установлено, что курсовое введение ТО и ТК не оказывает влияния на тканевой липолиз, а также не препятствует всасыванию холестерина из желудочно-кишечного тракта.

ГЛАВА 5 ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕЙОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ СУММЫ ТРИТЕРПЕНОИДОВ ИЗ ПЛОДОВ ОБЛЕПИХИ И КЛЮКВЫ

5.1 Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы

Атеросклероз это хроническое иммуновоспалительное заболевание, протекающее с участием иммунцитов и медиаторов воспалительного процесса и иммунологических реакций. Для процесса атерогенеза характерны фундаментальные закономерности, свойственные любому воспалению: воздействие повреждающего фактора, клеточная инфильтрация, фагоцитоз и формирование соединительной ткани. Проникающие в интиму моноциты превращаются в макрофаги и активно секретируют провоспалительные медиаторы (фактор некроза опухолей, интерлейкины, хемоаттрактанты). Макрофаги и тучные клетки выделяют факторы пролиферации гладкомышечных клеток и регулируют рост фиброатеромы [196, 218]. Наличие противовоспалительного компонента в механизме гиполипидемического средства может значительно повысить эффективность антисклеротической терапии. Учитывая ряд данных, свидетельствующих о наличии выраженной противовоспалительной активности тритерпеновых соединений [87, 183, 187, 190, 233] представилось интересным провести изучение противовоспалительной активности ТО и ТК при введении в дозе 100 мг/кг на моделях острого и хронического воспаления.

5.1.1 Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели острого каррагенинового отека

Результаты по изучению влияния курсового применения ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на фазу острого экссудативного воспаления на модели каррагенинового отека в сравнении с диклофенаком представлены в таблице 5.1.1.1. Как видно из данных, представленных в таблице 5.1.1.1, у животных контрольной группы субплантарное введение каррагенина вызвало интенсивную воспалительную реакцию, сопровождающуюся выраженной гиперемией и увеличением объема лапы на 0,60 см³.

Таблица 5.1.1.1 – Влияние курсового применения ТО и ТК на развитие каррагенинового отека лапы у крыс

Показатель	Группы животных, n=6						
	Контроль	ТО, 100 мг/кг		ТК, 100 мг/кг		Диклофенак, 8 мг/кг	
	M±SD	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Приростобъема лапы, см ³	0,60 ±0,187	0,45 ±0,138	-25	0,23 ±0,072	-62* -49▼	0,18 ±0,052	-70* -60▼
Примечания: n – количество животных в группе, * – p<0,05 – достоверная разница по отношению к контролю, ▼ – p<0,05 – достоверная разница по отношению к группе животных, получавших ТО; p – уровень достоверной разницы.							

При использовании ТО отмечали некоторую тенденцию к уменьшению степени отека, но эти изменения были недостоверны, по сравнению с контрольными значениями. Курсовое введение ТК в дозе 100 мг/кг значительно сдерживало развитие отека лапы у крыс, и увеличение объема лапы было достоверно ниже (на 62%) по отношению к значениям контрольной группы животных. Введение диклофенака сопровождалось снижением степени прироста объема лапы животных на 70%. Причем, эффективность ТК и диклофенака была достоверно выше эффективности ТО на 49% и 60% соответственно.

Таким образом полученные результаты показали, что на фоне каррагенинового отека ТК обладают противовоспалительным действием. При введении ТО отмечали снижение интенсивности отека лапки экспериментальных животных на 25%, но эти изменения не были достоверны по отношению к значениям контрольной группы. ТК более эффективно, чем

ТО, подавляют экссудативную реакцию, вызванную субплатарным введением каррагинина.

5.1.2 Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на модели хронического воспаления

После введения адьюванта наблюдалось развитие гиперемии и отека задней правой конечности, изменение походки, эффект «оберегания» при движении. При исследовании влияния ТО и ТК на интенсивность воспалительного процесса при использовании лечебной схемы введения на 25 сутки в группе контрольных животных отмечали увеличение объема правой лапки на 114% и левой на 60% по сравнению с исходными объемами (таблица 5.1.2.1). Введение ТК по лечебной схеме привело на 25 сутки к достоверному снижению прироста объема правой лапки, в результате чего средний объем правой лапки в данной группе животных был ниже значений контрольной группы на 24%. Оценка степени влияния на вторичное воспаление показало, что отмечалась тенденция к снижению отека, но данные изменения не носили достоверный характер. Использование диклофенака сопровождалось достоверным уменьшением объема правой и левой лапки, по сравнению с контролем, на 25% и 12% соответственно. При введении ТО достоверных изменений объемов снижения правой и левой лапки выявлено не было (таблица 5.1.2.1).

Исследования показали, что на 25 сутки адьювантный артрит сопровождался гематологическими сдвигами (таблица 5.1.2.2) – увеличением содержания лейкоцитов, которое было наиболее выраженным в контрольной группе и группе, получавшей ТО. Достоверное снижение данного показателя отмечали при введении ТК и диклофенака. Сдвига лейкоцитарной формулы отмечено не было.

Анализ данных показал, что при использовании лечебной схемы введения диклофенак уменьшал интенсивность первичной и вторичной воспалительной реакции, ТК уменьшал первичную реакцию и оказывал влияние на

формирование вторичного воспаления. Применение ТО в данных условиях не оказало достоверно значимого влияния на воспалительный процесс.

Таблица 5.1.2.1 – Влияние суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на степень адьювантного отека лапы крыс при лечебном применении

Группы животных, n=6		Объем лапы, см ³		
		Исходное значение	25 сутки	
		M±SD	M±SD	Δ%
Контроль	прав	1,95±0,079	4,18±0,095	+114°
	лев	1,90±0,060	3,04±0,276	+60°
ТО, 100 мг/кг	прав	1,85±0,068	3,76±0,218	+103°
	лев	1,92±0,068	2,95±0,341	+54°
ТК, 100 мг/кг	прав	1,96±0,086	3,18±0,214	+62° -24*
	лев	1,98±0,070	2,93±0,151	+48°
Диклофенак, 8 мг/кг	прав	1,82±0,068	3,12±0,286	+71° -25*
	лев	1,90±0,100	2,69±0,193	+42° -12*
Примечания: n – количество животных в группе, * – p<0,05 – достоверная разница по отношению к контролю, ° – p<0,05 – достоверная разница по отношению к исходным значениям, p – уровень достоверной разницы.				

Таким образом, введение тритерпеноидов клюквы и облепихи по лечебной схеме в дозе 100 мг/кг сопровождалось развитием противовоспалительного эффекта, более выраженного у тритерпеноидов клюквы и проявляющегося уменьшением первичного и вторичного отека. Введение тритерпеноидов клюквы сопровождалось достоверным снижением уровня лейкоцитоза, по сравнению с контрольной группой животных.

Онкометрические исследования динамики прироста объема правой лапы у контрольных животных на третьи сутки после введения адьюванта показало

почти двукратное, по отношению к исходным значениям, увеличение объема в контрольной группе (таблица 5.1.2.3).

Таблица 5.1.2.2 – Влияние суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на лейкоцитарную формулу крови при лечебном применении

Показатели	Группы животных, n = 6				
	Интактные	Контроль	ТО, 100 мг/кг	ТК, 100 мг/кг	Диклофенак, 8 мг/кг
Лейкоциты, 10 ⁹ кл/л	7,69 ±0,817	16,28 ±2,201 ^Δ	14,78 ±2,432 ^Δ	12,69 ±2,149*	11,48 ±1,793*
Лимфоциты, %	61,73 ±9,164	66,62 ±7,626	62,76 ±6,214	63,57 ±4,358	59,26 ±4,696
Моноциты, %	5,29 ±0,792	5,47 ±0,497	5,59 ±0,797	4,70 ±0,609	5,55 ±0,738
Гранулоциты, %	32,98 ±8,444	27,9 ±7,390	31,65 ±6,078	31,73 ±4,204	35,19 ±4,713
Примечание: n – количество животных в группе; * –p<0,05 – достоверная разница по отношению к контролю; ^Δ –p<0,05 – достоверная разница по отношению к интактной группе; p – уровень достоверной разницы.					

При лечебно-профилактическом введении субстанций тритерпеноидов отмечали снижение объема правой лапы по отношению к контрольным значениям при введении ТК, ТО и диклофенака на 24%, 12% и 24% соответственно. Изменения в объеме левой лапки на 3 сутки не выявлены во всех группах животных. На 14 сутки после введения адъюванта онкометрическая оценка состояния правой лапки показала аналогичную третьим суткам картину. Оценка интенсивности вторичной воспалительной реакции, регистрируемая по изменению объема контрлатеральной (левой) лапки показала прирост объема в контрольной группе на 27%, по сравнению с исходным. Введение исследуемых соединений и диклофенака сопровождалось предупреждением вторичного иммунного воспаления, так как объем левой лапки в данных группах остался на уровне исходных значений.

Как видно из данных, представленных в таблице 5.1.2.3, при лечебно-профилактическом использовании тритерпеноидов на 14 день после моделирования адьювант-индуцированного артрита отмечали достоверное, по отношению к интактным животным, увеличение количества лейкоцитов без изменения соотношения между их основными субпопуляциями во всех опытных группах. При этом в группах, получавших ТК и диклофенак, уровень лейкоцитов был достоверно ниже значений контрольной группы.

Таблица 5.1.2.3 – Влияние суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на степень адьювантного отека лапы крыс при лечебно-профилактическом применении

Группы животных, n=6		Объем лапы, см ³				
		Исходное значение	3 сутки		14сутки	
		M±SD	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Контроль	прав	1,93±0,054	3,91±0,149	+103°	4,15±0,167	+115°
	лев	1,91±0,039	1,94±0,058	–	2,43±0,121	+27°
ТО, 100 мг/кг	прав	1,94±0,090	3,41±0,120	+76° -12*	3,66±0,193	+89° -11*
	лев	1,95±0,080	1,98±0,086	+2	2,13±0,116	-12
ТК, 100 мг/кг	прав	1,82±0,033	2,96±0,153	+63° -24*	3,12±0,176	+71° -24*
	лев	1,85±0,048	1,88±0,068	-3	1,96±0,146	-19*
Диклофенак, 8 мг/кг	прав	1,95±0,079	2,98±0,108	+53° -24*	3,16±0,159	+62° -23*
	лев	1,96±0,057	2,00±0,055	+3	2,12±0,075	-13*
Примечания: n – количество животных в группе, * –p<0,05 – достоверная разница по отношению к контролю, ° –p<0,05 – достоверная разница по отношению к исходным значениям, p – уровень достоверной разницы.						

Таблица 5.1.2.4 – Влияние суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы на лейкоцитарную формулу крови при лечебно-профилактическом применении

Показатели	Группы животных				
	Интактные	Контроль	ТО, 100 мг/кг	ТК, 100 мг/кг	Диклофенак, 8 мг/кг
Лейкоциты, 10 ⁹ кл/л	7,95±0,953	15,45±1,122 ^Δ	14,77±1,309 ^Δ	11,07±1,014*	10,94±1,544 *
Лимфоциты, %	62,91±4,775	66,73±3,259	65,85±6,236	62,44±6,764	64,95±7,343
Моноциты, %	5,26±0,583	4,75±0,509	5,18±0,750	5,21±0,605	4,89±0,522
Гранулоциты, %	31,83±5,067	28,52±3,525	28,96±6,886	32,35±6,591	30,16±7,400
Примечание: n – количество животных в группе; * – p<0,05 – достоверная разница по отношению к контролю; Δ – p<0,05 – достоверная разница по отношению к интактной группе; p – уровень достоверной разницы.					

Анализ данных показал, что лечебно-профилактическое введение исследуемых препаратов сдерживало развитие первичной воспалительной реакции, оцениваемой как на 3, так и на 14 сутки в случае с ТК и диклофенаком, и эффективно препятствовало развитию вторичной воспалительной реакции во всех опытных группах.

Таким образом, выявлено эффективное противовоспалительное действие тритерпеновых кислот, полученных из плодов облепихи и плодов клюквы, на модели хронического адьювантного артрита, и более выраженное у тритерпеноидов клюквы. Данные эффекты могут вносить определенный вклад в антиатерогенную активность исследуемых соединений.

5.2 Изучение влияния ТО и ТК на состояние системы гемостаза здоровых животных и животных с экспериментальной гиперлипидемией

Важной составляющей антиатерогенной терапии является коррекция сдвигов системы гемостаза, являющихся следствием атеросклеротического процесса и в последствии включающихся в патогенез в качестве активных участников. Гиперлипидемические патологии сами по себе могут сопровождаться количественными и качественными изменениями состояния свертывающей системы. Так, в исследовании авторов (Немытышева Е.В. и др., 2013) продемонстрировано, что тридцатидневное внутривенное введение жировой эмульсии «Липофундин» кроликам, помимо характерных сдвигов показателей липидного обмена, привело к укорачиванию времени свертывания на 42%. В данной экспериментальной серии нами решается задача по оценке изменения показателей свертывающей системы в условиях экспериментальной гиперлипидемии и их коррекция тритерпеновыми соединениями облепихи и клюквы.

5.2.1 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у здоровых животных и на фоне алиментарной гиперлипидемии

Результаты приведены в таблице 5.2.1.1. Образцы характерных коагулограмм животных контрольной и опытных групп изображены на рисунках 2-10.

Как видно из представленных данных, средняя продолжительность свертывания крови у животных интактной группы составила 219,0 секунд, а время начала и окончания свертывания 58,2 и 270,2 секунды соответственно.

Месячная обогащенная липидами диета повлияла на состояние характеристик процесса свертывания крови. Так, у нелеченных (контроль) животных отмечали достоверное уменьшение, по сравнению с интактными значениями, продолжительности свертывания крови на 40% и времени окончания свертывания на 29%.

Введение на фоне алиментарной гиперлипидемии тритерпеноидов облепихи и клюквы оказало нормализующие влияние на процесс свертывания

крови. В опытных группах животных, получавших ТО в дозе 10 мг/кг, отмечали достоверное увеличение продолжительности свертывания на 56% и времени окончания свертывания на 52%. Введение ТК в дозе 10 мг/кг также сопровождалось достоверным изменением этих характеристик в сторону увеличения на 52% и 40% соответственно, при этом и в одной, и в другой группе животных данные показатели полностью нормализовались, так как достоверно не отличались от значений здоровых животных.

Таким образом, ТО и ТК при использовании в дозе 10 мг/кг на фоне экспериментальной гиперлипопротеинемии оказали однонаправленное действие, по отношению к изучаемым показателям гемостаза, но особенностью реакции свертывающей системы крови на введение ТО являлось дополнительно достоверное увеличение времени начала свертывания, которое оказалось выше на 52% аналогичной характеристики у здоровых животных и на 42% выше контрольных значений.

Применение исследуемых субстанций в дозе 100 мг/кг привело к изменению характеристик свертывания крови. На фоне использования ТО и ТК наблюдали достоверное увеличение, по сравнению с контрольной группой животных, времени окончания свертывания: на 67% и 73% соответственно, продолжительности времени свертывания на 74% и 77% соответственно, и эти показатели полностью нормализовались. Кроме того, отмечалось дальнейшее увеличение времени начала свертывания, и в этих экспериментальных сериях оно уже было достоверно выше уровня интактных животных и при введении ТО (+60%), и при введении ТК (+72%).

Терапия гиперлипидемии с использованием ципрофибрата в дозе 50 мг/кг также сопровождалась восстановлением до нормальных значений нарушенных показателей свертывающей системы крови – время свертывание увеличилось на 70% по сравнению с контролем, а окончание свертывания на 40%.

Таблица 5.2.1.1 – Влияние ТО и ТК на показатели процесса свертывания крови в условиях алиментарной гиперлипидемии

Группы животных	Показатели					
	Т ₁ , сек		Т ₂ , сек		Т, сек	
	М±SD	Δ%	М±SD	Δ%	М±SD	Δ%
Интактные, n=8	58,2±11,32	–	270,2±30,44	–	219,0±28,6	–
Контроль, n=8	62,1±12,14	+7	192,6±24,6	-29 ^Δ	130,6±13,52	-40 ^Δ
ТО, 10 мг/кг, n=8	88,2±12,30	+42* +52 ^Δ	292,1±27,42	+52*	204,2±19,70	+56*
ТК, 10 мг/кг, n=8	71,7±14,15	+15	270,4±23,68	+40*	198,5±19,44	+52*
ТО, 100 мг/кг, n=8	93,4±20,12	+50* +60 ^Δ	321,0±38,62	+67*	227,4±23,74	+74*
ТК, 100 мг/кг, n=8	100,2±18,23	+61* +72 ^Δ	332,4±48,35	+73*	231,8±32,46	+77*
Ципрофибрат, 50 мг/кг, n=8	50,3±10,31	-19	273,4±24,32	+40*	222,3±32,45	+70*
Примечание: n – количество животных в группе; Т₁ – начало свертывания крови; Т₂ – окончание свертывания крови; Т – продолжительность времени свертывания крови; * – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям; ^Δ – p<0,05 – данные достоверны по отношению к интактным значениям; p – уровень достоверной разницы.						

5.2.2 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у здоровых животных и на фоне витаминной модели гиперлипидемии

Как видно из данных, представленных в таблице 5.2.2.1, на фоне моделирования витаминной модели гиперлипидемии, отмечали достоверное, по отношению к контролю, сокращение времени окончания свертывания на 26%— за счет уменьшения продолжительности свертывания на 28%.

Таблица 5.2.2.1 – Влияние ТО и ТК на показатели процесса свертывания крови в условиях витаминной модели гиперлипидемии

Группы животных	Показатели					
	T ₁ , сек		T ₂ , сек		T, сек	
	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%	M±SD	Δ%
Интakтные, n=10	62,9±13,44	—	235,9±30,87	—	170,0±37,93	—
Контроль, n=5	51,6±14,60	-17	173,6±17,47	-26 ^Δ	122,0±19,24	-28 ^Δ
ТО, 100 мг/кг, n=7	55,9±18,00	+8	211,6±24,25	+22*	155,7±19,88	+28*
ТК, 100 мг/кг, n=8	51,8±12,71	+0,4	225,5±24,12	+30*	173,75±16,85	+42*
Фенофибрат, 12,5 мг/кг, n=4	56,5±18,95	+9	171,5±31,29	-27 ^Δ	115,0±20,81	-32 ^Δ
Розувастатин, 1,7 мг/кг, n=4	61,8±14,06	+20	211,8±9,18	+22*	150,0±14,14	+23
Примечание: n – количество животных в группе; T ₁ – начало свертывания крови; T ₂ – окончание свертывания крови; T – продолжительность времени свертывания крови; * – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям; Δ – p<0,05 – данные достоверны по отношению к интактным значениям; p – уровень достоверной разницы.						

