

*На правах рукописи*

**Горбатюк Наталья Олеговна**

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

**ВОЛГОГРАД – 2016**

Диссертационная работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

**Черников Максим Валентинович**, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии и физиологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

**Официальные оппоненты:**

**Покровский Михаил Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет».

**Чучалин Владимир Сергеевич**, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте [www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru).

Автореферат разослан «\_\_» «\_\_\_\_\_» 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Бугаева Любовь Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

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 (Шальнова С.А. и др., 2012). 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 (Демографический ежегодник России. М., 2015). Одной из основных причин возникновения болезней системы кровообращения является атеросклеротическая модификация стенок кровеносных сосудов, которая к моменту проявления клинической симптоматики заболевания уже значительно выражена (Гаврилова Н.Е. и др., 2013; Tendera M. et al., 2011).

Многочисленные экспериментальные, клинические и эпидемиологические исследования свидетельствуют, что одним из главных факторов риска развития атеросклероза являются нарушения обмена липидов. 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 (Бокерия Л. А. и др., 2010; Кухарчук В.В. и др., 2012; Reiner Z. et al., 2012).

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 (Там же; Нагорнев В.А. и др. 1989; Рыженков В.Е. и др., 2005; Roger V.L., 2012; Yan-Jun Xu et al., 2011). В настоящее время

гиполипидемическая лекарственная терапия признаётся главным способом сдерживания развития атеросклероза и его осложнений. В настоящее время для коррекции дислипидемий в основном используются синтетические лекарственные средства – статины, фибраты, секвестранты желчных кислот, ингибиторы всасывания холестерина, никотиновая кислота (Кухарчук В.В. и др., 2012; Tendera M. et al., 2011; Baigent C. et al., 2010). 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 (Затейщикова А.А., 2005; Garcia-Rodriguez L.A. et al., 2008; Hippisley-Cox J. et al., 2010; Tendera M. et al., 2011).

Данные обстоятельства диктуют необходимость поиска новых активных соединений, причем предпочтение следует отдавать веществам, обладающим полипотентностью (Jager S. et al., 2011), 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 (Dhamija H.K. et al., 2011).

В этом плане представляет интерес изучение тритерпеноидных соединений, выделенных из растительного сырья и обладающих широким спектром фармакологической активности, в том числе и гиполипидемическим действием (Liu J., 2005; Liu Y.P. et al., 1993; Mengoni F. et al., 2002; Shah K.A. et al., 2010; Singh G.B. et al., 1992; Tang X.H. et al., 2005).

### **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 (Garai S., 2014; Kok F.J. et al., 2004; Maruthappan V. et al., 2000; Rao V.S. et al., 2011). Тритерпеновые

соединения, получаемые из растительных объектов, обладают широким спектром фармакологической активности (Панфилова Т.В. и др., 2003; Jager S. et al., 2009; Li S. et al., 2014; Oh S.R. et al., 2000; Pawar R.S. et al., 2005; Takahira M. et al., 1998; Tu J. et al., 2008). В ряде исследований доказана их эффективность в условиях гиперхолестеринемии (Santos F.A. et al., 2012; Rao V.S. et al., 2011).

Большая часть исследований гипополипидемической активности растительных препаратов проводится зарубежными учеными, и в исследованиях чаще всего проводится оценка эффективности, 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 гипополипидемической активности, но экспериментальных доказательств в настоящий момент времени недостаточно.

### **Цель исследования**

Экспериментальное обоснование гипополипидемического 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 гипополипидемического 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 и тритерпеноидов клюквы 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 D<sub>2</sub> и холестерина, оказывать нормализующее действие на продолжительность свертывания крови.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты показали наличие выраженной гипополидемической 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.), от 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 гипополидемической активности и влияния на основные патогенетические механизмы атерогенеза проводилось в соответствии с утвержденным планом исследования, 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 гипополидемического 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 нормализующее влияние на измененные в условиях экспериментальной гиперлипидемии показатели состояния системы гемостаза.

### **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 и 69-й научных конференциях по фармации, фармакологии и подготовке провизоров «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (22-23 января 2013 г., 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 конференции «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 источника.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**В первой главе** представлен обзор литературы, в котором обобщены современные представления о патогенезе атеросклероза, роли дислипидемических состояний в патогенезе атеросклеротических поражений сосудов. Описаны основные подходы медикаментозной профилактики и лечения гиперлипидемий, осложнения, препятствующие реализации выбранных схем лечения. Отражена информация об исследованиях по поиску и разработке гиполипидемических препаратов растительного происхождения, о потенциальной возможности применения в качестве источников для получения гиполипидемических средств тритерпенсодержащих растительных объектов.

**Во второй главе** описываются материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали тритерпеноиды облепихи (ТО) и тритерпеноиды клюквы (ТК) производства ООО «СиНаМ» (Россия). Содержание суммы урсоловой и олеаноловой кислот в объектах исследования составляет не менее 75%.

Исследования выполнены на 468 аутбредных крысах Wistar обоего пола весом 180,0-260,0 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Эксперименты проводили с соблюдением Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей», 1986 г.

Острую токсичность исследуемых субстанций определяли в соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ (Хабриев Р.У., 2005). Критерием оценки служила выживаемость животных, наблюдение вели в течение 14 дней.