Введение тритерпеноидов сопровождалось увеличением продолжительности свертывания крови при использовании ТО на 28% и ТК на 42%, причем данный показатель полностью нормализовался, так как отсутствовали достоверные отличия, по отношению к интактным значениям. В случае использования фенофибрата все исследуемые показатели (таблица

5.2.2.1) остались на уровне животных контрольной группы. При введении розувастатина отмечали некоторое увеличение времени начала свертывания (+20%) и продолжительности свертывания (+23%), но данные изменения не были достоверными по сравнению с контролем. Время окончания свертывания в группе животных, получавших статины, достоверно возросло, по сравнению с контролем на 22%. В целом значения всех показателей коагулограмм животных, получавших статины, достоверно не отличались от значений интактных животных.

Таким образом, развивающийся дисбаланс свертывающей системы, спровоцированный пероральным введением витамина D₂ и ХС, проявляется повышением свертывающей активности крови. Введение исследуемых объектов и розувастатина сопровождается полным восстановлением регистрируемых в коагулографических исследованиях показателей до уровня нормы. Применение фенофибрата не вызывает положительных сдвигов.

5.2.3 Изучение влияния ТО и ТК на процессы свертывания в крови у здоровых животных

Длительное введение тритерпеноидов облепихи и клюквы в дозах 100 мг/кг здоровым животным также сопровождалось изменением показателей свертывания крови (таблица 5.2.3.1). Тридцатидневное использование ТО вызвало задержку начала свертывания, о чем свидетельствовало увеличение значения T₁ в данной группе животных на 81% по сравнению с контрольным уровнем. Использование ТО продлило время свертывания крови на 24% и, как следствие вышеописанных изменений, рост значения T₂ на 39%. В аналогичных условиях введение ТК достоверно продлило время инициации свертывания крови на 69% и несколько увеличили время свертывания (+13%), но изменение этой характеристики было недостоверно по отношению к значениям контрольных животных. В целом увеличение времени свертывания и начала свертывания привело к достоверному росту T₂ на 28%.

Введение ципрофибрата в аналогичных условиях не повлияло на исследуемые показатели гемостаза.

Таблица 5.2.3.1 – Влияние ТО и ТК при использовании в дозах 100 мг/кг на показатели процесса свертывания крови у здоровых животных

Группы животных	Показатели					
	Т ₁ , сек		Т ₂ , сек		Т, сек	
	М±SD	Δ%	М±SD	Δ%	М±SD	Δ%
Контрольные, n=6	58,2±14,71	-	270,2±34,14	-	219,0±38,20	-
ТО, 100 мг/кг, n=6	105,4 ±20,31	+81 ^Δ	375,8 ±43,24	+39 ^Δ	270,6 ±29,18	+24 ^Δ
ТК, 100 мг/кг, n=6	98,6 ±19,32	+69 ^Δ	347,0 ±23,12	+28 ^Δ	248,4 ±26,25	+13
Ципрофibrат, 50 мг/кг, n=6	64,3 ±14,65	+12	270,8 ±19,30	+0,2	205,6 ±14,63	-6
Примечание: n – количество животных в группе; Т ₁ – начало свертывания крови; Т ₂ – окончание свертывания крови; Т – продолжительность времени свертывания крови; ^Δ – p<0,05 – данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы.						

Таким образом, анализ результатов исследований по изучению влияния ТО и ТК на некоторые показатели гемостаза у животных с экспериментальными гиперлипидемиями показал, что внесение изменений в стандартный рацион питания животных с включением повышенного количества нейтральных липидов и ХС сопровождается помимо отклонений от нормальных значений биохимических показателей, также изменениями реологических свойств крови, состояния и степени реакции свертывающей системы. Повышение свертываемости крови на фоне гиперлипидемии это дополнительный и весьма серьезный фактор риска, значительно увеличивающий вероятность сосудистой патологии. Испытываемые тритерпеновые соединения уже в дозе 10 мг/кг нивелировали нежелательные сдвиги характеристик системы гемостаза, в результате чего время свертывания крови достигло нормальных значений. При использовании дозы препаратов 100 мг/кг время свертывания крови достоверно

не отличалось от интактных значений и значений группы животных, которые получали ТО и ТК в дозе 10 мг/кг, но отмечали значительное увеличение времени начала реакции свертывания (T_1) (на 50% для ТО и на 61% для ТК). Такая направленность действия используемых тритерпеновых соединений прослеживалась и при изучении их влияния на показатели гемостаза у здоровых животных. И в случае ТО, и в случае ТК увеличивалось время начала свертывания крови, причем этот эффект был более выражен при использовании ТО. Кроме того, у здоровых животных под действием тритерпеноидов отмечали продление времени свертывания, которое при введении ТО оказалось достоверно выше контрольных значений, а при использовании ТК отмечали тенденцию к увеличению, но эти изменения были недостоверны.

Образцы коагулограмм животных опытных групп приведены на рисунках 2 – 10.

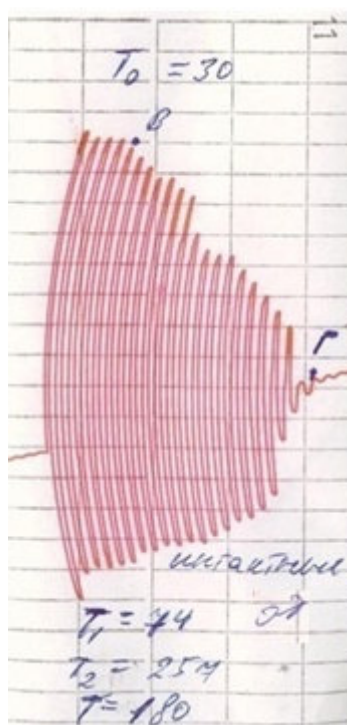


Рисунок 2 – Образец коагулограммы интактных крыс

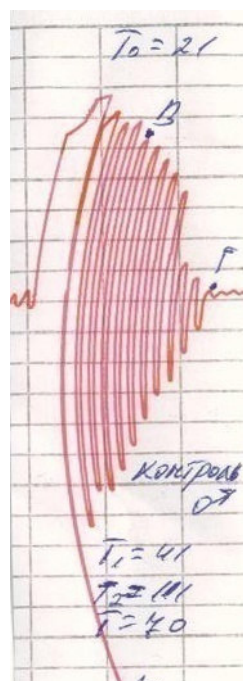


Рисунок 3 – Образец коагулограммы крыс из контрольной группы животных

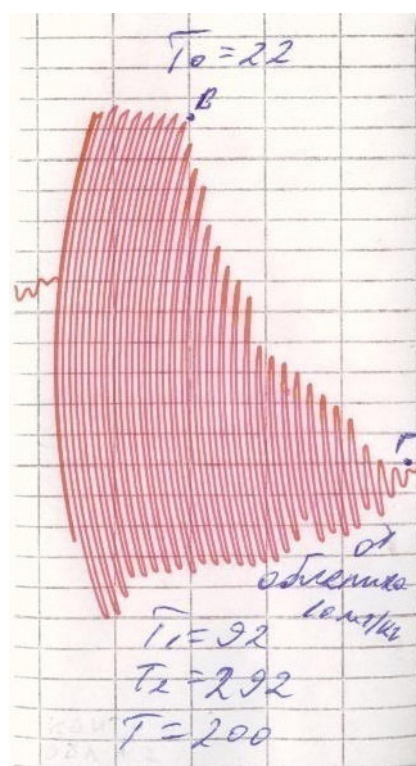


Рисунок 4 – Образец коагулограммы крыс, получавших ТО в дозе 10 мг/кг на фоне алиментарной гиперлипидемии

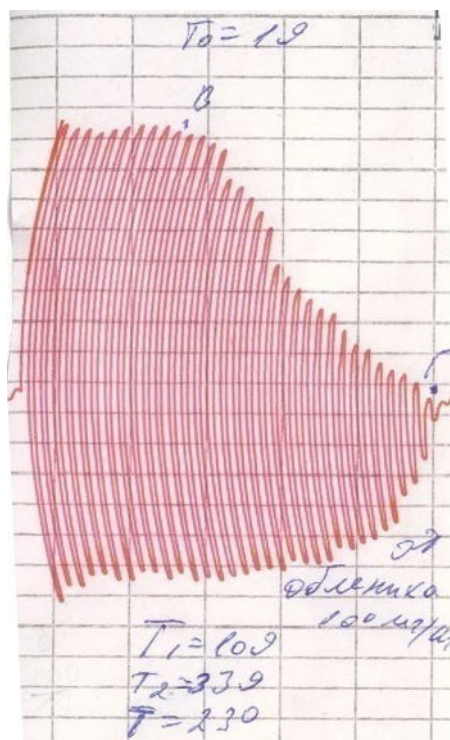


Рисунок 5 – Образец коагулограммы крыс, получавших ТО в дозе 100 мг/кг на фоне алиментарной гиперлипидемии

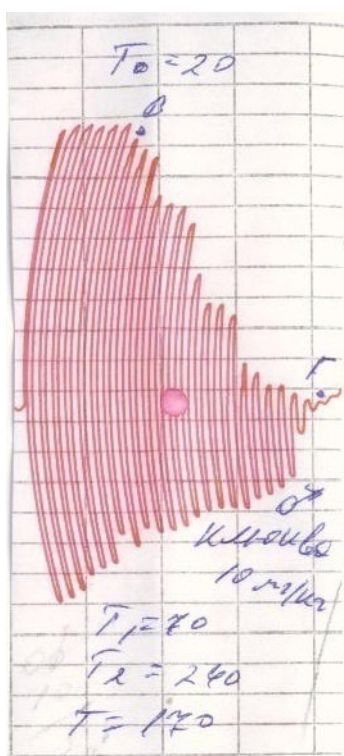


Рисунок 6 – Образец коагулограммы крыс, получавших ТК в дозе 10 мг/кг на фоне алиментарной гиперлипидемии

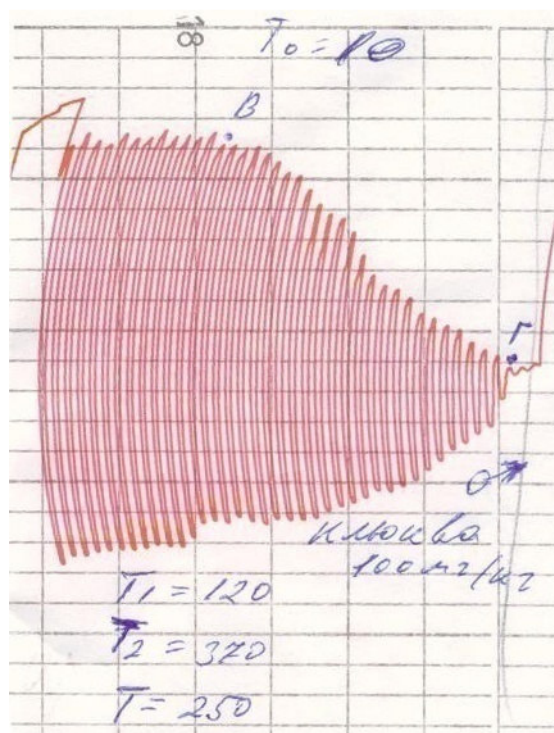


Рисунок 7 – Образец коагулограммы крыс, получавших ТК в дозе 100 мг/кг на фоне алиментарной гиперлипидемии

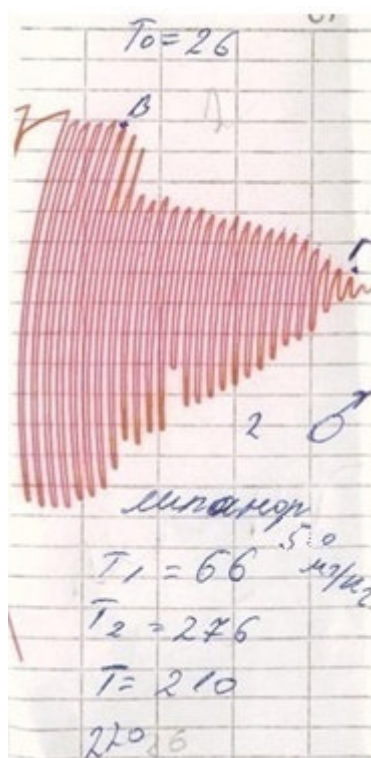


Рисунок 8 – Образец коагулограммы крыс, получавших ципрофибрат в дозе 50 мг/кг на фоне алиментарной гиперлипидемии

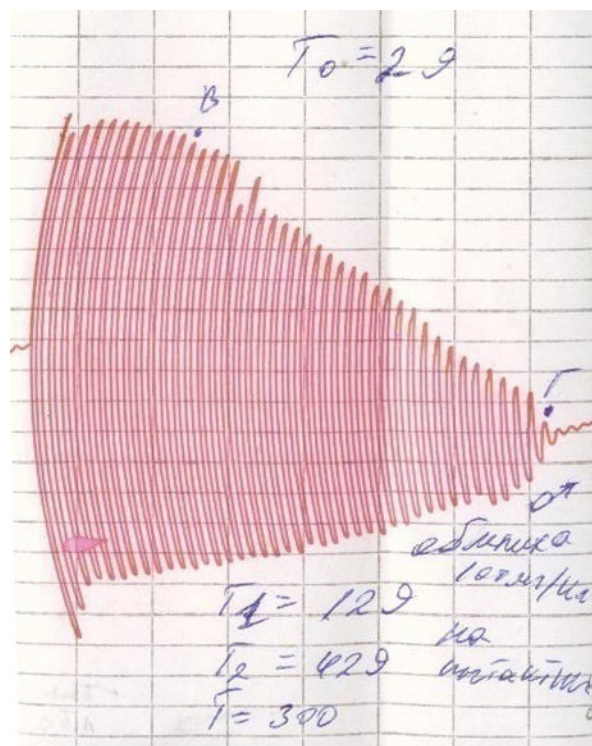


Рисунок 9 – Образец коагулограммы интактных крыс, получавших ТО в дозе 100 мг/кг

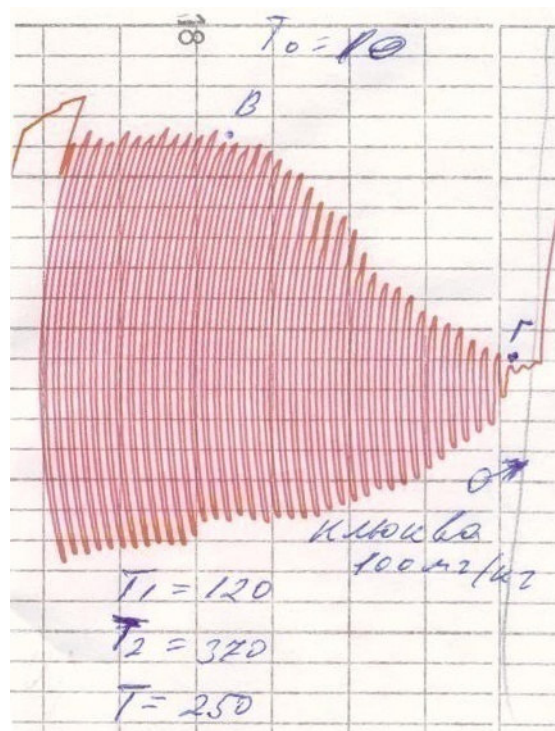


Рисунок 10 – Образец коагулограммы интактных крыс, получавших ТК в дозе 100 мг/кг

5.3 Изучение мембраностабилизирующей активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы и их влияние на интенсивность перекисного окисления липидов при алиментарной гиперлипидемии

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) – свободно-радикальный, вырожденно-разветвлённый цепной процесс, во многом сходный с окислением природных и синтетических углеводов и полимеров. Весь процесс ПОЛ делят на стадии: зарождение цепей, развитие цепных реакций и их разветвление, обрыв цепей. Процессы ПОЛ постоянно протекают в организме и имеют важное значение в обновлении и поддержании функциональных свойств биомембран, участии в энергетических процессах, клеточном делении, синтезе биологически активных веществ. Через стадию перекисных производных неэтерифицированных жирных кислот осуществляется биосинтез простагландинов и лейкотриенов, а тромбоксаны, оказывающие мощное влияние на адгезивно-агрегационные свойства форменных элементов крови и микроциркуляцию, сами являются гидроперекисями. Образование гидроперекисей ХС – одно из звеньев в синтезе некоторых стероидных гормонов. Многие исследователи считают, что продукты ПОЛ играют ведущую роль в развитии стресс-реакций в организме и в адаптационных механизмах [55, 114, 208].

К мембранно-повреждающему действию свободно-радикальных интермедиатов и продуктов ПОЛ можно отнести, во-первых, изменение липидного микроокружения, мембранно-связанных ферментов, рецепторов ферментов и каналов ионной проводимости, образование новых каналов проводимости для ионов кальция, способствующих его избытку в клетке, во-вторых, нарастание продуктов распада ФЛ, взаимодействующих со свободными аминокруппами мембранных белков, образующих межмолекулярные сшивки и инактивирующих эти белки, и, наконец, отмечается окисление SH-групп в активных центрах мембранно-связанных ферментов, вызывая тем самым потерю функциональных свойств биомембран

[79]. Процессы ПОЛ связаны и с другими компонентами «липидной триады» (активация ФЛ и липаз, детергентное действие жирных кислот). Активация ПОЛ приводит к лабильзации лизосом, в которых локализованы фосфолипазы. Активируемые лизосомальные мембранно-связанные фосфолипазы играют важную роль в разрушении липидного слоя мембран и образовании лизофосфолипидов и свободных жирных кислот. Последние за счёт своего детергентного действия нарушают упорядоченное расположение ФЛ в мембранах, что также может быть причиной активации процессов ПОЛ. Увеличение при этом проницаемости мембран для ионов кальция и возникающий в результате кальциевый избыток в клетке активирует фосфолипазы и процессы ПОЛ. В итоге усугубляется повреждение клеточной мембраны, переходящее в необратимое и приводящее к гибели клеток.

В нормальных физиологических условиях ПОЛ протекает на крайне низком уровне, что предохраняет организм от накопления токсичных продуктов в концентрациях, опасных для жизнедеятельности. Обнаружение в каждом конкретном случае того порога, после которого кардинально меняется роль активных форм кислорода и инициируемого ими ПОЛ в гомеостазе организма, представляет собой весьма важную и непростую задачу, решение которой – одна из актуальнейших проблем современной свободно-радикальной биологии [53].

Многофакторность условий развития длительной гиперлипидемии и, как следствие, атеросклероза, делает интересным раскрытие разных сторон изменений обмена веществ при экспериментальном изучении свойств тритерпеновых соединений облепихи и клюквы. В последние годы повышен интерес к ПОЛ, увеличение продуктов которого может являться одним из ведущих факторов риска развития гиперлипидемии и атеросклероза [4, 45, 272].

Интенсификация перекисных процессов и рост уровня вторичных продуктов окисления приводит к повреждению структуры липидно-белкового комплекса мембран, в том числе эндотелия сосудов [227].

Учитывая выше сказанное и данные о гиполипидемической активности ТО и ТК, представило интерес изучение возможности влияния исследуемых тритерпеноидов на интенсивность пероксидации и их мембранопротекторные свойства в условиях экспериментальной гиперлипидемии.

Для оценки интенсивности перекисных процессов в опытах на животных при хронической гиперлипидемии определяли содержание ТБК-активных продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови.

Как видно из данных, представленных в таблице 5.3.1, у крыс после воспроизведения модели алиментарной гиперлипидемии, регистрировалась активации свободно-радикального ПОЛ. У этих животных отмечалось увеличение количества ТБК-активных продуктов во фракции β - и пре- β -липопротеинов на 22% по отношению к контролю.

Таблица 5.3.1 – Влияние суммы тритерпеноидных кислот из плодов облепихи и клюквы на интенсивность свободно-радикальных процессов и резистентность биомембран на фоне алиментарной гиперлипидемии

Группы животных	Показатели			
	ТБК-активные продукты в β - и пре- β -липопротеинах, мкмоль МДА /л		Гемолиз эритроцитов по Ягеру, %	
	M $\pm$ SD	Δ %	M $\pm$ SD	Δ %
Интактные, n=8	0,551 $\pm$ 0,0763	-	8,2 $\pm$ 3,34	-
Контроль, n=8	0,674 $\pm$ 0,0909	+22 $^{\Delta}$	18,8 $\pm$ 6,06	+130 $^{\Delta}$
ТО, 10 мг/кг, n=8	0,288 $\pm$ 0,0947	-57* -48 $^{\Delta}$	10,1 $\pm$ 5,50	-46
ТО, 100 мг/кг, n=8	0,231 $\pm$ 0,1163	-65* -58 $^{\Delta}$	6,6 $\pm$ 3,30	-65*
ТК, 10 мг/кг, n=8	0,210 $\pm$ 0,1111	-68* -62 $^{\Delta}$	7,7 $\pm$ 2,47	-59*
ТК, 100 мг/кг, n=8	0,199 $\pm$ 0,0886	-70* -63 $^{\Delta}$	5,9 $\pm$ 2,23	-68*
Ципрофибрат, 50 мг/кг, n=8	0,50 $\pm$ 0,1662	-24	10,9 $\pm$ 6,45	-42
Примечание: n – количество животных в группе; $^{\Delta}$–p<0,05– данные достоверны по отношению к интактным значениям; *–p<0,05– данные достоверны по отношению к контрольным значениям; p – уровень достоверной разницы.				

В качестве показателя мембраностабилизирующей активности ТО и ТК использовали уровень гемолиза эритроцитов по Ягеру, который в контрольной группе животных вырос в 2,3 раза.

Таким образом, при развитии алиментарной гиперлипидемии наблюдается усиление процессов пероксидации, что может приводить к значительным нарушениям в функционировании эндогенной антиоксидантной системы и усилению деструктивных процессов в клетке и её мембранах: повышение степени окисленности ФЛ и белков, рост проницаемости клеточных и субклеточных мембран для белков и ферментов и снижение их резистентности.

У животных, получавших ТО и ТК, наблюдалось достоверное улучшение изученных показателей по отношению к контролю.

Так, применение ТО в дозе 10 мг/кг привело к следующему: уровень ТБК-активных продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови был ниже по сравнению с контролем на 57%, причём этот показатель был достоверно ниже, чем у животных интактной группы на 48% соответственно. Повышение дозы ТО до 100 мг/кг способствовало ещё в большей степени подавлению процессов свободно-радикального окисления. Уровень ТБК-активных продуктов в крови стал ещё меньше контрольных значений на 65%, что оказалось достоверно ниже группы здоровых животных на 58% соответственно (таблица 5.3.1).

В отношении животных, получавших ТК в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг, отмечается явное подавление процессов ПОЛ, причём увеличение дозы не влияет на способность данных соединений к снижению интенсификации ПОЛ, вызванной алиментарной гиперлипидемией. Применение ТК в дозе 10 мг/кг привело к уменьшению уровня ТБК-активных продуктов на 68%, а ТК в дозе 100 мг/кг на 70% соответственно. При этом содержание ТБК-активных продуктов было достоверно ниже значений интактной группы как в дозе 10 мг/кг, так и 100 мг/кг: -62% и -63% соответственно.

Интенсивность спонтанного гемолиза эритроцитов в большей степени уменьшилась под влиянием ТК в дозе 10 мг/кг и 100 мг/кг на 59% и 68%

соответственно относительно контроля. В группе животных, получавших ТО, данный показатель полностью нормализовался при введении дозы 10 мг/кг и 100 мг/кг.

Применение ципрофибрата в дозе 50 мг/кг не повлияло ни на один из перечисленных показателей. На уровне контроля оставалось содержание ТБК-активных продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови, которое не имело достоверных отличий ни от контрольной, ни от интактной групп.

Все вышеперечисленное свидетельствует о значительной способности тритерпеноидных кислот, содержащихся в плодах облепихи и клюквы, снижать уровень показателей перекисного окисления липидов и оказывать мембраностабилизирующее действие, проявляющееся уже при использовании их в дозе 10 мг/кг.

5.4 Заключение

В ходе изучения некоторых плеiotропных эффектов тритерпеноидов облепихи и клюквы, которые могут способствовать повышению эффективности антиатерогенной терапии, установлено, что ТО и ТК при введении на фоне алиментарной гиперлипидемии способствуют снижению интенсивности ПОЛ и оказывают мембраностабилизирующее действие, проявляющееся уже при использовании их в дозе 10 мг/кг.

Наличие противовоспалительного компонента в механизме гиполипидемического средства может значительно повысить эффективность антисклеротической терапии. Установлено, что ТО и ТК при использовании их в дозе 100 мг/кг проявляют противовоспалительное действие в условиях моделирования острого и хронического воспаления, более выраженное у тритерпеноидов клюквы.

Важной составляющей антиатерогенной терапии является коррекция сдвигов системы гемостаза, являющихся следствием атеросклеротического процесса и в последствии включающихся в патогенез в качестве активных участников. Гиперлипидемические состояния сами по себе могут

сопровождаться количественными и качественными изменениями состояния свертывающей системы. Так нами показано, что на фоне алиментарной гиперлипидемии отмечается достоверное уменьшение по сравнению со значениями интактной группы продолжительности свертывания крови и времени окончания свертывания. Введение опытным животным ТО и ТК в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг, ципрофибрата в дозе 50 мг/кг привело к восстановлению до нормальных значений нарушенных показателей свертывающей системы крови.

Исследования показателей гемостаза, выполненные на витаминной модели гиперлипидемии показали, что введение ТО, ТК и розувастатина сопровождается полным восстановлением регистрируемых в коагулографических исследованиях показателей до уровня нормы. Применение фенофибрата не вызывало положительных сдвигов.

При изучении влияния курсового введения ТО и ТК на коагулографические показатели у здоровых животных выявлено удлинение времени свертывания, которое при введении ТО оказалось достоверно выше контрольных значений.

ГЛАВА 6 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

К настоящему времени накопилось достаточное количество данных экспериментальных, клинических и эпидемиологических исследований, свидетельствующих о ведущей роли в процессе атерогенеза нарушений обмена липидов различной этиологии. Значительное внимание уделяется уровню ХС и его фракционному составу, меняющемуся при различных формах дислипидемий. Гиперхолестеринемия приводит к изменениям структуры и функциональной активности мембран эндотелиальных клеток, повышает проницаемость интимы к атерогенным липопротеинам, провоцирует ее избыточную инфильтрацию ЛПНП [14, 26, 45, 91]. Эпидемиологические и клинические исследования показывают, что снижение концентрации ХС в сыворотке крови снижает риск развития осложнений, сопутствующих атеросклеротическому поражению сосудов и проявляющихся главным образом ишемическими состояниями [127, 133, 151, 170, 202, 203]. В тоже время имеется информация о возможной манифестации клинической картины атеросклероза в различных проявлениях у лиц с нормальным уровнем ОХС, а также о значительном влиянии на развитие процесса атеросклероза не столько концентрации ОХС, а в большей степени изменения соотношения отдельных фракций липопротеинов крови [9, 36, 40, 47].

На данный момент времени медициной разработаны и разрешены для практического применения преимущественно препараты, корректирующие патогенетические изменения липидного обмена. Для этого вида терапии сформированы рекомендации по монотерапии и сочетанному использованию препаратов из различных фармакологических групп гиполипидемических средств с учетом клинических особенностей возникающих осложнений атеросклероза сосудов. Для профилактики и лечения атеросклероза и его осложнений используют следующие группы препаратов [30, 34, 42, 74, 84, 162]: статины; фибраты; секвестранты желчных кислот; никотиновая кислота; средства, блокирующие обратный транспорт ХС из тонкого кишечника.

Лекарственная терапия атеросклероза проводится длительное время, иногда в течение всей жизни. Поэтому лекарственные препараты должны сочетать в себе ряд свойств: достаточная эффективность, отсутствие побочного действия, экономическая доступность. Но часто эффективность и переносимость имеющихся антиатеросклеротических препаратов далеки от современных требований. Так препараты статинов являются довольно безопасными средствами [228], но при всем при этом их прием может сопровождаться развитием ряда побочных эффектов, вероятность возникновения которых увеличивается при продолжительном применении – гиперферментемия, миопатия, нарушение когнитивной функции [21, 29, 84, 146, 191, 253]. Около 10% больных, проходящих терапию статинами, жалуются на миалгию, миастению, что иногда приводит к отказу применения статинов и необходимости замены на другие гиполипидемические препараты [147]. При приеме фибратов возможны желудочно-кишечные нарушения, миалгии, внутрипеченочный холестаз [40, 59, 259]. При использовании секвестрантов возможно развитие запоров, диспепсии, увеличения концентрации триглицеридов в плазме, нарушение всасывания жирорастворимых витаминов и ряда лекарственных средств [6, 40, 85].

Таким образом, несмотря на многообразие гиполипидемических препаратов, проблема поиска новых лекарственных препаратов указанного действия остается достаточно актуальной, так как ни одно из имеющихся средств не удовлетворяет требованиям практической медицины.

В последние годы растет интерес к препаратам растительного происхождения во всем мире. Растительные объекты могут оказаться перспективным источником для получения гиполипидемических соединений или могут быть применены в качестве компонентов диетического рациона, способного уменьшать выраженность дислипидемии. Исследования показывают, что более 1000 растений, используемых в традиционной медицине по всему миру, могут влиять на липидный спектр [16, 86, 105, 110, 113, 142, 159, 173, 185, 197, 200, 206, 217, 219, 246, 261, 264, 285].

Крайне интересными и перспективными с точки зрения разработки лекарственных препаратов являются тритерпеновые соединения, представляющие собой активные метаболиты, образующиеся преимущественно в растительных клетках и выполняющие в основном защитные функции [62]. Растительные тритерпеноиды, как ни один другой класс соединений, обладают широчайшим спектром активности. В ряде исследований доказана их эффективность в условиях гиперхолестеринемии [230], болеутоляющий эффект [104], антибактериальная и противовирусная активность [103, 160, 182]. Тритерпеноиды могут оказывать влияние на формирование иммунного ответа: причем, они способны не только модулировать характер иммунных реакций, но и противостоять формированию вторичных иммунодефицитов [61, 179, 180, 277]. Довольно хорошо изучено противовоспалительное действие ряда представителей тритерпеноидов [183, 190, 233, 234], противоопухолевая активность [112, 250, 263], гепатопротекторные свойства [64, 83, 106, 165].

Перспективным источником получения тритерпеновых соединений являются шрот плодов клюквы и облепихи, представляющий собой отходы, образующиеся при использовании ягод в фармацевтической и пищевой промышленности. Выход тритерпеновых соединений составляет до 5%.

В исследуемых объектах (сумма тритерпеновых кислот облепихи и клюквы) не менее 75% приходится на олеаноловую и урсоловую кислоты. Олеаноловая кислота и урсоловая кислота – это тритерпеновые соединения, широко распространенные в пищевых продуктах, лекарственных травах и других растениях. Имеется серьезная доказательная база, демонстрирующая высокую фармакологическую активность растительных препаратов, содержащих в своем составе олеаноловую и урсоловую кислоты [123, 132, 150, 262, 266, 289], в том числе и в условиях экспериментальных гиперлипидемий [145, 163, 213, 236].

На первом этапе экспериментальной работы нами в ходе токсикологических исследований была выполнена оценка острой токсичности исследуемых субстанций на крысах обоего пола. Технически максимально

возможная для введения доза составила 30000 мг/кг ТО и ТК. Расчет показателей токсичности выполнить не удалось в связи с тем, что при введении максимальной дозы на протяжении всего времени наблюдения не выявлено гибели животных ни в одной экспериментальной группе. Состояние животных, поведение, динамика изменения массы, макроскопическое строение органов животных, которым вводили ТО и ТК, не отличалось от контрольных животных. Полученные результаты определения острой токсичности исследуемых субстанций на крысах позволяют отнести ТО и ТК по классификации Hodge H.C., Sterner L.H. к 6 классу токсичности – относительно безвредным веществам, так как значения LD_{50} находятся в диапазоне, превышающем 30000 мг/кг.

Определение оптимальной терапевтической дозы проводили при лечебно-профилактическом введении ТО и ТК на фоне твиновой модели гиперлипидемии в дозах: 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг и 500 мг/кг. Гипохолестеринемический эффект проявлялся при курсовом применении ТО уже в дозе 10 мг/кг, так как в этой дозе содержание ХС не отличалось от значения этого показателя у животных без гиперлипидемии, но остальные показатели не претерпели серьезных изменений относительно нелеченных животных. При переходе к дозе 50 мг/кг сохранялась такая же тенденция в изменении исследуемых показателей, но дополнительно отмечали снижение, хотя и недостоверное, концентрации общих липидов в крови. Видимое усиление эффективности гиполипидемического действия наблюдали при использовании ТО в дозе 100 мг/кг, так как помимо нормализации содержания ХС в крови, восстановился до нормальных значений уровень ТГ и достоверно снизилась концентрация в крови общих липидов, чего не отмечали при использовании ТО в более низких дозах. Дальнейшее улучшение показателей липидного обмена в крови отмечали при применении дозы 200 мг/кг, но эти значения достоверно не отличались от аналогичных показателей группы животных, получавших ТО в дозе 100 мг/кг. Дальнейшее увеличение дозы не вызвало усиления эффективности. Следовательно, оптимальная

терапевтическая доза ТО, установленная на модели твиновой гиперлипидемии составила 100 мг/кг.

Лечебно-профилактическое применение ТК на фоне твиновой гиперлипидемии меняло липидный спектр сыворотки крови подобно тому, как это происходило под влиянием ТО. ТК также проявляли гипохолестеринемический эффект уже в дозе 10 мг/кг. Усиление эффективности гиполипидемического действия, выражающееся в улучшении остальных показателей липидного обмена сыворотки, отмечали при переходе к дозе 100 мг/кг, так как помимо нормализации содержания ХС в крови, восстанавливался до нормальных значений и уровень ТГ. Дальнейшее увеличение используемых дозировок до 200 мг/кг и 500 мг/кг сопровождалось некоторым улучшением состояния исследуемых показателей, но эти изменения, как и при введении ТО, достоверно не отличались от изменений показателей животных, которым вводили ТК в дозе 100 мг/кг. Следовательно, оптимальная терапевтическая доза для ТК также составила 100 мг/кг.

Одним из существенных фоновых факторов, способствующих формированию гиперлипидемии и заболеваний атеросклеротического генеза, является алиментарные диетические нарушения. Прием в пищу большого количества насыщенных жирных кислот и увеличение доли ХС приводит к атерогенпродуцирующим сдвигам в липидограмме крови [199]. Эпидемиологи продемонстрировали, что в тех странах, где традиционно в пищевом рационе велика доля насыщенных жиров и ХС, частота ИБС закономерно выше [255]. Учитывая важность алиментарных факторов, значительно влияющих на атерогенез, исследователями при оценке эффективности гиполипидемического действия различных классов соединений довольно часто используются алиментарные модели дислипидемий. В процессе воспроизведения моделей экспериментаторами в рацион животных вводятся избыточные количества ХС, насыщенных жирных кислот, витаминов группы D по отдельности или в разных сочетаниях и в некоторых случаях с добавлением химических соединений, меняющих нормальное физиологическое течение обменных

процессов (гормоны, антигормоны, антивитамины и т.д.) [99, 175, 177, 236, 261, 264]. У данных моделей имеются и преимущества, и недостатки, по сравнению с другими способами моделирования. Один из недостатков заключается в том, что воспроизведение алиментарных моделей требует большей длительности по сравнению с использованием для этих целей детергентов. Так при моделировании с применением твина или тритона эти соединения для провоцирования гиперлипидемии вводят однократно. Преимущество заключается в том, что те изменения, которые происходят на фоне гиперлипидемических пищевых нагрузок, максимально приближаются по патогенезу к некоторым клиническим формам гиперлипидемий у человека.

Нами на данном этапе было выполнено исследование эффективности гиполипидемического действия ТО и ТК при введении в дозе 10 мг/кг (доза, на которой в предыдущих исследованиях был зарегистрирован гипохолестеринемический эффект) и в дозе 100 мг/кг (оптимальная терапевтическая доза, установленная на модели твиновой гиперлипидемии) при их введении на фоне воспроизведения алиментарной гиперлипидемии в результате принудительного введения насыщенных липидов и ХС.

Алиментарная гиперлипидемия характеризовалась значительным нарушением в обмене липидов, отражающемся в подъёме уровня ХС в сыворотке крови (гиперхолестеринемия) и печени, увеличением содержания β - и пре- β -липопротеинов крови, ростом количества ХС в β -липопротеинах, содержания ТГ в печени с одновременным снижением содержания ФЛ в печени.

Лечебно-профилактическое введение ТО в дозе 10 мг/кг привело к достоверному снижению содержания ХС в печени на 32%, хотя уровня нормы при этом достигнуто не было. Содержание же ТГ в печени снизилось на 50% и полностью нормализовалось, так как отсутствовали достоверные отличия между значениями данной опытной группы и интактными животными. В данной дозе (10 мг/кг) тритерпеноидные соединения облепихи не оказали существенного влияния на показатели липидного обмена в сыворотке крови.

Увеличение дозы ТО до 100 мг/кг способствовало снижению концентрации ОХС и холестерина β -липопротеинов в крови соответственно на 32% и 56%, по сравнению с контролем, и полной нормализации их содержания. Количество ХС в печени уменьшилось на 43%, но интактных значений так и не достигло. В отношении количества β - и пре- β -липопротеинов отмечается тенденция к их снижению, и их значения достоверно не отличались от нормы. В силу данных изменений индекс атерогенности достиг 1,0, как и у интактных животных.