Определение оптимальных терапевтических доз ТО и ТК было проведено с использованием твиновой модели гиперлипидемии (Хабриев Р.У., 2005). В качестве биохимических маркеров эффективности гиполипидемического действия использовали такие показатели как: содержание в сыворотке крови общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), общих липидов (ОЛ), содержание липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП).

Изучение эффективности гиполипидемического действия ТО и ТК при их использовании в оптимальных терапевтических дозах проведено на модели хронической алиментарной гиперлипидемии в сравнении с ципрофибратом («Липанор», Санофи Винтроп-Жантйи, Франция), который вводили в дозе 50 мг/кг (Хабриев Р.У., 2005). Для оценки действия ТО и ТК определяли следующие биохимические показатели: в крови – содержание ОЛ, ЛПНП и ЛПОНП, ОХС, холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), уровень тимоловой пробы, общего белка, глюкозы, концентрацию ТБК-активных продуктов в ЛПНП и ЛПОНП, гемолиз по Ягеру; в печени – содержание ХС, фосфолипидов (ФЛ), общего белка, нуклеиновых кислот, ТГ (Долгов В.В., 1999). Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе Н334 (АО Краснодарский ЗИП, Россия). По полученным коагулограммам определяли начало и конец свертывания крови, продолжительность свертывания крови.

Проводили изучение влияния курсового введения ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на некоторые показатели липидного и углеводного обменов у здоровых животных. Перед началом эксперимента (исходные значения), через 2 недели, 1 месяц и 2 месяца от начала введения определяли следующие биохимические показатели в крови: содержание ОХС, свободного холестерина, ХС-ЛПВП, ХС-ЛПНП, свободного глицерина, ТГ, свободных жирных кислот (СЖК), ФЛ, глюкозы. Через 2 месяца введения ТО и ТК в печени определяли 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 проводили коагулографические исследования.

Изучение влияния ТО и ТК на желчеобразовательную и желчсекреторную функции печени у здоровых животных проводили через сутки после 14-дневного введения субстанций в дозе 100 мг/кг. 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. Интенсивность желчевыделения определяли в остром опыте по количеству желчи, выделившейся в течение 3 часов. В суммарной порции желчи определяли содержание желчных кислот (ЖК) и ХС (Литвинчук М.Д., 1980).

Изучение противовоспалительной активности проведено в соответствии с методическими указаниями по изучению противовоспалительной активности новых нестероидных противовоспалительных препаратов (Хабриев Р.У., 2005). Для изучения собственного противовоспалительного действия тритерпеноидов использована методика воспроизведения острого экссудативного воспаления (модель каррагенинового отека) и хронического воспаления (модель адьювантного артрита). Интенсивность воспалительной реакции регистрировали онкометрически путем регистрации увеличения объема конечностей экспериментальных животных.

Влияние тритерпеноидов на всасывание холестерина из желудочно-кишечного тракта изучали путем определения содержания холестерина в крови до, через 2 и 4 часа после введения ХС в виде водной суспензии с суммой ТО и ТК в дозе 100 мг/кг (Хабриев Р.У., 2005).

Изучение влияния курсового 30-дневного введения ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на интенсивность адреналин-индуцированного липолиза в жировой ткани *in vivo* проводили в сравнении с фенофибратом («Трайкор», Лаборатория

Фурнье С.А., Франция) в дозе 12,5 мг/кг по приросту уровня свободного глицерина в крови (Хабриев Р.У., 2005). Определение свободного глицерина выполняли на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray, Китай) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы DiaSys (Германия).

Для изучения влияния ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на липолитическую активность сыворотки крови лабораторным животным после курсового 30-дневного применения субстанций в хвостовую вену вводили гепарин в дозе 100 ЕД/кг массы тела животного и регистрировали изменение концентрации в крови СЖК на автоматическом биохимическом анализаторе BS-380 (Mindray, Китай) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы DiaSys (Германия) (Хабриев Р.У., 2005). В качестве препарата сравнения использовали фенофибрат («Трайкор», Лаборатория Фурнье С.А., Франция) в дозе 12,5 мг/кг.

Коагулографические исследования влияния ТО и ТК на состояние свертывающей системы выполняли на фоне витаминной модели гиперлипидемии (Белай И.М., Остапенко А.А., 2011; Yousufzai S.Y.K.M., 1976). 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. Исследование процесса свертываемости крови проводили на коагулографе H334 (АО «Краснодарский ЗИП», Россия).

Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики. 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 постобработкой 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.

**В третьей главе** представлены результаты изучения «острой» токсичности и гиполипидемической активности ТО и ТК при их введении на фоне экспериментальных моделей гиперлипидемии.

Полученные результаты по оценке «острой» токсичности исследуемых субстанций на крысах позволяют отнести их по классификации Н.С. Hodge, L.H. Sterner к 6 классу токсичности – относительно безвредным веществам (Березовская И.В., 2003).

При первичной оценке гиполипидемической активности ТО и ТК при их введении в дозах 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 500 мг/кг и выполняемой на твиновой модели гиперлипидемии установлено, что по степени нормализации биохимических маркеров оптимальной терапевтической дозой для обеих субстанций является доза 100 мг/кг (рис. 1).

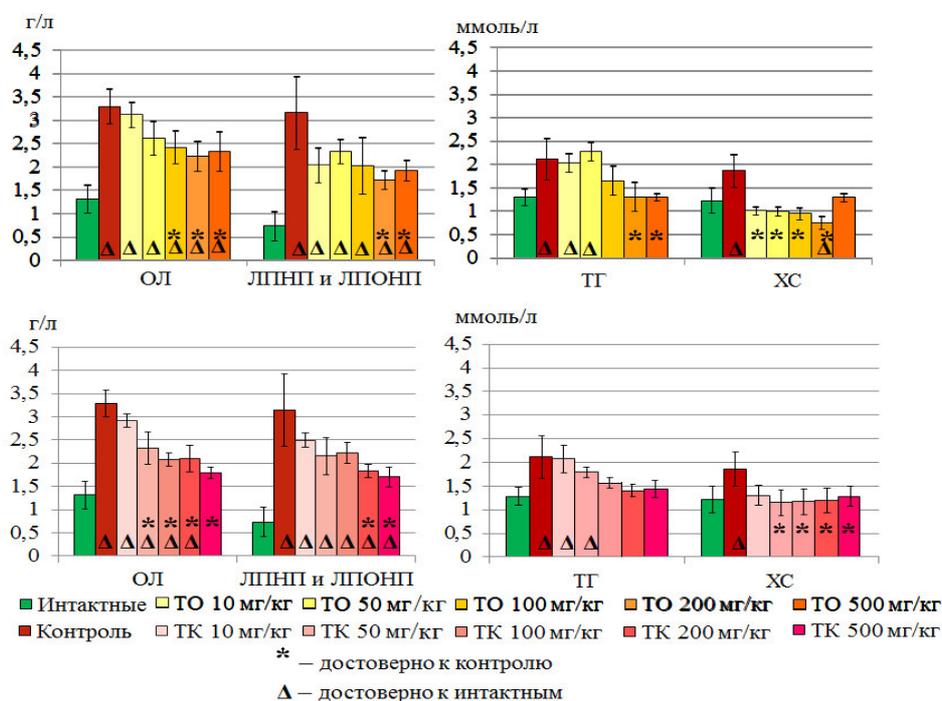


Рисунок 1. Влияние ТО и ТК на состояние показателей липидного обмена в крови на фоне твиновой гиперлипидемии

Так отчетливый гипохолестеринемический эффект проявлялся при курсовом применении ТО и ТК уже в дозе 10 мг/кг, что сопровождалось полной нормализацией уровня ОХС в крови, остальные показатели не претерпели серьезных изменений относительно значений контрольных 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 ОЛ, 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 ТО и ТК в дозе 200 мг/кг и 500 мг/кг, но эти значения достоверно не отличались от аналогичных показателей группы животных, получавших ТО и ТК в дозе 100 мг/кг.

Как видно из данных, представленных на рисунке 2, введение ТО в дозе 100 мг/кг на фоне хронической алиментарной гиперлипидемии сопровождалось нормализацией концентрации ОХС и ХС-ЛПНП. В печени отмечали достоверное снижение содержания ХС и ТГ по отношению к контрольным значениям.

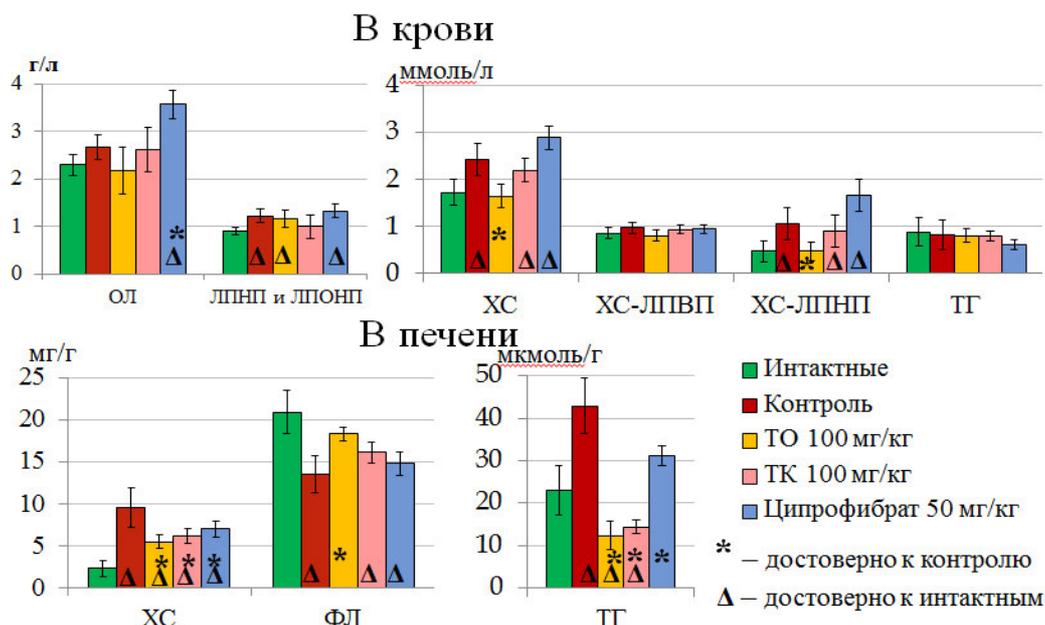


Рисунок 2. Влияние ТО и ТК на состояние показателей липидного обмена в крови на фоне алиментарной гиперлипидемии