Лечебно-профилактическое влияние суммы ТК в дозе 10 мг/кг на состояние липидного обмена было следующим. Показатели липидного обмена в сыворотке крови не изменились относительно контрольных величин. В печени уровень ХС снизился на 39%, ТГ на 52%, причем содержание ТГ полностью восстановилось до нормы. ФЛ по сравнению с контролем, т.е. животными с алиментарной гиперлипидемией, выросли на 12%, но эти изменения носили недостоверный характер.

С увеличением дозы ТК до 100 мг/кг не отмечали значительного роста эффективности действия в отношении показателей липидного обмена в крови – некоторое уменьшение значения индекса атерогенности за счет невыраженного снижения уровня ОХС и холестерина β -липопротеинов, которое сопровождало применение ТК в дозе 100 мг/кг, но эти изменения были недостоверными. В печени же уровень ХС снизился на 35% (достоверное отличие), а ФЛ – повысился на 19% (недостоверное отличие). Коэффициент холестерин/фосфолипиды снизился в 1,8 раза. Содержание ТГ печени, как и в случае с ТО в дозе 100 мг/кг, уменьшилось, относительно контроля, на 66% и было меньше значений интактных крыс на 38%.

Введение животным препарата сравнения ципрофибрат в дозе 50 мг/кг значительно уступало по гиполипидемическому действию исследуемым объектам (ТО и ТК). Из всего изученного спектра биохимических показателей нормализовалось лишь содержание ТГ в печени.

Алиментарная гиперлипидемия сопровождалась нарушением белково-синтетической функции печени, о чём свидетельствовало снижение содержания общего белка в печени на 62% и в сыворотке крови – на 39%, по сравнению с интактными животными; уровень нуклеиновых кислот понизился на 33%. Среди показателей углеводного обмена в сыворотке крови определяли содержание глюкозы, которое повысилось, по сравнению со здоровыми животными, на 121%.

Введение же тритерпеноидных кислот облепихи и клюквы в дозе 10 мг/кг привело к значительному повышению содержания белка (+222% и +148%) и нуклеиновых кислот (+34% и +30%) в печени по отношению к контролю. Аналогичная картина наблюдалась и при введении дозы 100 мг/кг тритерпеноидов облепихи и тритерпеноидов клюквы: прирост общего белка печени составил 271% и 266% соответственно, и нуклеиновых кислот – 60% и 38%, по отношению к контролю. При этом содержание белка оказалось даже достоверно выше, чем у интактных крыс на 40% и 38% соответственно при введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг. Содержание нуклеиновых кислот в печени и концентрация общего белка в сыворотке крови нормализовались во всех опытных группах животных, которым вводили тритерпеновые соединения.

Введение препарата сравнения ципрофибрат не привело к нормализации содержания общего белка и нуклеиновых кислот в печени, которые остались на уровне значений контрольной группы. В сыворотке крови под влиянием данного препарата отмечалось увеличение содержания белка в крови на 55% по отношению к контролю.

Исследования по изучению влияния ТО и ТК в двух дозах на содержание глюкозы в сыворотке крови в условиях алиментарной гиперлипидемии выявили достоверное снижение ее концентрации на 44% и 40% соответственно, по сравнению с контрольными значениями, при введении тритерпеноидов в дозе 100 мг/кг (таблица 3.3.2.2). Использование ТО и ТК в дозе 10 мг/кг не оказало влияния на гипергликемию, сопровождающую алиментарную

гиперлипидемию. В группе препарата сравнения уровень глюкозы остался на уровне значений контрольной группы.

Таким образом, тритерпеноидные кислоты облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг, применяемые на фоне алиментарной гиперлипидемии, стимулируют белково-синтетические процессы, и их прием сопровождается гипогликемическим эффектом.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что в условиях хронической алиментарной гиперлипидемии лечебно-профилактическое введение тритерпеновых кислот плодов облепихи и плодов клюквы в дозе 100 мг/кг оказывают нормализующее влияние на состояние показателей липидного обмена в крови и печени, проявляя отчетливый гипохолестеринемический эффект, более выраженный у ТО. По сумме исследуемых показателей и ТО, и ТК по эффективности превышают действие препарата сравнения ципрофибрат. Тритерпеноиды облепихи и клюквы в дозе 100 мг/кг способствуют более значительному восстановлению белково-синтетической функции печени, по сравнению с ципрофибратом, и нормализуют уровень глюкозы.

Для более детального изучения особенностей фармакодинамики исследуемых соединений нами изучено их влияние на динамику изменения ряда показателей липидного и углеводного обменов при курсовом двухмесячном введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг здоровым животным. Установлено, что в данных условиях исследуемые вещества не повлияли на концентрацию ОХС в крови (отмечалась незначительная тенденция к снижению), но привели к уменьшению уровня холестерина β -липопротеинов, по сравнению с исходной концентрацией. Гипотриглицеридемический эффект проявился в равной степени и у ТО, и ТК через месяц введения, сохраняясь до конца эксперимента. Кроме того, для обеих исследуемых субстанций к концу периода наблюдения было характерным снижение уровня свободного ХС, свободных жирных кислот и глюкозы в крови.

Некоторыми исследователями также используется возможность изучения влияния потенциальных растительных гиполипидемических препаратов при введении интактным животным на маркерные показатели, характеризующие состояние липидного обмена. Так в работе по исследованию гиполипидемической активности водного экстракта пахиптеры введение здоровым животным в течение 28 дней в дозе 200 мг/кг/день, выражалось значительным снижением у здоровых животных в плазме ХС-ЛПНП, ТГ и ОХС на 44,0%, 27,9% и 28,1% соответственно [176]. 21-дневное введение алкалоида резерпина нормолипидемическим крысам вызывает достоверное снижение уровня ОХС и ТГ и не изменяет концентрации ХС-ЛПВП, а также неэстерифицированных жирных кислот в сыворотке крови. Одновременно наблюдается значительное уменьшение содержания липидов печени [56].

Одним из ключевых этапов при разработке новых лекарственных средств являются фармакодинамические исследования, позволяющие оценить основные механизмы специфической фармакологической активности препаратов. Исследования некоторых механизмов гиполипидемического и/или антиатеросклеротического действия ТО и ТК, а также дополнительных эффектов, которые могли бы быть полезными при терапии и профилактике гиперлипидемии и/или атеросклероза, выполнены на здоровых животных и при их введении на фоне экспериментальных патологий. Выполнить ряд исследований возможных плеiotропных эффектов нас побудила информация о возможной активности тритерпеноидов и данные о свойствах наиболее активно и эффективно используемой для первичной и вторичной профилактики и лечения дислипидемий и атеросклероза фармакологической группы лекарственных препаратов – статинов. Статины первоначально создавались как соединения с гиполипидемической активностью, но впоследствии было установлено, что они обладают рядом плеiotропных эффектов, что открывает целый ряд преимуществ по сравнению с другими гиполипидемическими средствами. К настоящему времени экспериментально изучены и клинически подтверждены следующие плеiotропные эффекты статинов: антиоксидантное,

эндотелиопротекторное, противовоспалительное, ингибирование пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, стабилизация атеросклеротической бляшки, влияние на гемостаз (снижение агрегации, улучшение состояния фибринолитической системы), антиишемическое действие, иммуносупрессивное действие, влияние на ангиогенез [252].

Учитывая ключевую роль печени в обмене различных классов липидов, утилизации и выведении ХС, нами выполнено исследование желчеобразовательной и желчевыделительной функции при курсовом введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг здоровым животным и влияние этих соединений на экскрецию ХС в сравнении с фламином.

При использовании тритерпеноидов облепихи и клюквы отмечается изменение состава желчи при сохранении скорости и объема секреции, а именно: увеличение концентрации желчных кислот при неизменном содержании ХС. В целом это сопровождается улучшением антилитогенных свойств желчи, о чем свидетельствует повышение значения холято-холестеринового коэффициента. Увеличение общего количества выделенных с желчью желчных кислот и повышение их концентрации в желчи, наблюдающееся при действии тритерпеновых веществ, свидетельствуют об усилении процессов синтеза в печени желчных кислот и усилении за счет этого экскреции ХС, что связано с переводом ХС в желчные кислоты, поскольку они синтезируются в печени из ХС при участии микросомальных ферментов. Применение фламина у здоровых животных сопровождалось выраженным желчегонным эффектом, проявляющимся в увеличении количества выделившейся желчи. Прирост объема секрета происходит преимущественно за счет водного компонента, так как этот эффект сопровождается достоверным снижением концентрации желчных кислот и ХС в собранной желчи, то есть ее разбавлением. Но это не приводит к уменьшению общего количества выводимых с желчью компонентов (ХС и желчных кислот). Таким образом, стимуляция элиминации желчных кислот с желчью может являться одной из

составляющих гипохолестеринемического действия исследуемых веществ и этот эффект более выражен при использовании ТО.

В метаболизме и регуляции перераспределения экзогенных и эндогенных липидов огромная роль принадлежит липазам крови. Липопротеинлипаза, или внепеченочная липаза, обнаруживается, главным образом, в жировой ткани и скелетных мышцах, где она связана с гликозаминогликанами, локализованными на люминальной поверхности капиллярного эндотелия. Фермент практически отсутствует в крови, однако после инъекции гепарина связь перестает удерживать липопротеинлипазу, и она поступает в кровяное русло, где взаимодействует с хиломикронами и ЛПОНП, гидролизуя триглицериды до составляющих. В связи с чем в следующей экспериментальной серии нами было выполнено изучение еще одной возможной точки приложения действия ТО и ТК – влияние на липолитическую активность в сыворотке крови при курсовом введении суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы. Установлено, что курсовое 30-дневное введение суммы ТО (100 мг/кг), суммы ТК (100 мг/кг) и фенофибрата (12,5 мг/кг) сопровождается потенцированием в сыворотке крови постгепариновой липолитической активности, более выраженным в группе животных, получавших тритерпеноиды облепихи, и регистрируемой по увеличению в крови концентрации свободных жирных кислот после внутривенных инъекций крысам гепарина.

Стимуляция липолиза и выброс продуктов гидролиза тканевых липидов является одним из патогенетических звеньев формирования гиперлипидемий и зависит от состояния механизмов регуляции активности липолитических гидролаз. Жиромобилизующая липаза осуществляет гидролиз триглицеридов, обеспечивает поступление в кровь неэтерифицированных жирных кислот с последующим их использованием в качестве энергетического материала. Липазу жировой ткани, кроме адреналина, активирует норадреналин, соматотропный гормон, адренокортикотропный гормон. На первой стадии внутриклеточного липолиза происходит гидролиз триглицеридов до диглицеридов, и эта медленная стадия лимитирует скорость всего процесса.

Стимулирует его цАМФ, образующийся аденилатциклазой в ответ на гормональную стимуляцию. Мембрана жировой клетки обладает двумя типами рецепторов гормонов. С первыми взаимодействуют катехоламины (адреналин или норадреналин), усиливающие образование цАМФ, а значит и липолиз, со вторыми взаимодействует инсулин, который снижает концентрацию цАМФ, противодействуя активации аденилатциклазы стимулирующими гормонами, и угнетает, таким образом, липолиз. При исследовании интенсивности липолиза в жировой ткани, индуцированного введением адреналина, определяли концентрацию в крови одного из конечных продуктов гидролиза триглицеридов – глицерина. Кроме того, дополнительно регистрировали уровень глюкозы, в регуляции которого катехоламины принимают активное участие. Полученные нами результаты свидетельствуют, что на фоне приема ТО, ТК и фенофибрата не происходит нарушений в механизме аденилатциклазной активации липолиза, вызванной введением адреналина. В данных исследованиях установлено, что введение исследуемых субстанций и препарата сравнения сопровождается естественной активацией липолиза, причем ее уровень достоверно не отличается от изменений в контрольной группе животных. Таким образом, в данных экспериментальных условиях ТК, ТО и фенофибрат не оказали влияния на тканевой липолиз. Регистрация характера изменений уровня глюкозы, которые представляли интерес с позиции оценки влияния соединений на известные механизмы гуморальной регуляции уровня глюкозы в крови, которая через ряд ключевых метаболитов имеет тесную связь с обменом липидов, было установлено, что введение ТК и ТО не оказало влияния на изменение концентрации глюкозы в крови после адреналиновой инициации гипергликемии; а на фоне введения фенофибрата отмечена четкая картина нарушения физиологического механизма стимуляции выхода глюкозы в кровяное русло, так как вопреки ожидаемому стандартному сдвигу концентрации глюкозы в крови в сторону увеличения после инъекции адреналина, отмечали обратную картину – достоверное по отношению к контролю снижение ее концентрации. Таким образом, курсовое введение ТО и

ТК не оказывает влияния на гормональнозависимый липолиз в жировых депо животных и не оказывает влияния на механизмы поддержания уровня глюкозы в крови. Курсовое введение фенофибрата в дозе 12,5 мг/кг вызывает нарушение физиологических механизмов регуляции уровня глюкозы в крови и также не влияет на интенсивность адреналининдуцированного липолиза.

Как известно, одной из составляющих механизма некоторых гипополипидемических препаратов является их способность образовывать в кишечнике труднорастворимые комплексы с липидами, в том числе и с холестерином, не поддающиеся резорбции. Нами изучено влияние ТО и ТК на задержку всасывания холестерина из кишечника. В опытах на интактных крысах-самцах после однократного введения холестерина (200 мг/кг) (контроль), ТО в дозе 100 мг/кг совместно с холестерином в той же дозе, ТК и холестерина в дозах, аналогичных дозам предыдущей группы, определяли содержание холестерина в крови подъязычной вены перед введением, через 2 и 4 часа после запаивания. Динамика изменения концентрации холестерина в крови в опытных группах достоверно не отличалась от динамики изменения у контрольных животных, то есть ТО и ТК не оказали влияния на процесс всасывания холестерина из желудочно-кишечного тракта.

В ряде исследований было установлено, что в патогенезе развития гиперлипидемии и атеросклероза определенную роль играют изменения интенсивности свободно-радикальных процессов, увеличение количества продуктов данных реакций, которые могут оказывать цитотоксическое действие на сосудистую стенку [4, 22, 57, 58, 235, 249, 260]. Учитывая, что в некоторых работах, продуктам ПОЛ отводится роль ведущих факторов риска развития атеросклероза [4, 45, 272], представилось интересным изучение возможности влияния исследуемых тритерпеноидов на интенсивность пероксидации, а также изучение их мембранопротекторных свойств в условиях экспериментальной гиперлипидемии.

Для оценки интенсивности перекисных процессов в опытах на животных при хронической гиперлипидемии определяли содержание ТБК-активных

продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови и устойчивость эритроцитов к спонтанному гемолизу. У крыс после воспроизведения модели алиментарной гиперлипидемии, регистрировалась активация свободно-радикального ПОЛ – увеличение количества ТБК-активных продуктов во фракции β - и пре- β -липопротеинов на 22% по отношению к контролю и рост значения показателя гемолиза по Ягерув 2,3 раза. Таким образом, при развитии алиментарной гиперлипидемии наблюдается усиление процессов пероксидации, что может приводить к значительным нарушениям в функционировании эндогенной антиоксидантной системы и усилению деструктивных процессов в клетке и её мембранах: повышение степени окисленности ФЛ и белков, рост проницаемости клеточных и субклеточных мембран для белков и ферментов, снижение их резистентности.

У животных, применявших ТО и ТК, наблюдалось достоверное улучшение изученных показателей по отношению к контролю.

Так применение ТО в дозе 10 мг/кг привело к следующему: уровень ТБК-активных продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови был ниже по сравнению с контролем на 57%, причём этот показатель был достоверно ниже, чем у животных интактной группы на 48% соответственно. Повышение дозы ТО до 100 мг/кг способствовало ещё в большей степени подавлению процессов ПОЛ. Уровень ТБК-активных продуктов в крови стал ещё меньше контрольных значений на 65%, что оказалось достоверно ниже группы здоровых животных на 58% соответственно (таблица 3.3.3.1).

В отношении животных, получавших ТК в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг, отмечается явное подавление процессов ПОЛ, причём увеличение дозы не влияет на способность данных соединений к снижению интенсификации ПОЛ, вызванной алиментарной гиперлипидемией. Применение ТК в дозе 10 мг/кг привело к уменьшению уровня ТБК-активных продуктов на 68%, а ТК в дозе 100 мг/кг на 70% соответственно. При этом содержание ТБК-активных продуктов было достоверно ниже значений интактной группы как в дозе 10 мг/кг, так и 100 мг/кг: 62% и 63% соответственно.

Интенсивность спонтанного гемолиза эритроцитов в большей степени уменьшилась под влиянием ТК в дозе 10 мг/кг и 100 мг/кг на 59% и 68% соответственно относительно контроля. В группе животных, получавших ТО, данный показатель полностью нормализовался при введении дозы 10 мг/кг и 100 мг/кг.

Применение ципрофибрата в дозе 50 мг/кг не повлияло ни на один из перечисленных показателей. На уровне контроля оставалось содержание ТБК-активных продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови, которое не имело достоверных отличий ни от контрольной, ни от интактной групп.

Все вышеперечисленное свидетельствует о значительной способности тритерпеноидных кислот, содержащихся в плодах облепихи и клюквы, снижать уровень показателей перекисного окисления липидов и оказывать мембраностабилизирующее действие, проявляющееся уже при использовании их в дозе 10 мг/кг.

Атеросклероз это хроническое иммуновоспалительное заболевание, протекающее с участием иммунцитов и медиаторов воспалительного процесса и иммунологических реакций. Для процесса атерогенеза характерны фундаментальные закономерности, свойственные любому воспалению: воздействие повреждающего фактора, клеточная инфильтрация, фагоцитоз и формирование соединительной ткани. Проникающие в интиму моноциты превращаются в макрофаги и активно секретируют биологически активные вещества [196, 218]. Наличие противовоспалительного компонента в механизме гиполипидемического средства может значительно повысить эффективность антисклеротической терапии. Учитывая ряд данных, свидетельствующих о наличии выраженной противовоспалительной активности тритерпеновых соединений [87, 183, 187, 190, 233] представилось интересным провести изучение противовоспалительной активности ТО и ТК при введении в дозе 100 мг/кг на моделях острого и хронического воспаления.

При введении ТО в дозе 100 мг/кг на фоне каррагенинового отека отмечали снижение интенсивности отека лапки экспериментальных животных на 25%, но эти изменения не были достоверны по отношению к значениям контрольной группы. ТК более эффективно, чем ТО, подавляют экссудативную реакцию, вызванную субплантарным введением каррагенина (62%). Введение диклофенака привело к снижению степени прироста объема лапы животных на 70%. Причем, эффективность ТК и диклофенака была достоверно выше эффективности ТО на 49% и 60% соответственно.