При введении ТК в дозе 100 мг/кг отмечали некоторое уменьшение значения индекса атерогенности за счет невыраженного снижения в крови уровня ОХС и ХС-ЛПНП, но эти изменения были недостоверными. В печени же уровень ХС снизился на 35%, содержание ТГ уменьшилось относительно контроля на 66%. Введение животным препарата сравнения ципрофибрат в дозе 50 мг/кг значительно уступало по гиполипидемическому действию

исследуемым объектам: отмечали полную нормализацию лишь содержание ТГ в печени. При использовании ТО и ТК уровень в крови ХС и ХС-ЛПНП был достоверно ниже по сравнению со значениями животных, которым вводили ципрофибрат соответственно на 42% и 24%, 72% и 46%.

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 ХС-ЛПНП, 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, СЖК и глюкозы в крови (рис. 3).

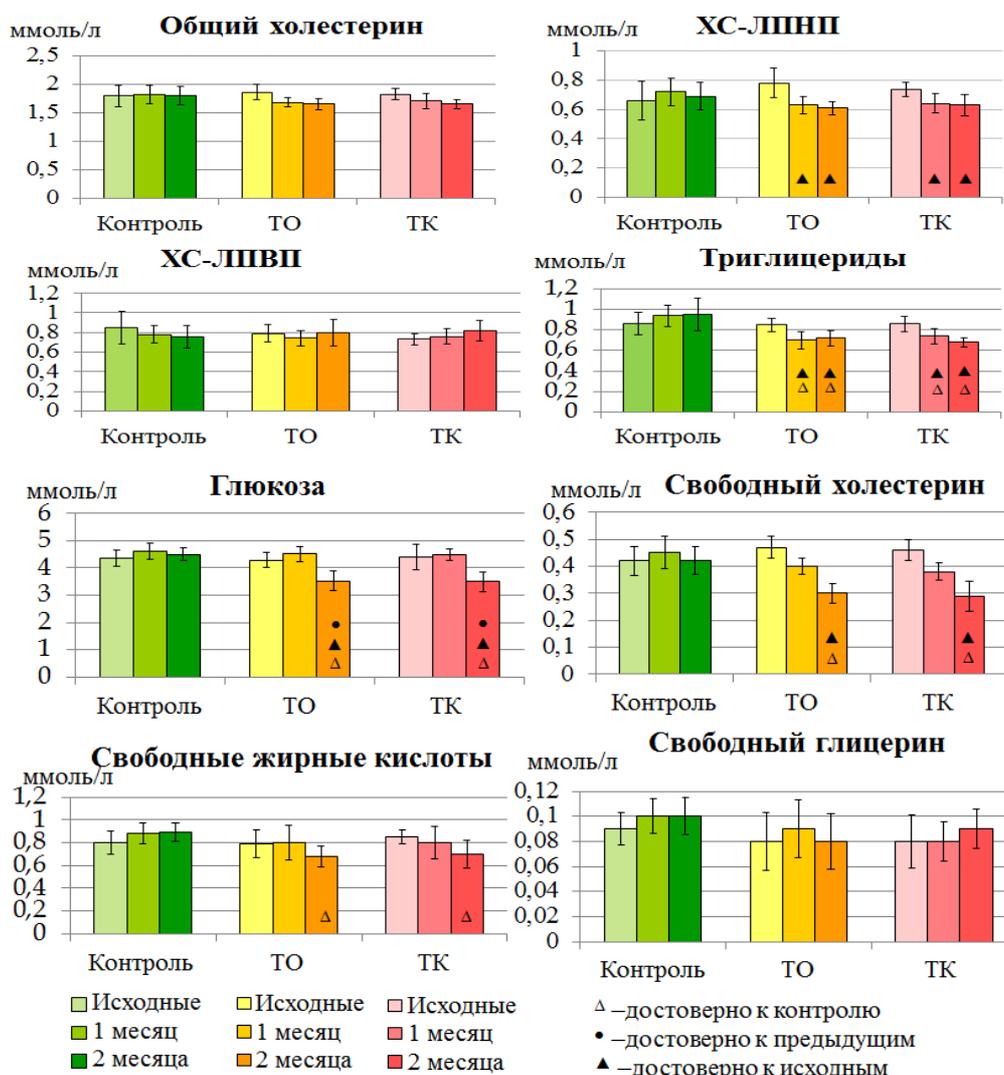


Рисунок 3. Влияние ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на показатели липидного и углеводного обмена при курсовом введении здоровым животным

В главе 4 описаны результаты изучения некоторых механизмов гипополидемического действия исследуемых субстанций. Учитывая ключевую роль печени в обмене 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.

Как видно из данных, представленных в таблице 1, при использовании ТО и ТК, отмечается изменение состава желчи при сохранении скорости и объема секреции, а именно: увеличение концентрации ЖК при неизменном содержании ХС. Необходимо отметить, что стимуляция элиминации ЖК с желчью может являться одной из составляющих гипохолестеринемического действия исследуемых веществ и этот эффект более выражен при использовании ТО.

**Таблица 1** – Влияние ТО и ТК на желчеобразовательную и желчевыделительную функцию печени здоровых животных

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 <sup>Δ</sup>
ЖК, мг%	704,5 ±48,83	1000,3 ±127,39	+42 <sup>Δ</sup>	844,2 ±49,72	+20 <sup>Δ</sup>	500,4 ±64,82	-29 <sup>Δ</sup>
ХС желчи, мг%	39,5 ±5,23	40,0 ±4,67	+1	37,9 ±5,56	-4	27,6 ±3,69	-30 <sup>Δ</sup>
Х/Х коэф.	18,0 ±1,87	25,0 ±4,03	+39 <sup>Δ</sup>	22,6 ±2,83	+25 <sup>Δ</sup>	18,2 ±1,09	+1
Общее количество ЖК за 3 ч., мг/100 г	3,66 ±0,46	5,56 ±0,517	+52 <sup>Δ</sup>	4,77 ±0,277	+30 <sup>Δ</sup>	4,25 ±0,622	+16
Общее количество ХС 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
<p><b>Примечание:</b> n – количество животных в группе;  <math>\Delta</math>-<math>p &lt; 0,05</math> – данные достоверны по отношению к контрольным значениям;  p – уровень достоверной разницы;  Х/Х коэф. – холято-холестериновый коэффициент.</p>							

Фламин в данных экспериментальных условиях способствовал увеличению общего количества желчи, выделившейся за 3 часа. Одновременно

достоверно по сравнению с контрольными животными снизилась концентрация ЖК и ХС в желчи, но в целом это не отразилось на общем количестве ЖК и ХС, выделившихся за 3 часа эксперимента, так как эти показатели достоверно не отличались от контрольных.

Для оценки постгепариновой липолитической активности крови проводили определение степени прироста концентрации СЖК и общей активности липазы в сыворотке крови после введения гепарина. Введение гепарина контрольным животным показало достоверный по отношению к исходному значению двукратный рост концентрации СЖК. В группе опытных животных отмечали более выраженный подъем уровня СЖК, превосходящий данный показатель контрольной группы после введения фенофибрата, ТК и ТО на 46%, 50% и 87% соответственно. Данные изменения коррелировали с приростом активности липазы, которые составили по отношению к приросту в контрольной группе 23% после введения фенофибрата, 24% после введения ТК и 68% после введения ТО. Таким образом, курсовое введение ТО, ТК и фенофибрата сопровождается потенцированием в сыворотке крови постгепариновой липолитической активности, более выраженной в группе животных, получавших ТО (табл. 2).

**Таблица 2** – Влияние 30-дневного введения суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы 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.

В проведенных исследованиях установлено, что ТО и ТК не оказывают влияния на активность тканевых липаз и на процесс всасывания ХС из желудочно-кишечного тракта.

В главе 5 приведены результаты изучения ряда дополнительных эффектов ТО и ТК, которые могут способствовать повышению эффективности антиатерогенной терапии.

Имеющиеся многочисленные данные о значительной роли перекисного окисления как одного из ведущих факторов риска развития атеросклероза, зачастую сопровождающего гиперлипидемии, побудили нас провести оценку уровня пероксидации при хронической алиментарной гиперлипидемии.

Применение ТО и ТК в дозе 100 мг/кг привело к достоверному по отношению к контролю снижению ТБК-активных продуктов ЛПНП и ЛПОНП, причём этот показатель в обоих случаях был достоверно ниже, чем у животных интактной группы. Интенсивность спонтанного гемолиза эритроцитов полностью нормализовалась при введении тритерпеноидов. Применение ципрофибрата не привело к нормализации исследуемых показателей (рис. 4).

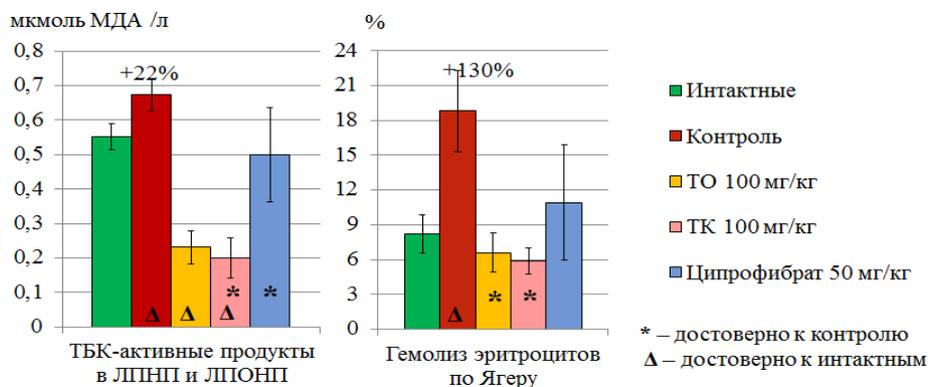


Рисунок 4. Влияние ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на интенсивность перекисного окисления и резистентность биомембран на фоне алиментарной гиперлипидемии

При введении ТО в дозе 100 мг/кг на фоне каррагенинового отека отмечали снижение интенсивности отека лапки экспериментальных животных, но эти изменения не были достоверны по отношению к значениям контрольной группы. ТК более эффективно подавляют экссудативную реакцию, вызванную субплантарным введением каррагенина. Введение диклофенака также привело к снижению степени прироста объема лапы животных. Причем, эффективность ТК и диклофенака была достоверно выше эффективности ТО (рис. 5).