При исследовании влияния тритерпеноидов на интенсивность воспалительного процесса на модели хронического адьювантного артрита, при их использовании по лечебной схеме введения, на 25 сутки введение ТК привело к достоверному снижению прироста объема правой лапки, в результате чего средний объем правой лапки в данной группе животных был ниже значений контрольной группы на 24%. Оценка степени влияния на вторичное воспаление показало, что отмечалась тенденция к снижению отека (4% относительно контроля), но данные изменения не носили достоверный характер. Использование диклофенака сопровождалось достоверным уменьшением объема правой и левой лапки, по сравнению с контролем, на 25% и 12% соответственно. При введении ТО достоверных изменений объемов снижения правой и левой лапки выявлено не было. На 25 сутки в контрольной группе отмечали увеличение содержания лейкоцитов. Достоверное снижение данного показателя отмечали при введении ТК и диклофенака. Анализ данных показал, что при использовании лечебной схемы введения диклофенак уменьшал интенсивность первичной и вторичной воспалительной реакции, ТК уменьшал первичную реакцию и оказывал влияние на формирование вторичного воспаления. Применение ТО в данных условиях не оказало достоверно значимого влияния на воспалительный процесс.

При лечебно-профилактическом введении исследуемых препаратов отмечали статистическое снижение объема правой лапы по отношению к контрольным значениям при введении ТК, ТО и диклофенака на третьи сутки

на 24%, 12% и 24% соответственно. Изменения в объеме левой лапки на третьи сутки не выявлены во всех группах животных. На 14 сутки после введения адьюванта онкометрическая оценка состояния правой лапки показала аналогичную третьим суткам картину. Оценка интенсивности вторичной воспалительной реакции, регистрируемая по изменению объема контрлатеральной (левой) лапки показала, что введение исследуемых соединений и диклофенака сопровождалось предупреждением вторичного иммунного воспаления, так как объем левой лапки в опытных группах остался на уровне исходных значений. Гематологические исследования картины периферической крови на 14 день после моделирования адьювант-индуцированного артрита показали достоверное, по отношению к интактным животным, увеличение количества лейкоцитов без изменения соотношения между их основными субпопуляциями во всех опытных группах. При этом в группах, получавших ТК и диклофенак, уровень лейкоцитов был достоверно ниже значений контрольной группы.

Таким образом, ТО и ТК при использовании их в дозе 100 мг/кг проявляют противовоспалительное действие в условиях моделирования острого и хронического воспаления, более выраженное у тритерпеноидов клюквы. Для многих представителей терпеноидов подтверждена противовоспалительная активность и установлены механизмы противовоспалительного действия: мембранопротекторные свойства [77] и влияние на высвобождение медиаторов воспаления, блокирования липооксигидазных и циклооксигидазных механизмов синтеза воспалительных медиаторов [183, 233], снижение продукции сериновых протеиназ [187] и металлопротеиназ [87], уменьшение выраженности хемотаксиса иммунных клеток [100], уменьшение степени участия системы комплемента в воспалительном процессе [234] и выделение провоспалительного интерлейкина (ИЛ-1) [232]. Противовоспалительную активность тритерпеноидов связывают с их стероидоподобным действием [190]. Противовоспалительный эффект олеаноловой кислоты доказан в тесте каррагинин-индуцированного и формалинового отека лапы крысы, а также был

подтвержден на модели острого воспаления индуцированного введения декстрана и на модели адьювантного артрита [101, 132]. Олеаноловая кислота уменьшает кислото-индуцированную и гистамин-индуцированную проницаемость сосудов у крыс [132]. Урсоловая кислота оказалась эффективной на модели каррагининового отека, а также уменьшала количество корчей, стимулированных уксусной кислотой [265]. Механизмы противовоспалительных эффектов олеаноловой кислоты и урсоловой кислоты связывают со следующими аспектами фармакодинамики: ингибируют высвобождение гистамина из тучных клеток [95, 115], ингибируют липоксигеназную и циклооксигеназную активность [123], подавляют экспрессию определенных онкогенов [150]. Соответственно, в реализации противосклеротического действия большего успеха могут достигнуть вещества, сочетающие как гиполипидемическую, так и противовоспалительную активность.

Важной составляющей антиатерогенной терапии является коррекция сдвигов системы гемостаза, являющихся следствием атеросклеротического процесса и в последствии включающихся в патогенез в качестве активных участников. Гиперлипидемические состояния сами по себе могут сопровождаться количественными и качественными изменениями состояния свертывающей системы. Так в исследовании [52] продемонстрировано, что тридцатидневное внутривенное введение жировой эмульсии «Липофундин» кроликам, помимо характерных сдвигов показателей липидного обмена, привело к укорачиванию времени свертывания на 42%. Содержание животных в течение трех месяцев на атерогенной диете сопровождается снижением показателей антикоагулянтной и фибринолитической активности (на 20-27%) [68].

В связи с этим нам представилось интересным оценить изменения показателей свертывающей системы в условиях экспериментальной гиперлипидемии и их коррекцию тритерпеновыми соединениями облепихи и

кляквы, а также исследовать состояние некоторых показателей гемостаза при курсовом введении тритерпеноидов здоровым животным.

Месячная обогащенная липидами диета повлияла на состояние характеристик процесса свертывания крови – достоверное уменьшение по сравнению с интактными значениями продолжительности свертывания крови на 40% и времени окончания свертывания на 29%. В опытных группах животных, получавших ТО в дозе 10 мг/кг, отмечали достоверное увеличение продолжительности свертывания на 52% и времени окончания свертывания на 56%. Введение ТК в дозе 10 мг/кг также сопровождалось достоверным изменением этих характеристик в сторону увеличения на 40% и 52% соответственно, при этом и в одной, и в другой группе животных данные показатели полностью нормализовались, так как достоверно не отличались от значений здоровых животных. Использование ТО и ТК в дозе 100 мг/кг привело к достоверному увеличению, по сравнению с контрольной группой животных, времени окончания свертывания на 67% и 73% соответственно, продолжительности времени свертывания на 74% и 77% соответственно, и эти показатели также полностью нормализовались. На фоне введения ципрофибрата в дозе 50 мг/кг отмечали восстановление до нормальных значений нарушенных показателей свертывающей системы крови.

На фоне моделирования витаминной модели гиперлипидемии отмечали достоверное, по отношению к контролю, сокращение времени окончания свертывания на 26% за счет уменьшения продолжительности свертывания на 28%. Введение тритерпеноидов в дозе 100 мг/кг сопровождалось увеличением продолжительности свертывания крови при использовании ТО на 28% и ТК на 42%, причем данный показатель полностью нормализовался, так как отсутствовали достоверные отличия по отношению к интактным значениям. В случае использования фенофибрата все исследуемые показатели остались на контрольном уровне. При введении розувастатина отмечали некоторое увеличение времени начала свертывания (+20%) и продолжительности свертывания (+23%), но данные изменения не были достоверными, по

сравнению с контролем. Значение показателя время окончания свертывания в группе животных, получавших статины, достоверно возросло, по сравнению с контролем, на 22%.

Таким образом, развивающийся дисбаланс свертывающей системы, спровоцированный пероральным введением витамина D₂ и холестерина, проявляется повышением свертывающей активности крови. Введение исследуемых объектов и розувастатина сопровождается полным восстановлением регистрируемых в коагулографических исследованиях показателей до уровня нормы. Применение фенофибрата не вызывало положительных сдвигов.

Курсовое 30-дневное введение ТО в дозах 100 мг/кг здоровым животным вызвало задержку начала свертывания в данной группе животных на 81%, по сравнению с контрольным уровнем. Использование ТО продлило время свертывания крови на 24% и как следствие вышеописанных изменений рост значения окончания свертывания крови на 39%. В аналогичных условиях введение ТК достоверно продлило время инициации свертывания крови на 69% и несколько увеличило время свертывания (+13%), но изменение этой характеристики было недостоверно, по отношению к значениям контрольных животных. В целом увеличение времени свертывания и начала свертывания привело к достоверному росту времени окончания свертывания крови на 28%. Введение ципрофибрата в аналогичных условиях не повлияло на исследуемые показатели гемостаза.

Таким образом, внесение изменений в стандартный рацион питания животных с включением повышенного количества нейтральных липидов и ХС сопровождается помимо отклонений от нормальных значений биохимических показателей, также изменениями реологических свойств крови, состояния и степени реакции свертывающей системы. Повышение свертываемости крови на фоне гиперлипидемии это дополнительный и весьма серьезный фактор риска, значительно увеличивающий вероятность сосудистой патологии. Испытываемые тритерпеновые соединения уже в дозе 10 мг/кг нивелировали

нежелательные сдвиги характеристик системы гемостаза, в результате чего время свертывания крови достигло нормальных значений. При использовании дозы препаратов 100 мг/кг время свертывания крови достоверно не отличалось от интактных значений и значений группы животных, которые получали ТО и ТК в дозе 10 мг/кг, но отмечали значительное увеличение времени начала реакции свертывания (на 50% для ТО и на 61% для ТК). Такая направленность действия используемых тритерпеновых соединений прослеживалась и при изучении их влияния на показатели гемостаза у здоровых животных. И в случае ТО, и в случае ТК увеличивалось время начала свертывания крови. Кроме того, у здоровых животных под действием тритерпеноидов отмечали продление времени свертывания, которое при введении ТО оказалось достоверно выше интактных значений, а при использовании ТК отмечали тенденцию к увеличению, но эти изменения были недостоверны.

Таким образом, совокупность свойств ТО и ТК установленная при их введении животным в физиологических условиях и на фоне экспериментальных гиперлипидемий позволяет рекомендовать субстанций ТО и ТК для разработки препаратов для лечения и профилактики дислипидемий и/или атеросклероза.

ВЫВОДЫ

1. ТО и ТК, выделенные из шрота плодов облепихи и клюквы, обладают безопасным токсикологическим профилем. Полученные результаты определения «острой» токсичности исследуемых субстанций на крысах позволяют отнести ТО и ТК по классификации Hodge H.C., Sterner L.H. к 6 классу токсичности – относительно безвредным веществам. Значения LD₅₀ находятся в диапазоне, превышающем 30000 мг/кг.
2. Оптимальной терапевтической дозой, установленной при изучении гиполипидемической активности тритерпеноидов на модели твиновой гиперлипидемии, является для ТО и ТК – 100 мг/кг. Гипохолестеринемический эффект проявляется при курсовом применении ТО и ТК уже в дозе 10 мг/кг. Увеличение дозы сопровождается усилением эффективности гиполипидемического действия.
3. В условиях хронической алиментарной гиперлипидемии лечебно-профилактическое введение ТО и ТК в дозе 100 мг/кг оказывает нормализующее влияние на состояние показателей липидного обмена в крови и печени, более выраженное у ТО, восстанавливает белково-синтетическую функцию печени и нормализует уровень глюкозы. ТО и ТК по эффективности превосходят действие препарата сравнения ципрофибрата. – уровень в крови холестерина и холестерина β -липопротеинов был достоверно ниже по сравнению со значениями животных, которым вводили ципрофибрат, при использовании ТО и ТК соответственно на 42% и 24%, 72% и 46%.
4. Введение ТО и ТК интактным животным в дозе 100 мг/кг в течение двух месяцев не влияет на концентрацию ОХС в крови, уменьшает уровень холестерина β -липопротеинов, проявляет гипотриглицеридемический эффект, регистрируемый в равной степени и у ТО, и ТК уже через месяц введения и сохраняющийся до конца эксперимента. На фоне введения ТО

и ТК отмечается снижение уровня свободного ХС, свободных жирных кислот и глюкозы в крови.

5. При введении ТО и ТК в дозе 100 мг/кг здоровым животным отмечается изменение состава желчи при сохранении скорости и объема секреции, а именно: увеличение концентрации желчных кислот при неизменном содержании ХС. В целом это сопровождается улучшением антилитогенных свойств желчи, о чем свидетельствует повышение значения холято-холестеринового коэффициента.
6. Курсовое 30-дневное введение ТО и ТК в дозе 100 мг/кг потенцирует постгепариновую липолитическую активность сыворотки крови, более выраженную в группе животных, получавших тритерпеноиды облепихи.
7. Тритерпеновые соединения облепихи и клюквы обладают дополнительными плеiotропными эффектами, которые могут способствовать повышению эффективности антиатерогенной терапии: снижают интенсивность свободно-радикальных процессов на фоне алиментарной гиперлипидемии и проявляют мембранопротекторное действие (уменьшение концентрации ТБК-активных продуктов в суммарной фракции β - и пре- β -липопротеинов крови, подавление спонтанного гемолиза эритроцитов); ТО и ТК при использовании их в дозе 100 мг/кг проявляют противовоспалительное действие в условиях моделирования острого и хронического воспаления, более выраженное у ТК; ТО и ТК в дозе 100 мг/кг устраняют развивающийся дисбаланс свертывающей системы, спровоцированный атерогенной диетой (алиментарная гиперлипидемия), пероральным введением витамина D₂ и холестерина, проявляющийся повышением свертывающей активности крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследований свидетельствуют о выраженной гиполипидемической эффективности ТО и ТК, установленной на нескольких моделях дислипидемий, что делает перспективным возможность использования субстанций ТО и ТК для разработки препаратов в целях лечения и профилактики дислипидемий и/или атеросклероза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алеева Г.Н. Апоптоз в патогенезе атеросклероза / Г.Н. Алеева, М.В. Журавлева // Фарматека. – 2005. – № 8. – С. 28–31.
2. Альтернативы биомедицины: Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В.Грачева – Москва, 2010. – 344 с.
3. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании: «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России» / С.А. Шальнова, А.О. Конради, Ю.А. Карпов и др. // Российский кардиологический журнал. – 2012. – N 5. – С. 6–11.
4. Антиокислительные и гиполипидемические свойства мексидола и эмоксипина при длительном иммобилизационном стрессе / А.В. Зорькин, Л.Д. Смирнов, В.И. Инчина и др. // Хим.-фарм. журн. – 1998. –Т. 32, № 5. – С. 3–5.
5. Аронов Д.М. Лечение и профилактика атеросклероза / Д.М. Аронов // М.: Триада-Х, 2000. – 411 с.
6. Аронов Д.М. Современные методы лечения атеросклероза / Д.М. Аронов // Терапевт. арх. – 1997. – Т. 69, № 11. – С. 75–81.
7. Балаковский С.Д. Методы химического анализа крови / С.Д. Балаковский, И.С. Балаковский. – М., 1953. – 295 с.
8. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Хим.- фармац. журн. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 32–34.
9. Василенко Ю.К. Клинико-биохимические основы патологии и биохимической лабораторной диагностики: учеб.пособие / Ю.К. Василенко. – Пятигорск: Ротапринт ПятГФА, 2005. – 112 с.
10. Василенко Ю.К. Сравнительное исследование гиполипидемических свойств тритерпеноидов / Ю.К. Василенко, В.Д. Пономарев, Э.Т. Оганесян // Хим. фармац. журн.– 1981. – № 5. – С. 5053.

11. Взаимосвязь изменений реологических свойств крови и нарушений микроциркуляции на ранних и поздних стадиях экспериментальной гиперлипопротеидемии / В.К. Хугаева, Е.Д. Клименко, П.Н. Александров и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1985. – Т. 100, № 7. – С. 15–18.
12. Взаимосвязь между выраженностью коронарного атеросклероза, факторами риска и маркерами атеросклеротического поражения каротидных и периферических артерий. / Н.Е. Гаврилова, В.А. Метельская, Н.В. Перова и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2013. – № 12(1). – С. 40–45.
13. Возможные пути фармакологической коррекции нарушений липидного обмена при атеросклерозе / А.А. Пентюк, Р.П. Пискун, В.К. Серкова, Т.Л. Полеся // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1997. – Т. 60, № 2. – С. 78–85.
14. Выявление антигенных различий апо-В нативных и циркулирующих модифицированных ЛПНП / И.В. Супрун, А.А. Мельниченко, Е.В. Янушевская и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 8. – С. 50–53.
15. Гиполипидемические свойства тритерпеноидов / Василенко Ю.К. Лисевицкая Л.И., Фролова Л.М. и др. // Фармакология и токсикология. – 1982. – № 3. – С. 66–70.
16. Гиполипидемическое действие сесквитерпеновых лактонов арглабина и ахиллина на модели острой гиперлипидемии / А.В. Ратькин, О.А. Кайдаш, Ю.А. и др. // Сибирское медицинское обозрение. – 2014. № 5 (89). С. 40-43.
17. Горбачев В.В. Атеросклероз: учебное пособие / В.В. Горбачев, А.Г. Мрочек. – Минск: Кн. Дом, 2005. – 608 с.
18. ГОСТ 33215 – 2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и

организации процедур. – Введ. 01.07.16. – М.: Стандартинформ, 2014 – 48 с.

19. ГОСТ 33216 – 2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами – Введ. 01.07.16. – М.: Стандартинформ, 2014 – 38 с.
20. Грацианский Н.А. Эзетимиб – перспективный компонент комбинированной гиполипидемической терапии / Н.А. Грацианский // Фарматека. – 2005. – № 13. – С. 11–18.
21. Губарь Е.Н. Гиперлипидемия и роль статинов в лечении атеросклероза и его осложнений / Е.Н. Губарь, А.Г. Мрочек // Медицинские новости – 2006. – Т. 2, № 8. – С. 27–36.
22. Давиденкова Е.Ф. Атеросклероз и процесс перекисного окисления липидов / Е.Ф. Давиденкова, М.Г. Шафран // Вестн. АМН СССР. – 1989. – № 3. – С. 10–17.
23. Демографический ежегодник России. 2015: Стат. сб./ Росстат. – М., 2015. – 263 с.
24. Денисова С.В. Фитованны нового поколения рецептуры «Прима» как способ профилактики атеросклероза / С.В. Денисова, Р.А. Дубинский // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2004. – Вып. 59. – С. 264–265.
25. Дерюгина А.В. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови: метод. пособие / А.В. Дерюгина, А.С. Корягин, С.В. Копылова, М.Н. Таламанова – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета, 2010. – 25 с.
26. Десалирование снижает устойчивость апо-В-содержащих липопротеидов к ассоциации, повышая их атерогенный потенциал / А.А. Мельниченко, В.В. Тертов, О.А. Иванова и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 7. – С. 60–64.

27. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации V пересмотр. / В.В. Кухарчук, Г.А. Коновалов, А.С. Галявич и др. // Разработаны Комитетом экспертов ВНОК. – М., 2012. – 29 с.
28. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях 1986 года [Электронный ресурс] — Доступ из справ.-правовой системы КонсультантПлюс.
29. Затейщиков Д.А. Симвастанин: достижение последних лет и текущие задачи / Д.А. Затейщиков // Фарматека. – 2005. – № 13 (108). – С. 39–44.
30. Затейщикова А.А. Ловастанин: современный взгляд на первый статин / А.А. Затейщикова // Фарматека. – 2005. – № 13 (108). – С. 63–72.
31. Зезеров Е.Г. Биохимические аспекты атеросклероза: этиология, патогенез, диагностика, профилактика, лечение / Е.Г. Зезеров // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. – 1999. – № 1. – С. 49–55.
32. Изучение гипополидемического действия экстракта лука медвежьего (черемши) (ALLIUM MURSINUM L.) / К.А. Айрапетова, Е.О. Сергеева, Е.В. Компанцева и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 1(4). – С. 758–760.
33. Карпов Р.С. Атеросклероз: некоторые современные вопросы патогенеза, диагностики, лечения и профилактики / Р.С. Карпов, В.А. Дудко // Клинич. медицина. – 1999. – № 12. – С. 9–13.
34. Карпов Ю.А. Антагонисты кальция в современной стратегии лечения сердечно-сосудистой патологии: результаты последних клинических исследований с нифедипином ГИТС / Ю.А. Карпов // Фарматека. – 2005. – № 13 (108). С. 33–38.
35. Киселева Н.Г. Обоснованность и тактика применения витаминов-антиоксидантов в профилактике атеросклероза / Н.Г. Киселева, В.А. Метельская, Т.В. Перова // Кардиология. 1998. – № 12. – С. 93–97.

36. Климов А.Н. О необычном пути выведения клеткой синтезированного белка / А.Н. Климов, В.А. Нагорнев // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1996. – Т. 122, № 9. – С. 268–270.
37. Клиническая иммунология / Под ред. А.В. Караулова. – М., 1999. – 416 с.
38. Клиническая лабораторная аналитика: В 3 т. Том III. Частные клинические технологии в клинической лаборатории / Под ред. В.В. Меншикова. – М.: Лабпресс, 2000. – 384 с.
39. Колб В.Г. Справочник по клинической химии / В.Г. Колб, В.С. Камышников – Минск: Беларусь, 1982. – 336 с.
40. Комаров А.Л. Значение антитромботической терапии для профилактики осложнений атеросклероза / А.Л. Комаров, Е.П. Панченко // Рос.мед. журн. – 2003. – Т. 11, № 19. – С. 34–37.
41. Корочкин И.М. Иммунологические аспекты атеросклероза / И.М. Корочкин, И.И. Селиванов // Сов.медицина – 1983. – № 6. – С. 47–51.
42. Кухарчук В.В. Актуальные вопросы лечения атеросклероза / В.В. Кухарчук // Терапевтич. арх. – 1996. – Т. 68, № 12. – С. 5–7.
43. Лабораторная диагностика нарушений обмена липидов: Учебное пособие / В.В. Долгов, В.Н. Титов, М.Г. Творогова и др.: М., 1999. – 237 с.
44. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте – 3-е изд. перераб. и доп. /И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – К.: Вища школа, 1983.– 383 с.
45. Ланкин В.З. Степень окисленности мембранных фосфолипидов и активность микросомальной системы гидроксилирования холестерина в печени животных при атерогенезе / В.З. Ланкин, Н.В. Котелевцева // Вопр. мед.химии. – 1981. – Т. 27, № 1. – С. 133–135.
46. Литвинчук М.Д. Точный и быстрый метод оценки активности желчегонных средств на крысах / М.Д. Литвинчук, З.И. Новосилец // Бюл. эксперим. биологии и медицины – 1980. – № 6. – С. 750–752.
47. Лутай М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез / М.И. Лутай // Украинский кардиологический журнал. – 2004. – № 1. – С. 22–34.

48. Лякишев А.А. Эзетимиб: новый гиполипидемический препарат с уникальными свойствами / А.А. Лякишев // Фарматека. – 2005. – № 6. – С. 46–50.
49. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.
50. Нагорнев В.А. Современные представления о механизмах развития атеросклероза / В.А. Нагорнев, А.Д. Денисенко // Пат. физиология и эксперим. терапия. – 1989. – № 2. – С. 3–10.
51. Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией (Российский согласительный документ). Часть 1. Периферические артерии. М: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2010. – 176 с.
52. Немытышева Е.В. Роль иммунологических и метаболических изменений в иницировании воспалительного процесса в раннюю стадию экспериментального атерогенеза / Е.В. Немытышева, Н.Е. Щеглова, В.В. Заварин, Е.Н. Егорова / Фундаментальные исследования. – 2013. – № 5. – С. 111–114.
53. Новиков К.Н. Роль активных форм кислорода в биологических системах при воздействии факторов окружающей среды: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2004. – 45 с.
54. Окислительный стресс при атеросклерозе и диабете / В.З. Ланкин, М.О. Лисина, Н.Е. Арзамасцева и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2005. – Т. 140, № 7. – С. 48–51.
55. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антиоксидантов / С.В. Оковитый // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – № 5. – С. 85–111.
56. Окуневич И.В. Гиполипидемическое и антиатеросклеротическое действие симпатолитика резерпина: экспериментальные данные / И.В. Окуневич, Л.К. Хныченко, Н.С. Сапронов / Артериальная гипертензия. – 2007. – ТОМ 13 № 2. – С. 136–140.

57. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи / В.П. Мирошниченко, Громашевская Л.Л., Касаткина М.Г. и др. // Лаб. дело. – 1978. – № 3. – С. 149–153.
58. Орехов А.Н. Множественные модификации липопротеидов низкой плотности в крови больных атеросклерозом / А.Н. Орехов, В.В. Тертов, В.Л. Назарова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1995. – Т. 120, № 8. – С. 118–120.
59. Орехов А.Н. Современные методы прямой терапии атеросклероза / А.Н. Орехов // Новости медицины и фармации. – 1995. – № 4. – С. 30–38.
60. Осипов С.Г. Иммунологические аспекты атеросклероза / С.Г. Осипов // Клинич. медицина. – 1989. – Т. 67, № 1. – С. 27–37.
61. Панфилова Т.В. Влияние тритерпеноида милиацина на чувствительность лимфоцитов тимуса и селезенки к апоптозу, индуцированному дексаметазоном / Т.В. Панфилова, А.А. Штиль, Е.Р. Полосухина и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. – 2003. – Вып. 136(10). – С. 382–385.
62. Пасешниченко В.А. Успехи в изучении физиологической активноститритерпеноидов и стероидов / В.А. Пасешниченко // Биохимия. – 1992. – Вып. 57(7). – С. 986–1003.
63. Патент 2414234 РФ МПК А61К 36/45 В01D 11/02А61Р 3/00 Способ получения средства, обладающего гипохолестеринемическим и гиполипидемическим действием, из шрота клюквы / С.А. Попов, Э.Т. Оганесян, А.Ю. Терехов и др.; Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук (НПОХ СО РАН), ООО Компания "Сибирские натуральномасла" (Компания "СиНаМ") – № 2009149802/15; Заяв. 31.12.2009; Опубл. 20.03.2011 Бюл. № 8
64. Позднякова С.В. Морфофункциональное исследование цитопротекторного действия аланинамидных производных бетулоновой кислоты на модели цитотоксического повреждения органов: автореф. дис. ...д-ра биол. наук. – Новосибирск, 2007. – 39 с.

65. Позняк А.Л. CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE – инфекция как фактор риска развития атеросклероза (обзор литературы) / А.Л. Позняк С.Н. Сидорчук, А.В. Тарасов // Журнал инфектологии.– 2013. – Том 5, № 1.– С. 18–27.
66. Рекомендации Европейского общества кардиологов и Европейского общества атеросклероза по лечению дислипидемий / Z. Reiner, A.L. Catapano, G. De Backer et al. // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2012. – прил. №1. – 63 с.
67. Репин В.С. Современные представления о механизмах гиполипидемического действия монокалинов и фибратов (обзор) / В.С. Репин, В.А. Косых // Хим.-фармац. журн. – 1990. – Т. 24, № 8. – С. 5–8.
68. Рочев Д.Л. Роль регуляторных пептидов (Pro-Gly-Pro-Leuileu-Pro-Gly-Pro) в процессах фибринообразования, фибринолиза илипидного обмена в норме и при гиперхолестеринемии: автореф. дис. ... к. биол. н.: М., 2013. – 19 с.
69. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А.Н. ВАСИЛЬЕВ и др. // М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
70. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. члена-кор. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
71. Рыженков В.Е. Гипоксия и атерогенез. Антиатерогенные свойства некоторых средств с антигипоксическим действием / В.Е. Рыженков, В.Г. Макаров, А.Е. Александрова // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы 9 Междунар. съезда 22-25 июля 2005 г. – СПб., 2005. – С. 126–132.
72. Сентебова Н.А. Предложения по унификации методов определения триглицеридов в сыворотке крови / Н.А. Сентебова, Н.В. Салицкая //

- Унификация лабораторных методов исследований. – М: 1978. – Вып. 8. – С. 67–75.
73. Строев Е.А. Практикум по биологической химии / Строев Е.А., Макарова В.Г. – М.: Высш. шк., 1986. – 127 с.
74. Тюрюханова И.Д. Морфометрический анализ регрессии изменений, происходящих в коре надпочечников при экспериментальной гиперхолестеринемии / И.Д. Тюрюханова, Б.Я. Рыжавский // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1986. – Т. 100, № 3. – С. 365–367.
75. Упницкий А.А. Антиатеросклеротические эффекты ингибиторов АПФ расширяют их терапевтический потенциал / А.А. Упницкий // Фарматека. – 2002. – № 4. – С. 3–7.
76. Фенотипирование гиперлипопротеидемий / под ред. А.Н. Климова. – М., 1975. – 31 с.
77. Фролов Б.А. Милиацин как мембранопротектор. Защитное действие милиацина при детергент-индуцированной иммуносупрессии / Б.А. Фролов, Кириллова А.В. // Рос. аллергол. журн. – 2011 – Т.4, №1. – С. 402–403.
78. Чулкова Т.М. Роль процессов тромбообразования в атеросклерозе (обзор) / Т.М. Чулкова // Вопр. мед. химии. – 1989. – Т. 35, № 4. – С. 3–9.
79. Шакиров Д.Ф. Состояние системы перекисного окисления липидов в организме экспериментальных животных после воздействия циклических углеводов / Д.Ф. Шакиров, Д.А. Еникеев // Пат.физиология и эксперим. терапия. – 2003. – № 1. – С. 26–28.
80. Шальнова С.А. Характеристика пациентов высокого риска. Результаты эпидемиологической части научно-образовательной программы ОСКАР. / С.А. Шальнова, А.Д. Деев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика 2006. – N 5. – С. 58–63.
81. Шальнова С.А., Тенденции смертности в России в начале XXI века (по данным официальной статистики) / С.А. Шальнова, А.Д. Деев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2011. – № 6, С. 5–10.

82. Шапиро Д.К. Пыльца растений – концентрат биологически активных веществ / Д.К. Шапиро. – Минск: Наука и техника, 1985. – С. 70.
83. Шарапов И.В. Влияние производных бетулина на антиоксидантный гомеостаз и метаболизм ксенобиотиков в печени при экспериментальной полихимиотерапии: автореф. дис. ... канд. мед.наук. – Томск, 2009. –24 с.
84. Шварц Г.Я. Современное состояние лекарственной терапии атеросклероза (обзор) / Г.Я. Шварц // Хим.-фармац. журн.– 1990. – Т. 24, № 8. – С. 13–22.
85. Энтеросорбенты в лечении атеросклероза / А.А. Пентюк, Р.П. Пискун, В.К. Серкова и др. // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1998. – Т. 61, № 2. – С. 69–74.
86. Эффекты грассгемина и грассмизина при модели острой гиперлипидемии, индуцированной этанолом / А.В. Ратькин, О.А. Кайдаш, В.В. Иванов и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. Т. 13. № 1. С. 67-72.
87. A synthetic triterpenoid selectively inhibits the induction of matrix metalloproteinases 1 and 13 by inflammatory cytokines / K.S. Mix, J.A. Mengshol, U. Benbow et al. // Arth. Rheum. – 2001. – Vol. 44. –pp.1096–1104.
88. Active cytomegalovirus replication in patients with coronary disease / S. Gredmark, L. Jonasson, D. Van Gosliga et al // Scandinavian Cardiovascular Journal. – 2007. – Vol. 41, № 4. – pp. 230–234.
89. Adoptive transfer of β 2-glycoprotein i-reactive lymphocytes enhances early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice / J. George, D. Harats, B. Gilburd et al. // Circulation. – 2000. – Vol. 102, № 15. – pp. 1822–1827.
90. Aikawa M. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach / M. Aikawa, P. Libby // Cardiovascular Pathology. – 2004. –Vol. 13, № 3.– pp. 125–138.
91. Alaupovic P. The nomenclature of serum lipoproteins / P. Alaupovic // Amer. Assoc. Bioanalysts. – 1978. – Vol.4. – pp.1–3.

92. Alkanani T. Effect of ethanolic extract of cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*) on plasma cholesterol and atherosclerotic lesions in golden syrian hamster / T. Alkanani, S. Ghazala, W.H. Aldoori // *Atherosclerosis Supplements*. – 2008. – Vol. 9, Issue 1. – P.135
93. Anderson T.J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy / T.J. Anderson // *J Am Coll Cardiol* –1999. –Vol.34.–pp. 631–638.
94. Antibodies against heat shock protein 60 derived from *Helicobacter pylori*: diagnostic implications in cardiovascular disease / T. Okada, K. Ayada, S. Usui et al. // *Journal of Autoimmunity*. – 2007. – Vol. 29, № 2-3. – pp. 106–115.
95. Antifertility effect in male rats of oleanolic acid, a triterpene from *Eugenia jambolana* flowers / M.Rajasekaran, J.S. Bapna, S. Lakshmanan et al. // *Journal of Ethnopharmacology*. – 1988. – Vol. 24. –pp.115–112.
96. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice / F.A. Santos, Ju.T. Frota, B.R. Arruda et al. // *Lipids in Health and Disease*. – 2012. – Vol. 11. –pp. 98–116. doi:10.1186/1476-511X-11-98
97. Antihyperglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of total saponins extracted from *Aralia taibaiensis* in experimental type 2 diabetic rats / Y. Weng, L. Yu, J. Cui et al. // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. –Vol. 152, Issue 3. –pp. 553–560.
98. Antihyperlipidaemic Activity of *Spermacoe hispida* Ethanolic Extract in Triton WR-1339 Induced Hyperlipidaemic Rats / G. Sivaelango, P. Senthil Kumaran, P. Kumaravel et al.// *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2012. – Vol. 02. –pp. 95–98.
99. Antihyperlipidemic activity of *Mangifera indica* l. leaf extract on rats fed with high cholesterol diet / K.A. Shah, M.B. Patel, S.S. Shah et al. // *Der Pharmacia Sinica*. – 2010. – Vol. 1(2). –pp. 156–161.

100. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel / B. Vazquez, G. Avila, D. Segura, B. Escalante // J. Ethnofarmacol. – 1996. –Vol. 55. –pp. 69–75.
101. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice / G.B. Singh, S. Singh, S. Bani et al. // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 1992. – Vol.44. –pp. 456–458.
102. Anti-lipoprotein lipase antibodies: a new player in the complex atherosclerotic process in systemic lupus erythematosus? / J. F. de Carvalho, E. F. Borba, V. S. T. Viana et al. // Arthritis & Rheumatism. – 2004. – Vol. 50, № 11. – pp. 3610–3615.
103. Antimalarial activity and nucleosidetransport inhibitory activity of the triterpenic constituents of Cimicifuga spp. / M. Takahira, A. Kusano, M. Shibato et al. // Biol. Pharm. Bull. – 1998. – Vol. 21. –pp.823–828
104. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of Sida rhomboidea leaves / S. Venkatesh, Y.S. Reddy, B. Suresh et al. // J. Ethnopharmacol. – 1999. – Vol. 67. –pp. 229–32.
105. Antioxidant and antihyperlipidemic effect of Solanum nigrum fruit extract on the experimental model against chronic ethanol toxicity / V. Arulmozhi, M. Krishnaveni, K. Karthishwaran et al. // Pharmacognosy Mag. –2010. – Vol. 6(21). –pp. 42–50.
106. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, Terminalia catappa L. from Okinawa Island and its tannin corilagin / S. Kinoshita, Y. Inoue, S. Nakama et al. // Phytomedicine. – 2007. – Vol. 14(11). – pp. 755–762.
107. Antiproliferative effects of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) extracts on human colon and liver cancer cell lines / C. Grey, C. Widén, P. Adlercreutz et al. // Food Chemistry. – 2010. –Vol. 120, Issue 4. –pp. 1004–1010.
108. Apolipoprotein(a) induces monocyte chemotactic activity in human vascular endothelial cells / M. Poon, X. Zhang, K. G. Dunskey et al. // Circulation. – 1997. – Vol. 96, № 8.– pp. 2514–2519.

109. Bader T. The myth of statin-induced hepatotoxicity / T. Bader // *Am J Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 105. – pp. 978–980.
110. Banerjee S.K. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review / S.K. Banerjee, S.K. Maulik, // *Nutr. J.*, – 2002. – Vol.1, pp. 4.
111. Bendick A. Physiological role of antioxidants in the immune system / A. Bendick // *J. Dairy Sci.*–1993. – Vol. 76, № 9. –pp. 2789–2794.
112. Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives / Chowdhury A., Mandal S., Mitta B. et al. // *Med. Sci. Monit.* – 2002. – Vol. 8. – pp. 254–265.
113. Bhandari U. The effect of aqueous extract of *Embelia ribes* Burm on serum homocysteine, lipids and oxidative enzymes in methionine induced hyperhomocysteinemia / U. Bhandari // *Indian J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 40(4). –pp. 152–157.
114. Bhattacharjee S. Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: the two faces of oxidative stress / S. Bhattacharjee // *Current science.* – 2014. – VOL. 107, N. 11, – pp. 1811–1823.
115. Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells / T. Tsuruga, Y.T. Chun, Y. Ebizuka, U. Sankaw // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* – 1991. – Vol. 39, № 12. –pp. 3276–3278.
116. Bonetti P.O. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk / P.O. Bonetti, L.O. Lerman, A. Lerman // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2003. – Vol. 23.–pp. 168–175.
117. Boulay J.L. Molecular phylogeny with type I cytokines and their cognate receptors / J.L. Boulay, J.J. O'Shea, W.E. Paul // *Immunity.* – 2003. – Vol. 19.–pp. 159–163.
118. Bragdon J.H. Method for extraction of serum lipids / J.H. Bragdon, P.W. Sunderman // *Lipids and the steroid hormones in clinical medicine.* – Philadelphia; Monreal, 1960. – pp. 278.