При исследовании влияния тритерпеноидов на интенсивность воспалительного процесса на модели хронического адьювантного артрита установлено, что при использовании веществ по лечебной схеме введения диклофенак уменьшал интенсивность первичной и вторичной воспалительной реакции, ТК уменьшали первичную реакцию, а ТО в данных условиях не оказали значимого влияния на воспалительный процесс (рис. 6).

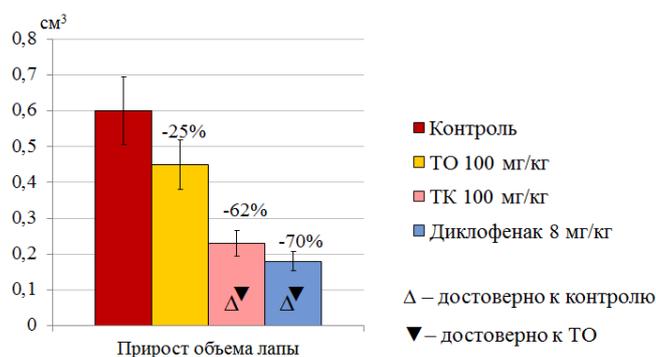


Рисунок 5. Изучение противовоспалительного действия ТО и ТК на модели острого воспаления

При лечебно-профилактическом введении исследуемых субстанций и диклофенака отмечали статистическое снижение интенсивности первичной реакции на третьи и 14-е сутки. Оценка интенсивности вторичной воспалительной реакции показала, что введение ТК и диклофенака сопровождалось предупреждением вторичного иммунного воспаления на 14 сутки (рис. 6).

Важной составляющей антиатерогенной терапии является коррекция сдвигов системы гемостаза. Как видно на рис. 7, алиментарная хроническая гиперлипидемия, воспроизводимая путем перевода животных на диету, обогащенную липидами, сопровождалась уменьшением по сравнению с интактными значениями времени продолжительности свертывания крови. Использование ТО и ТК в дозе 100 мг/кг сопровождалось достоверным увеличением по сравнению контролем и полной нормализацией времени окончания свертывания и продолжительности свертывания. На фоне введения ципрофибрата в дозе 50 мг/кг также отмечали восстановление до нормальных значений нарушенных показателей свертывающей системы крови.

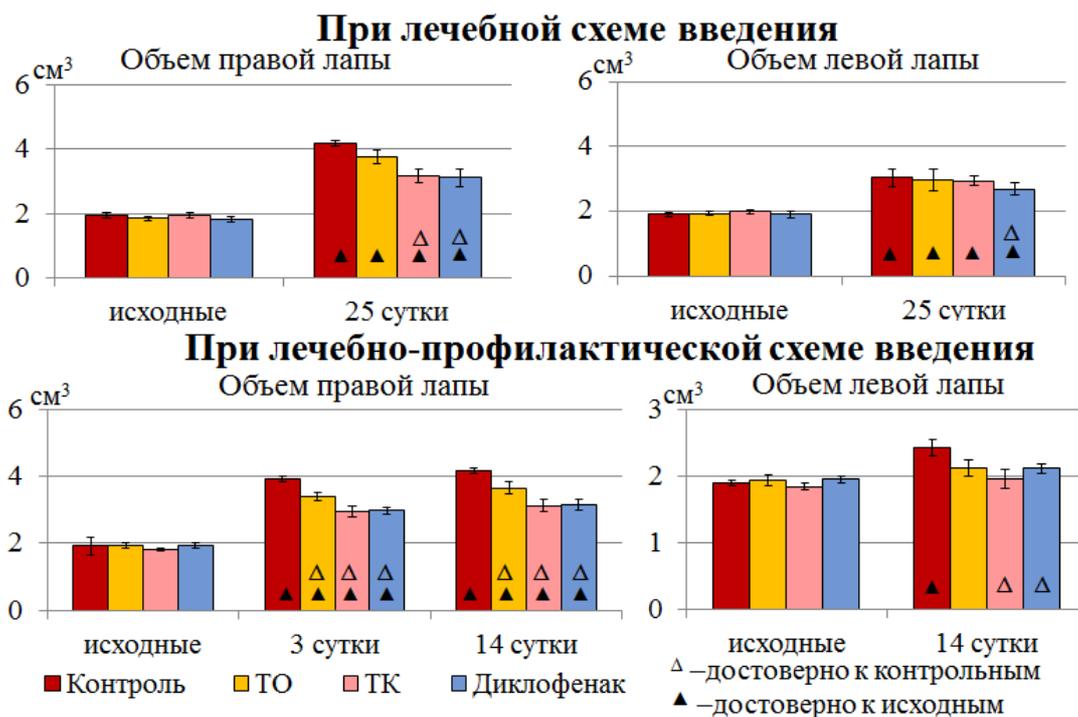


Рисунок 6. Изучение противовоспалительного действия ТО и ТК в дозе 100 мг/кг на модели хронического воспаления

Введение тритерпеноидов в дозе 100 мг/кг на фоне витаминной модели гиперлипидемии сопровождалось увеличением продолжительности свертывания крови, причем данный показатель полностью нормализовался. В случае использования фенофибрата все исследуемые показатели остались на контрольном уровне. Значение показателя время окончания свертывания при использовании розувастатина достоверно возросло, по сравнению с контролем (рис. 8).