119. Bruckert E. Meta-analysis of the effect of nicotinic acid alone or in combination on cardiovascular events and atherosclerosis / E. Bruckert, J. Labreuche, P. Amarenco // *Atherosclerosis*. – 2010. – 210. – pp. 353–361.
120. Burstein M. Dosage des B-lipoproteines seriques apripreparations selective per l'heparine / M. Burstein, J. Samaille // *Press. Med.* – 1958. – № 66. – pp. 974.
121. Byrne G.I. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: links to the disease process / G.I. Byrne, M.V. Kalayoglu // *American Heart Journal*. – 1999. – Vol. 138, № 5, supplement 1. – pp. 488–490.
122. Cells deficient in DNA polymerase beta are hypersensitive to alkylating agent-induced apoptosis and chromosomal breakage / K. Ochs, R.W. Sobol, S.H. Wilson, B. Kaina // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59(7). – pp. 1544–1551.
123. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL 60 leukemic cells. / A. Najid, A. Simon, J. Cook et al. // *Federation of European Biochemical Societies Letters*. – 1992. – Vol. 299.Issue 3 – pp. 213–217.[doi:10.1016/0014-5793\(92\)80117-Y](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80117-Y)
124. Chin J. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins / J. Chin, S. Azhar, B. Hoffman // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol.89. – pp. 10–18.
125. Chlamydia pneumoniae and symptomatic carotid atherosclerotic plaque: a prospective study / R.J. Gagliardi, D.R. Silveira, R.A. Caffaro et al. // *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. – 2007. – Vol. 65, № 2. – pp. 385–389.
126. Ciervo A. Transcription, expression, localization and immunoreactivity of Chlamydophila pneumoniae Phospholipase D protein / A. Ciervo, F. Mancini, A. Cassone // *Microbial Pathogenesis*. – 2007. – Vol. 43, № 2-3. – pp. 96–105.
127. Coccheri, S. CAPRIE Investigators Distribution of symptomatic atherothrombosis and influence of atherosclerotic disease burden on risk of secondary ischaemic events: results from CAPRIE / S. Coccheri // *Eur Heart J*. – 1998. – Vol. 19. – P. 1268.

128. Cranberries (*Oxycoccus quadripetalus*) inhibit lipid metabolism and modulate leptin and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipocytes / K. Kowalska, A. Olejnik, J. Rychlik, W. Grajek // Food Chemistry. – 2015. – Vol. 185. – pp. 383–388.
129. Crossreactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens: possible pathogenic link between *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis / F. Franceschi, A.R. Sepulveda, A. Gasbarrini et al. // Circulation. – 2002. – Vol. 106, № 4. – pp. 430–434.
130. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells / A. Kol, A. H. Lichtman, R. W. Finberg, et al. // Journal of Immunology. – 2000. – Vol. 164, № 1. – pp. 13–17.
131. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells / E.P. Amento, N. Ehsani, H. Palmer, P. Libby // Arteriosclerosis and Thrombosis. – 1991. – Vol. 11, № 5. – pp. 1223–1230.
132. Dai Y. Anti-inflammatory effect of oleanohc acid / Y. Dai, B.Q. Hang, L.W. Tan // Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology. – 1989. – Vol. 3. – pp. 96–99.
133. de Lemos J.A. Early intensive vs a delayed conservative simvastatin strategy in patients with acute coronary syndromes: phase Z of the A to Z trial / J.A. de Lemos, M.A. Blazing, S.D. Wiviott // JAMA. 2004. – Vol 292, № 11 – pp. 1307–1316.
134. Deng J.Z. DNA polymerase beta inhibitors from *Baeckea gunniana* / J.Z. Deng, S.R. Starck, S.M. Hecht // J. Nat. Prod. – 1999. – Vol. 62(12). – pp. 1624–1626.
135. Deng J.Z. Pentacyclic triterpenoids from *Freziera* genus / J.Z. Deng, S.R. Starck, S.M. Hecht // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1998. – Vol. 20(8). – pp. 2829–2832.

136. Deng J.Z. Pentacyclic triterpenoids from *Freziera* sp. that inhibit DNA polymerase beta /J.Z. Deng, Starck S.R., Hecht S.M. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2000. –Vol. 8(1). – pp. 247–250.
137. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens / K. Nakano, H. Inaba, R. Nomura et al.// *Journal of Clinical Microbiology.* – 2006. – Vol. 44, № 9. – pp. 3313–3317.
138. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts / A.I. Ibrahima, M.T. Obeida, M.J. Joumaa et al. // *Journal of Clinical Virology.* –2005. –Vol. 32, Iss. 1. – pp. 29–32.
139. Detection of nanobacteria-like particles in human atherosclerotic plaques / L.G. Pusk'as, L. Tiszlavicz, Zs. R'azga et al. // *Acta Biologica Hungarica.* – 2005. – Vol. 56, № 3-4.– pp. 233–245.
140. Dhamija H.K. Herbs: Now in arena of hyperlipidaemia / H.K. Dhamija A.S. Chauhan // *Der Pharmacia Sinica.* – 2011. –Vol. 2(3). –pp. 51–59.
141. Du Rose J.B. Infection of vascular endothelial cells with human cytomegalovirus under fluid shear stress reveals preferential entry and spread of virus in flow conditions simulating atheroprone regions of the artery / J.B. Du Rose, J. Li, S. Chien, D.H. Spector // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 24. – pp. 13745–13755.doi: 10.1128/JVI.02244-12. Epub 2012 Oct 10.
142. Effect of chronic treatment with bark of *Terminalia arjuna*: a study on the isolated ischemic-reperfused rat heart / K. Gauthamna, M. Maulik, R. Kumari et al. // *J. Ethnopharmacol.*–2001. – Vol. 75. –pp. 197–201.
143. Effect of different cranberry extracts and juices during cranberry juice processing on the antiproliferative activity against two colon cancer cell lines / K. Dang Vu,H. Carlettini, J. Bouvet, M. Lacroix // *Food Chemistry.* – 2012. – Vol. 132, Issue 2. – pp. 959–967.
144. Effect of fresh *Triticum aestivum* grass juice on lipid profile of normal rats / S. Kothari, A.K. Jain, S.C. Mehta, S.D. Tonpay // *Indian J Pharmacol.*– 2008. – Vol. 40(5). –pp. 235–236.

145. Effect of oleanolic acid on serum glyceride cholesterol and lipo-proteins in normal and experimental hyperlipidemia rats / J. Liu, X.F. Chen, L. Xia et al. // Chinese Pharmacological Bulletin. –1987. – Vol.4. – pp. 14–15.
146. Effect of statin versus fibrate on postprandial endothelial dysfunction: role of remnant-like particles / H.W. Wilms, M.B. Twickler, J.D. Banga et al // Cardiovasc. Res. – 2001. – Vol. 50, № 3. – pp. 577–582.
147. Effect of statins on skeletal muscle function / B.A. Parker, J.A. Capizzi, A.S. Grimaldi et al. // Circulation – 2013. – Vol. 127(1). –pp. 96–103.
148. Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neuronally acting irritants and other agents / A.-I. Huguet, M. del C. Recio, S. Manes et al. // Eur. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 410. – pp. 69–81. doi:10.1016/S0014-2999(00)00860-8
149. Effects of high-dose modified-release nicotinic acid on atherosclerosis and vascular function: a randomized, placebo-controlled, magnetic resonance imaging study / J.M. Lee, M.D. Robson, L.M. Yu et al. // J Am Coll Cardiol. – 2009. –Vol. 54. – pp. 1787–1794.
150. Effects of ursolic acid on oncogene expression detected by in situ hybridization in mice / T.H. Rhew, S.M. Park, K.Y. Park et al. // Chemical Abstracts. – 1993. – Vol.119. –pp. 1517–1541.
151. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170000 participants in 26 randomised trials / C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson et al. // Lancet. – 2010. – Vol. 376. – pp. 1670–1681. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61350-5
152. Efficacy and safety profile of cranberry in infants and children with recurrent urinary tract infection / V. Fernández-Puentes, J. Uberos, R. Rodríguez-Belmonte et al. // Anales de Pediatría (English Edition). –2015. – Vol. 82, Issue 6. –pp. 397–403.
153. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease / S. Fichtlscherer, G. Rosenberger, D.H. Walter et al. // Circulation – 2000. –Vol. 102. – pp. 1000–1006.

154. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis / M. Mayr, B. Metzler, S. Kiechl et al. // *Circulation*. – 1999. – Vol. 99, № 12. – pp. 1560–1566.
155. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics–2012 Update: A Report From the American Heart Association / V.L. Roger, A.S. Go, D.M. Lloyd-Jones et al. // *Circulation*. – 2012. – Vol. 125. – pp. 188–197. doi: 10.1161/CIR.0b013e3182456d46
156. Gan K.H. Studies on the constituents of Fonnosan gentianaceous plants. XI. Constituents of *Gentiana flavo-maculata* and *Tripterospennum taiwanense* and the antihepatotoxic activity of ursolic acid derivatives / K.H. Gan, C.N. Lin // *Chinese Pharmaceutical Journal*. –1988. – Vol.40. –pp.77–84.
157. Garai S. Triterpenoid Saponins / S. Garai // *Nat Prod Chem Res*. –2014. – Vol. 2, Iss. 6. – pp. 148–161. doi:10.4172/2329-6836.1000148
158. George J. The involvement of β 2-glycoprotein I (β 2-GPI) in human and murine atherosclerosis / J. George, Y. Shoenfeld, D. Harats // *Journal of Autoimmunity*. – 1999. – Vol. 13, № 1. – pp. 57–60.
159. Ghasi S. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats./ S. Ghasi, E. Nwobodo, J.O. Ofili // *J. Ethnopharmacol*. – 2000. – Vol. 69(1). –pp. 21–25.
160. Gopiesh-Khanna V. Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata* / V. Gopiesh-Khanna, K. Kannabiran // *World J Microb Biot*. –2008. – Vol. 24(11). –pp. 2737–2740.
161. Gresham G.A. Atherosclerosis: its causes and potential reversibility / G.A. Gresham // *Triangle*. – 1976. – Vol. 15, № 2. – P. 39–41.
162. Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. / M. Tendera, V. Aboyans, M.-L. Bartelink et al. // *European Heart Journal*. – 2011. – № 32. – pp. 2851–2906 doi:10.1093/eurheartj/ehr211

163. Hao Z. Hypoglycemic effect of oleanolic acid. / Z.Hao, B. Hang, Y. Wang // *Zhouguo Yaoke Daxue Xuebao.*—1989.—Vol.22.—pp. 210–212.
164. Health benefits of sea buckthorn for the prevention of cardiovascular diseases / Yan-Jun Xu, Meera Kaur, Reshvinder S. Dhillon, Paramjit S. Tappia // *Journal of Functional Foods.* – 2011. – Vol. 3, Issue 1. –pp. 2–12.
165. Hepatoprotection of oleanolic acid is related to its inhibition on mitochondrial permeability / X.H. Tang, J. Cao, F. Fang et al. // *Am J. Chin. Med.* – 2005. – Vol. 33(4). – pp. 627–637.
166. Hepatoprotection of Oleanolic Acid is Related to Its Inhibition on Mitochondrial Permeability Transition / Xin-Hui Tang, Jing Gao, Feng Fang et al. // *Am. J. Chin. Med.* –2005. – Vol. 33, № 04. –pp. 627-637.
167. Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from *Eucalyptus* hybrid / B. Shukla, S. Viser, G.K. Patnaik et al. // *Phytotherapy Research.* – 1992. – Vol. 6. –pp. 74–19.
168. Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa* L. leaves and its two triterpenoids. *J. Pharm.* / J. Gao, X. Tang, H. Dou et al. // *Pharmacol.* – 2004. – Vol. 56(11). – pp. 1449–1455.
169. Hepatoprotective effects of 18beta-glycyrrhetic acid on carbon tetrachloride-induced liver injury: inhibition of cytochrome P450 2E1 expression / H.G. Jeong, H.J. You, S.J. Park et al. // *Pharmacol. Res.* – 2002. – Vol. 46(3). – pp. 221–227.
170. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack / P. Amarenco, J. Bogousslavsky, A. Callahan et al. // *N Engl J Med.* – 2006. – Vol. 355, № 6. –pp. 549–559.
171. Higher incidence of persistent chronic infection of *Chlamydia pneumoniae* among coronary artery disease patients in India is a cause of concern BMC / H.C. Jha, H. Vardhan, R. Gupta et al. // *Infectious Diseases.* – 2007. – Vol. 7, article 48.— pp. 1–8.
172. Hippisley-Cox J. Unintended effects of statins in men and women in England and Wales: population-based cohort study using the QResearch database. / J.

- Hippisley-Cox, C. Coupland // *BMJ*. – 2010. – Vol. 340. – pp. 2197. doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.c2197>
173. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of ethanolic extract of *Salvadora oleoides* in normal and alloxan-induced diabetic rats / J.P. Yadav, S. Saini, A.N. Kalia, A.S. Dangi // *Indian J Pharmacol*. – 2008. – Vol. 40(1). – pp. 23–27.
 174. Hypolipidemic activity of Piper betel in high fat diet induced hyperlipidemic rat / T. Thirunavukkarasu, T. Narayanaswamy, D. Ernest et al. // *Journal of Acute Disease*. – 2014. – Vol. 3, Issue 2. – pp. 131–135.
 175. Hypolipidemic and anti-atherogenic effect of aqueous extract leaves of *Ficus glumosa* (Moraceae) in rats / F. Ntchapda, A. Djedouboum, E. Talla et al. // *Experimental Gerontology*. – 2015. – Vol. 62. – pp. 53–62.
 176. Hypolipidemic and antihyperlipidemic effects from an aqueous extract of *Pachyptera hymenaea* (DC.) leaves in rats / P.R. Verma, S.A. Deshpande, Y.N. Kamtham, L.B. Vaidya // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 132, Issue 3. – pp. 1251–1257.
 177. Hypolipidemic, antioxidant and anti-atherosclerogenic effects of aqueous extract of *Zanthoxylum heitzii* stem bark in diet-induced hypercholesterolemic rats / F. Ntchapda, K. Maguirgue, H. Adjia et al. // *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. – 2015. – Vol. 8, Issue 5. – pp. 359–365.
 178. Immunological responses to oxidized LDL / S. Hörkkö, C.J. Binder, P.X. Shaw et al. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2000. – Vol. 28, № 12. – pp. 1771–1779.
 179. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) / M.F. Moradali, H. Mostafavi, S. Ghods, G.A. Hedjaroude // *Int. Immunopharmacol*. – 2007. – Vol. 7(6). – pp. 701–724.
 180. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species / L.C. Chiang, L.T. Ng, W. Chiang et al. // *Planta Med*. – 2003. – Vol. 69(7). – pp. 600–604.
 181. In vitro anti-HIV activity of cells. / F. Mengoni, M. Lichtner, L. Battinelli et al. // *J. Plant Med*. – 2002. – Vol. 68. – pp. 111–114p.

182. In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells / F. Mengoni, M. Lichtner, L. Battinelli et al. // J. Plant Med. – 2002. – Vol. 68. –pp.111–114.
183. In vitro anti-inflammatory of iridoids and triterpenoid compound isolated from *Phillyrea latifolia* I / A.M. Diaz, M.J. Abad, L. Fernandez et al. // Biol. Pharm.Bull. – 2000 –Vol. 23, №11. –pp. 1307–1313.
184. In vitro inhibitory effects of DNA topoisomerase II by fernane-type triterpenoids isolated from a *Euphorbia* genus / S. Wada, R. Tanaka, A. Ida, S. Matsunaga // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1998. – Vol. 20(8). – pp. 2829–2832.
185. Influence of flavonoids isolated from *Satureja hortensis* L. on hypercholesterolemic rabbits / D. Mchedlishvili, Z. Kuchukashvili, T. Tabatadze, G. Davitaia// Indian J Pharmacol. – 2005. – Vol. 37(4). – pp. 259–260.
186. Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves / Liu Song , Li Dong , Huang Bo et al. // Journal of Ethnopharmacology. – 2013. – Vol. 149, Issue 1. – pp. 263–269.
187. Inhibition of serine proteases by antiinflammatory triterpenoids / A. Rajic, G. Kweiflo-Okai, T. Macrides et al. // Planta Med. – 2000. – Vol. 66. –pp. 206–210.
188. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents camosol and ursolic acid / M.T. Huang, C-T. Ho, Z.Y. Wang et al. // Cancer Research. – 1994. – Vol.54. – pp. 701–708.
189. Interactions of oral pathogens with Toll-like receptors: Possible role in atherosclerosis / G. Hajishengallis, A. Sharma, M.W. Russell, R.J. Genco // Annals of Periodontology. – 2002. – Vol. 7, № 1. – pp. 72–78.
190. Investigation on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas* / M.C.Recio, R.M. Giner, S. Manez et al. // Planta Med. – 1995. – Vol. 61. –pp. 9–12.

191. Iousufzai S.Y.K. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaric acid and experimental atherosclerosis in rats / S.Y.K. Iousufzai, M. Siddigi // *Experientia*. – 1976. – № 32. – pp. 1033–1036.
192. Isolation of substances from glossy privet (*Ligustrum lucidum* Ait) inhibiting the mutagenicity of benzo[a]pyrene in bacteria / M. Niikawa, H. Hayashi, T. Sato et al. // *Mutation Research*. –1993. –Vol.319. – pp.1–9.
193. Isolation, preliminary structural characterization and hypolipidemic effect of polysaccharide fractions from *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle / Hongliang Zeng, Song Miao, Yi Zhang et al. // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – Vol. 52. –pp. 126–136.
194. Jara L.J. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases / L. J. Jara, G. Medina, O. Vera-Lastra, M.-C. Amigo // *Autoimmunity Reviews*. – 2006. – Vol. 5, № 3. – pp. 195–201.
195. Kamanna V.S. Mechanism of action of niacin /V.S. Kamanna, M.L. Kashyap// *Am J Cardiol*. – 2008. –Vol. 101. – pp. 20–26.
196. Kaski J.C. Inflammation, infection and acute coronary plaque events / J.C. Kaski, E.G. Zouridakis // *Eur. Heart J*. – 2001. – Vol. 3 (Suppl. I). –pp. 10–15.
197. Khanna A.K. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats/ A.K. Khanna, F. Rizvi , R. Chander // *J Ethnopharmacol*. – 2002. – Vol. 82. – pp.19–22.
198. Koenig W. Atherosclerosis involves more than just lipids: focus on inflammation / W. Koenig. // *Eur. Heart J*. –1999. – Vol. 1 (Suppl. T). –pp. 19–26.
199. Kok F.J Atherosclerosis—epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet / F.J Kok, D. Kromhout // *Eur J Nutr*. – 2004. – Vol. 43, № 3. – pp. 2–5. PubMed PMTD: 15052492.
200. Kumari K. Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* / K.Kumari, B. C. Mathew, K. T.Augusti, // *Linn. Indian J. Biochem. Biophys*. – 1995.–Vol. 32. – pp. 49–54.