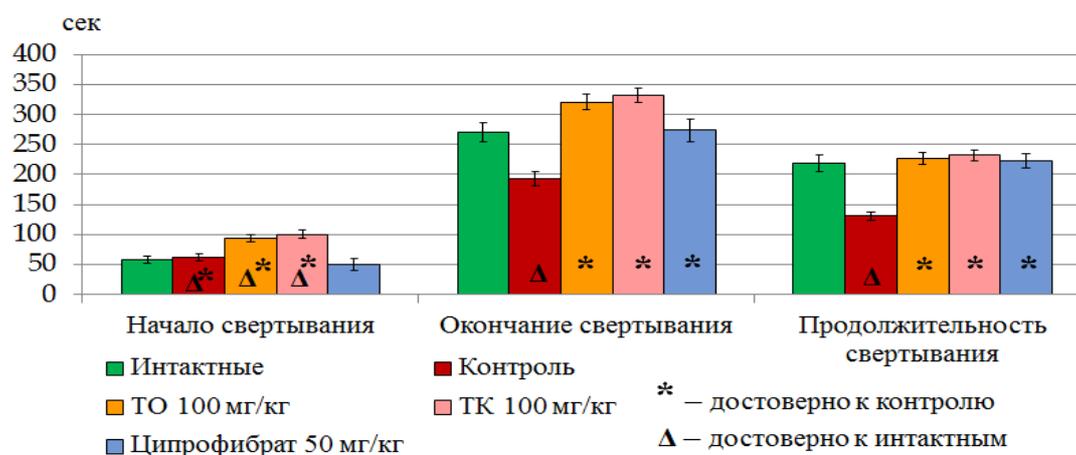


Рисунок 7. Влияние ТО и ТК на показатели процесса свертывания крови в условиях алиментарной гиперлипидемии

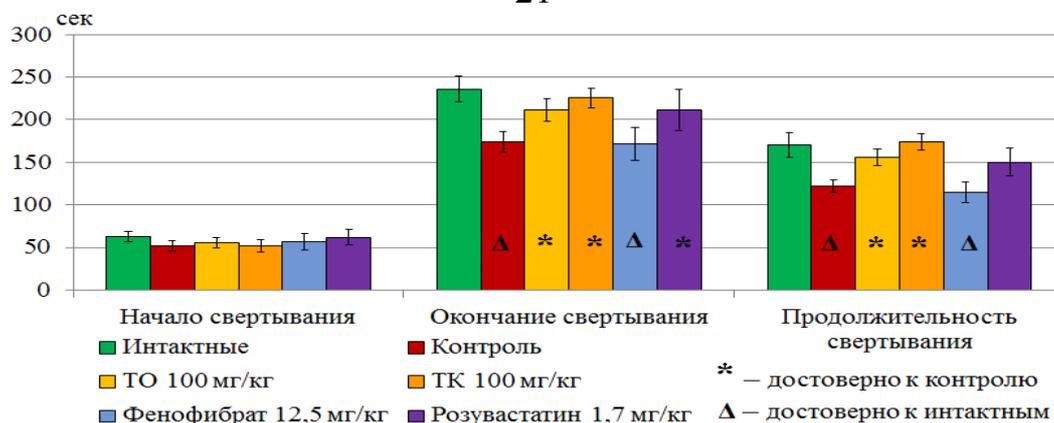


Рисунок 8. Влияние ТО и ТК на показатели процесса свертывания крови в условиях витаминной модели гиперлипидемии

В главе 6 (Обсуждение результатов) приводится обобщение результатов, полученных в ходе исследования, их заключительная интерпретация с учетом литературных данных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлена низкая токсичность ТО и ТК. Введение исследуемых субстанций в максимальной технически возможной для введения дозе 30000 мг/кг не сопровождалось гибелью животных.

Первичная оценка гиполипидемической активности и определение оптимальной терапевтической дозы ТО и ТК при их введении в дозах 10 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг, 200 мг/кг, 500 мг/кг на модели твиновой гиперлипидемии показала наличие гиполипидемической активности, проявляющейся в дозе 10 мг/кг и усиливающий при увеличении дозы. В качестве оптимальной терапевтической дозы для дальнейшего изучения была выбрана доза 100 мг/кг.

Сравнительная оценка эффективности ТО и ТК в дозе 100 мг/кг с препаратом ципрофибрат, проводимая на модели алиментарной гиперлипидемии показала, что по сумме исследуемых биохимических показателей максимальной эффективностью обладают ТО, положительно влияющие на изменения биохимических маркеров в крови и в печени.

При курсовом 2-месячном введении ТО и ТК здоровым животным в дозе 100 мг/кг проявляется гипотриглицеридемическое и гипогликемическое действие.

Фармакодинамические исследования ТО и ТК показали, что основными точками приложения гиполипидемического действия исследуемых субстанций является стимуляция экскреции ХС с желчью путем перевода в ЖК и потенцирование активности липопротеинлипазы крови. Экспериментально установлено, что ТО и ТК обладают рядом дополнительных эффектов, способных усиливать, наряду с гиполипидемической активностью, эффективность антиатерогенного действия исследуемых субстанций. Так ТО и ТК препятствуют окислительной модификации транспортных липопротеинов, обладают мембраностабилизирующим и противовоспалительным действием, влияют на измененные в условиях гиперлипидемии показатели системы гемостаза.

### **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 LD<sub>50</sub> 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 ХС и ХС-ЛПНП 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 ХС-ЛПНП, 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, СЖК 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 ЖК 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 ТО.

7. Тритерпеновые соединения облепихи и клюквы обладают дополнительными плейотропными 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 ЛПНП и ЛПОНП 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 D<sub>2</sub> и ХС, проявляющийся повышением свертывающей активности крови.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследований свидетельствуют о выраженной гипополидемической 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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.

*Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ*

1. Изучение действия тритерпеноидов из плодов облепихи в условиях алиментарной гиперлипидемии / Н.О. Горбатюк, Л.Е. Назарова, Е.О. Сергеева и др. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6. № 4. – С. 108–110.
2. Черников М.В. Изучение противовоспалительной активности суммы тритерпеновых кислот из плодов облепихи (*Hipporphan rhamnoides* L.) и клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) / М.В. Черников., А.Ю.Терехов, Н.О.Горбатюк // Образование. Наука. Научные кадры. – 2014. – № 2. – С. 214–217.
3. Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот облепихи (*Hipporphae rhamnoides* L.) и клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) на липолиз в жировой ткани лабораторных животных при курсовом введении / Н.О. Горбатюк, М.В. Черников, А.Ю. Терехов и др. // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-19. – С. 4231–4234.
4. Горбатюк Н.О. Изучение активности суммы тритерпеновых кислот из плодов облепихи и клюквы на модели хронического воспаления / Н.О.Горбатюк, М.В. Черников, А.Ю. Терехов // Вестник новых медицинских технологий. – 2015. – Т. 22. №2. – С. 85–87.
5. Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот облепихи (*Hipporphae rhamnoides* L.) и клюквы (*Vaccinium oxycoccos* L.) на липолитическую активность сыворотки крови лабораторных животных / Н.О. Горбатюк, М.В. Черников, А.Ю. Терехов и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. № 10. – С. 12–14.

*Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:*

1. Изучение влияния суммы тритерпеноидов из плодов клюквы на желчеобразовательную и желчсекреторную функции печени у интактных животных / Н.О. Горбатюк, Л.Е. Назарова, Л.А. Саджая // Человек и лекарство: тез. докл. 18 Рос. нац. конгресса 11-15 апр. 2011г. – М., 2011. – С.479.
2. Изучение противовоспалительного действия суммы тритерпеноидов из плодов клюквы / Е.О. Сергеева, Л.Е. Назарова, Л.А. Саджая, Н.О. Горбатюк // Университетская наука: взгляд в будущее. Материалы итоговой научной конференции сотрудников КГМУ, Ц.-Ч. науч. центра РАМН и отделения РАЕН 2-3 февраля 2011 года, Т 2. – Курск, 2011. – С.276 –278
- 3 Горбатюк Н.О. Изучение мембраностабилизирующей активности суммы тритерпеноидов из плодов облепихи и клюквы и их влияние на интенсивность перекисного окисления липидов на интактных животных / Н.О. Горбатюк // Вестник волгоградского гос. мед. Университета: материалы III Всероссийского научно-практического семинара, сентябрь 2011 г. – Волгоград, 2011. – С. 27
4. Изучение влияния суммы тритерпеновых кислот облепихи и клюквы на показатели гемостаза животных на фоне витаминной модели гиперлипидемии / Н.О. Горбатюк, М.В. Черников, А.Ю. Терехов и др. // Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук: материалы III международной научно-практической конференции – Praha, Czech Republic: Printing house, 2016. – С. 35–37.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ЖК – желчные кислоты;  
ИБС – ишемическая болезнь сердца;  
ЛПВП – липопротеины высокой плотности;  
ЛПНП – липопротеины низкой плотности;  
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности;  
ОХС – общий холестерин;  
СЖК – свободные жирные кислоты;  
ТБК-активные продукты – продукты свободно-радикального окисления, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой;

ТГ – триглицериды;  
ТК – тритерпеноиды клюквы  
ТО – тритерпеноиды облепихи;  
ФЛ – фосфолипиды;  
ХС – холестерин;  
ХС-ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности;  
ХС-ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности;  
ХС-ЛПОНП – холестерин липопротеинов очень низкой плотности.

**Горбатиук Наталья Олеговна**

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Подписано в печать «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.  
Формат 60x84/16. Бумага кн.- журнальная  
Печать ротапунктная. Усл. печ.л. \_\_\_\_.  
Тираж 100 экз. Заказ \_\_\_\_\_  
Пятигорский медико-фармацевтический  
Институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ  
375532, г. Пятигорск, проспект Калинина, 11.