201. Lamb D.J. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunization / D.J. Lamb, W. El-Sankary, G.A.A. Ferns // *Atherosclerosis*. – 2003. – Vol. 167, № 2. – pp. 177–185.
202. LaRosa J.C. Safety and effect of very low levels of low-density lipoprotein cholesterol on cardiovascular events / J.C. LaRosa, T.R. Pedersen, R. Somaratne, S.M. Wasserman // *Am J. Cardiol.* – 2013. – Vol. 111(8). –pp. 1221–1229. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.12.052.
203. Law M.R. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? / M.R. Law N.J. Wald, S.G.Thompson // *BMJ*. – 1994. – Vol. 308. pp. 367–372.
204. Leitinger N. Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis / N. Leitinger // *Molecular Nutrition and Food Research*. –2005. – Vol. 49, № 11. – pp. 1063–1071.
205. Leukocyte count and fibrinogen are associated with carotid and femoral intima-media thickness in a risk population for diabetes / T. Temelkova-Kurktschiev, C. Koehler, E. Henkel, M. Hanefeld // *Cardiovascular Research*. – 2002. – Vol. 56, № 2. – pp. 277–283.
206. Leung, A.Y. *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics* / A.Y. Leung, S. Foster // NY: John Wiley & Sons, Inc. 1996. – 290 p.
207. Libby P. Inflammation in atherosclerosis / P. Libby // *Nature*. – 2002. – Vol. 420.–pp.868–874.
208. *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination* / Edited by Angel Catala – Publisher: InTech, 2012 – 546 p. DOI: 10.5772/2929
209. Liu J. Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives / J. Liu // *J Ethnopharmacol.* – 2005. – Vol. 100. – pp. 92–94.
210. Liu J. The effect of oleanolic acid on chemical-induced liver injury in mice / J. Liu., Y.P. Liu, C.D. Klaassen // *Acta Pharmacologica Sinica*. –1995. – Vol. 15. –pp. 16–23.

211. Liu Y.P. The protection of oleanohc acid on o-galactosamine/endotoxin-induced hepatotoxicity / Y.P. Liu, J. Liu, C.D. Klaassen // *Toxicologist*. – 1993. –Vol. 13. – P. 720.
212. Ludewig B. Immunopathogenesis of atherosclerosis / B. Ludewig, P. Krebs, E. Scandella // *Journal of Leukocyte Biology*. –2004. – Vol. 76, № 2. – pp. 300–306.
213. Ma B.L. Hypolipidemic effects of oleanolic acid /B.L. Ma // *Traditional Medicine and Pharmacology*.– 1986.– Vol. 2. – pp. 28–29.
214. Ma Z.Z. Three new triterpenoids from *Peganum nigellastrum* / Z.Z.Ma, Y.Hano, T.Nomura, Y.J. Chen // *J. Nat. Prod.* – 2000. – Vol. 63. –pp. 390–392.
215. Maccaglia A. Differential effects of quercetin and resveratrol on Band 3 tyrosine phosphorylation signalling of red blood cells / A. Maccaglia, C. Mallozzi, M. Minetti // *Biochem. Biophys.Res.Commun.* –2003. –Vol. 305, № 3. –pp. 541–547.
216. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans / M.E. Rosenfeld, S. Yla-Herttuala, B.A. Lipton et al. // *Amer. J. Pathology*. –1992. –Vol. 140. –pp. 291–300.
217. Maruthappan V. Effects of *Phyllanthus reticulatus* on lipid profile and oxidative stress in hypercholesterolemic albino rats / V. Maruthappan, K.S. Shree // *Indian J Pharmacol.* – 2000.–Vol. 42(6). –pp. 388–391.
218. Maseri A. Inflammation in acute coronary syndromes / A. Maseri, D. Cianflone // *Eur. Heart J.* – 2002. – Vol. 4 (Suppl. B). – pp. 8–13.
219. Mazumder P.M. Effect of an isolated active compound (Cg-1) of *Cassia glauca* leaf on blood glucose, lipid profile, and atherogenic index in diabetic rats / P.M. Mazumder // *Indian J Pharmacol.*– 2009. – Vol. 41(4). –pp. 182–186.
220. Mechanism underlying mitochondrial protection of asiatic acid against hepatotoxicity in mice. /J. Gao, J. Chen, X. Tang et al. // *J. Pharm.* – 2006. – Vol. 58(2). – pp. 227–33.
221. Medicinal foodstuff. III. Sugar beet. (1): Hypoglycemic oleanolic acid oligoglycosides, betavulgarosides I, II, III, and IV, from the root of *Beta*

- vulgaris L. (Chenopodiaceae) / M. Yoshikawa, T. Murakami, M. Kadoya et al. // Chem. Pharm. Bull. – 1996. – Vol. 44, Iss. 6. – pp. 1212–1217.
222. Miller G.L. Protein determination for barge numbers of samples / G.L. Miller // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 35, № 5. –pp. 964–966.
223. Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethaneinduced intestinal carcinogenesis in rats / N. Yoshimi, A. Wang, Y. Morishita et al. // Japanese Journal of Cancer Research. –1992. – Vol.83. – pp. 1273–1278.
224. Mueller M.R. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty / M.R. Mueller // Thromb Haemost –1997. –Vol. 78, № 7. – pp. 1003.
225. Mujoo K. Triterpenoid saponins from acacia victoriae (Bentham) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. / K. Mujoo, V. Haridas, J.J. Hoffmann // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – pp. 5486–5490.
226. Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial / G.G. Schwartz, A.G. Olsson, M.D. Ezekowitz et al. // JAMA. – 2001. – Vol.285.–pp. 1711–1718.
227. Naito C. Lipid peroxides as the initiating factors of atherosclerosis / C. Naito, H. Kawamura, G. Yamamoto // Ann NY Acad Sci. – 1993. – Vol. 676. – pp. 27–45.
228. National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force / J.M. McKenney, M.H. Davidson, T.A. Jacobson, J.R. Guyton // Am J Cardiol. – 1997. –Vol. 8A. –pp. 89–94.
229. New triterpenoid saponins from Ilex cornuta and their protective effects against H₂O₂-induced myocardial cell injury / S. Li, J. Zhao, Y. Liu et al. // J. Agric. Food Chem. – 2014. – Vol. 62. – pp. 488–496.
230. Nishimura K. Triterpenoid saponins from Ilex kudincha / K. Nishimura, T.Miyase, H. Noguchi // J. Nat. Prod. 1999. – Vol. 62. – pp. 1128–1133.

231. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis / D.S. Celermajer, K.E. Sorensen, V.M. Gooch, et al. // *Lancet* – 1992. – Vol. 340. – pp. 1111–1115.
232. Novel cytokine release inhibitors. PartI: Triterpens / Huang F.C., Chan W.K., Moriarty K.J. et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1998. – Vol. 8, Issue 14. – pp. 1883–1886.
233. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages / N. Suh, T. Honda, H.J. Finlay et al. // *Cancer Res.* – 1998 – Vol. 58. – pp. 717–723.
234. Oh S.R. Effects of triterpenoids from *Pueraria lobata* on immunohemolysis: B-D-glucoromic acid plays an active role in anticomplementary acting in vitro / S.R. Oh, Kinjo J., Ikeda T. // *Planta Med.* – 2000. – Vol. 66. – pp. 506–510.
235. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thyobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ochihi, K. Vagi // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, № 2. – pp. 351–358.
236. Oleanolic acid in decreasing hyperglycemia / Z. Liu, D. Wang, S. Wang et al. // *Chinese Pharmaceutical Journal.* – 1994. – Vol. 29. – pp. 125–126.
237. Oleanolic acid protects against cadmium-induced liver injury in mice / Y.P. Liu, H. Kreppel, J. Liu et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 1993. – Vol. 266. – pp 400–406.
238. Pawar R.S. Effect of oleanane triterpenoids from *Terminalia arjuna* – a cardioprotective drug on the process of respiratory oxyburst / R.S. Pawar, K.K. Bhutani // *Phytomedicine.* – 2005. – Vol. 12. – pp. 391–393.
239. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts / S. Jager, H. Trojan, T. Kopp et al. // *Molecules.* – 2009. – Vol. 14. – pp. 2016–2031.
240. Pharmacological modification of endogenous antioxidant enzymes by ursolic un tetrachloride-induced liver damage in rats and primary cultures of rat hepatocytes / S. Martin-Aragon, B. De las Heras, M.I. Sanchez-Reus, J. Benedi // *Exp. Toxicol. Pathol.* – 2001. – Vol. 53(2–3). – pp. 199–206.

241. Phenolic acid content and antiadherence activity in the urine of patients treated with cranberry syrup (*Vaccinium macrocarpon*) vs. trimethoprim for recurrent urinary tract infection / J. Uberos, R. Rodríguez-Belmonte, C. Rodríguez-Pérez et al. // *Journal of Functional Foods*. – 2015. – Vol. 18, Part A. – pp 608–616.
242. Plotnick G.D. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium dependent brachial artery vasoactivity following a single high fat meal / G.D. Plotnick, M.C. Correti, R.A. Vogel // *JAMA*. – 1997. – Vol. 278. – pp. 1682–1686.
243. Predisposition to atherosclerosis by infections: role of endothelial dysfunction / A. Prasad, J. Zhu, J.P. Halcox et al. // *Circulation* – 2002. – Vol. 106. – pp. 184–190.
244. Prevention of Asymptomatic Bacteriuria with Cranberries and Roselle Juice in Home-care Patients with Long-term Urinary Catheterization / Shu-Chuan Lin, Chao-Chi Wang, Shou-Chuan Shih et al. // *International Journal of Gerontology*. – 2014. – Vol. 8, Issue 3. – pp. 152–156.
245. Protective effects of oleanolic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice / J. Liu, Y.P. Liu, C. Madhu, C.D. Klaassen // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1993. – Vol. 266. – pp. 1607–1613.
246. Rajani G.P. In vitro antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. / G.P. Rajani, P. Ashok // *Indian J Pharmacol.* – 2009. – Vol. 41(5). – pp. 227–232.
247. Rajasekaran S. Antihyperlipidemic activity of *Acalypha indica* Linn. on atherogenic diet induced hyperlipidemia / S. Rajasekaran, R. Anandan, K.M. Nishad // *Int J Pharm Pharm Sci* – 2013 – Vol 5, Suppl 4. – pp. 699–701.
248. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis / B.S. Oemar, M.R. Tschudi, N. Godoy et al // *Circ.* – 1998. – Vol. 97. – pp. 2494–2498.
249. Regnstrom J. Lipid oxidation and inflammation-induced intimal fibrosis / J. Regnstrom, J. Nilsson // *J. Lab. Clin. Med.* – 1994. – Vol. 116. – pp. 162–168.

250. Reversal of daunomycin and vinblastine resistance in multidrug-resistant P388 leukemia in vitro through enhanced cytotoxicity by triterpenoids / H. Hasegawa, J.H. Sung, S. Matsumiya et al. // *Planta Med.* –1995. – Vol. 61(5). – pp. 409–413p.
251. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis / D. Preiss, S.R. Seshasai, P. Welsh et al. // *JAMA.* – 2011. –Vol. 305 (24). – pp. 255 –264.
252. Rohilla A. Far and Wide Pleiotropic Effects of Statins / A. Rohilla, M.U. Khan // *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* – 2011. – Vol. 2(3). – pp. 947–953.
253. Rojas-Fernandez C.H. Is statin-associated cognitive impairment clinically relevant? / C.H. Rojas-Fernandez, J.C. Cameron // *A narrative review and clinical recommendations. Ann Pharmacother.* – 2012. –Vol. 46(4). – pp.549 – 557.
254. Sander G.E. Cardiovascular complications of collagen vascular disease / G.E. Sander, T.D. Giles // *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine.* – 2002. – Vol. 4, № 2. – pp. 151–159.
255. Saturated fat, vitamin C and smoking predict long-term population all-cause mortality rates in the Seven Countries Study / D Kromhout, B Bloemberg, E Feskens et al.// *Int J Epidemiol.* – 2000. – Vol.29. – pp. 260–265.
256. Schmitz G. High-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and membrane protection / G. Schmitz, E. Willamson // *Curr. Opin. Lipidol.* – 1991. – Vol. 2. – pp. 177–189.
257. SEAS Investigators. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis / A.B. Rossebo, T.R. Pedersen, K. Boman et al. // *N Engl J Med.* – 2008. –Vol. 359. – pp. 1343–1356.
258. Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Tolllike receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion / H. Yumoto, H.-H. Chou, Y. Takahashi et al. // *Infection and Immunity.* – 2005.– Vol. 73, № 12.– pp. 8050–8059.

259. Shepherd J. The fibrates in clinical practice: focus on micronised fenofibrate / J. Shepherd // *Atherosclerosis*. – 1994. – Vol. 110. – pp. 55–63.
260. Sies H. Oxidative Stress. From Basic Research to Clinical Application / E. Sies // *Am J. Med.* – 1991. – Vol. 91, №3. – pp. 31–37.
261. Sikarwar M.S. Antihyperlipidemic Activity of Pongamia pinnata Leaf Extracts / M.S. Sikarwar, M.B. Patil // *Turk J Pharm Sci.* – 2014. – Vol. 11(3). – pp. 329–338,
262. Snyckers F.O. Ulcer prevention and treatment with oleanolic acid / F.O. Snyckers, T.G. Fourie // *Chemical Abstracts*. –1984.–Vol.100. –pp.396 413.
263. Sporn M.B. Chemoprevention of cancer / M.B. Sporn, N. Suh // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21. – pp. 525–30.
264. Stark A. The effect of an ethanol extract derived from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) on bile acid absorption and cholesterol levels in rats /A. Stark , Z. Madar // *Br. J. Nutr.* – 1993. – Vol. 69. –pp. 277–287.
265. Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in traditional Chinese medicine. III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. / T. Kosuge, M. Yokota, K. Sugiyama et al. // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. –1985. – Vol. 33. –pp. 5355-5351.
266. Studies on the effect of oleanolic acid on experimental liver injury / X.H. Ma, Y.C. Zhao, L. Yin et al. // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 1981. – Vol. 17. – pp. 93 – 97.
267. Sun J. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) oligosaccharides decrease biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* / J. Sun, J.P.J. Marais, C.Khoo et al. // *Journal of Functional Foods*. – 2015. – Vol. 17, pp. 235–242.
268. Sun J. Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells / J. Sun, R.H. Liu // *Cancer Letters*. – 2006. – Vol. 241, Issue 1. – pp. 124–134.

269. Suryakumar G. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) / G. Suryakumar, G. Asheesh // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2011. – Vol. 138, Issue 2. – pp. 268–278.
270. Tedgui A. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways / A. Tedgui, Z. Mallat // *Physiol Rev.* – 2006. – Vol. 86. – pp. 515–581, doi:10.1152/physrev.00024.2005.
271. The safety of rosuvastatin in comparison with other statins in over 100,000 statin users in UK primary care / L.A. Garcia-Rodriguez, E.L. Masso-Gonzalez, Wallander M.A., Johansson S. // *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* – 2008. – Vol. 17 (10). – pp. 943–952. doi: 10.1002/pds.1603
272. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention / V. Fuster, J.T. Fallon, J.J. Badimon et al. // *Thrombosis and Hemostasis* – 1997. – Vol. 78, № 1. – pp. 247–255.
273. The protective effects of oleanolic acid on experimental cirrhosis. / D.W. Han, X.H. Ma, Y.C. Zhao, L. Yin // *Journal of Traditional Chinese Medicine*. – 1981. – Vol. 3. – pp. 217–223.
274. Thomas A.H. Collagen fragments modulate innate immunity / A.H. Thomas, E.R. Edelman, C.M. Stultz // *Experimental Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 232, № 3. – pp. 406–411.
275. Three new triterpenoids from *Peganum nigellastrum* / Z.Z. Ma, Y. Hano, T. Nomura, Y.J. Chen // *J. Nat. Prod.* – 2000. – Vol. 63. – pp. 390–392.
276. Trinder P. Antioxidant activity flavonoids / P. Trinder // *Ann. Clin. Biochem.* – 1969. – Vol. 6, № 2. – pp. 24.
277. Tu J. Immunomodulatory and antitumor activity of triterpenoid fractions from the rhizomes of *Astilbe chinensis*. / J. Tu, H.X. Sun, Y.P. Ye // *Ethnopharmacol.* – 2008. – Vol. 119(2). – pp. 266–271.
278. Uchiyama M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test / M. Uchiyama, M. Mihara // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol. 94, № 86. – pp. 271–278.

279. Ursolic acid attenuates oxidative stress-mediated hepatocellular carcinoma induction by diethylnitrosamine in male Wistar rats / K. Gayathri, D.K. Priya, G.K. Gunassekaran, D. Sakthisekaran // *Asian Pacif. J. Cancer Prev.* – 2009. – Vol. 10(5). – pp. 933–938.
280. Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease / S.D. Kunkel, C.J. Elmore, K.S. Bongers et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol.7 (6): e39332. doi: 10.1371/journal.pone.0039332.
281. Ursolic acid protects diabetic mice against monocyte dysfunction and accelerated atherosclerosis. / S.L. Ullevig, Q. Zhao, D. Zamora et al. // *Atherosclerosis.* – 2011 – Vol.219, Iss. 2 – pp. 409–416.
282. Ursolic acid inhibits aflatoxin B₁-induced mutagenicity in a Salmonella assay system / H.S. Young, H.Y. Chung, C.K. Lee et al. // *Biological Pharmacology Bulletin.* – 1994. – Vol.17. – pp. 990–992.
283. Ursolic acid, a pentacyclic triterpene from *Sambucus australis*, prevents abdominal adiposity in mice fed a high-fat diet / V.S. Rao, C.L. Melo, M.G. Queiroz et al. // *Journal of medicinal food.* – 2011. – Vol. 14 (11). – pp. 1375–1382.
284. Ursolic acid promotes cancer cell death by inducing Atg5-dependent autophagy / Sh. Leng, Y. Hao, D. Duet al. // *International Journal of Cancer* – 2013. – Vol. 133, Iss. 12. – pp.2781–2790.
285. Visavadiya N.P. Hypolipidemic and antioxidant activities of *Asparagus racemosus* in hypercholesteremic rats / N.P. Visavadiya, R.L. Narasimhacharya // *Indian Journal of Pharmacology.* – 2005. – Vol. 37, № 6. – pp. 376 –380.
286. Wang B. Studies on oleanolic acid. / B.Wang, Z.H. Jiang // *Chinese Pharmaceutical Journal.* – 1992. – Vol. 27. – pp. 393–397.
287. Xu Q. Infections, heat shock proteins, and atherosclerosis / Q. Xu // *Current Opinion in Cardiology.* – 2003. – Vol. 18, № 4. – pp. 245–252.

288. Zhong Chao Yao Effects of oleanolic acid on experimental liver injury and therapeutic value in human hepatitis / Zhong Chao Yao // Traditional Medicine. –1977. – Vol.8. – pp. 32–37.
289. Zhong Chao Yao Pharmacological studied of hepatoprotective compounds from Swertia mileensis / Zhong Chao Yao // Traditional Medicine. – 1975.– Vol. 6.– pp. 47–62.