

ТБИЛИССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Медея Сихарулидзе

Возможность коррекции избыточного веса и связанного с ним оксидативного стресса с помощью экстракта цитрусов «флавоцитрина».

14.00.05 – Внутренние болезни

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Тбилиси
2006

Работа выполнена в Институте Медицинской Биотехнологии
Грузинской Академии Наук.

Научный руководитель: - **Тамар Саникидзе**,
доктор биологических наук , профессор (14.00.16);

- **Гайане Симония**,
доктор медицинских наук, профессор (14.00.05).

Официальные оппоненты:

Защита диссертации состоится _____ 2006 года в _____ ч. на заседании диссертационного совета Тбилисского Государственного Медицинского Университета (0177, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела, 29).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тбилисского Государственного Медицинского Университета (0160, Тбилиси, пр. Важа-Пшавела, 29).

Автореферат разослан ----- 2006 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Н. Какауридзе

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы:

Ожирение является одним из глобальных заболеваний современной цивилизации. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в конце XX века избыточный вес отмечался у 30% населения планеты (1.7 млрд. людей). Ожирение относится к т.н. заболеваниям цивилизации. «Вестернизация» питания, хаотичный режим питания, ограничение физической активности приводят к развитию «пандемии» алиментарного или диетиндуцированного ожирения (Мельниченко 2001).

Выстроить многочисленные патогенетические звенья ожирения в определенную последовательность очень сложно, так как еще не полностью идентифицированы роли многочисленных соединений, участвующих в патогенезе данного заболевания; кроме того, существуют как прямые, так и обратнокорреляционные связи между гормонами, цитокинами и другими активными соединениями.

При алиментарном ожирении происходит избыточная аккумуляция жиров, нарушение липидного обмена. Этот тип ожирения характеризуется повышением в крови свободных жирных кислот, которые куммулируются в печени. Увеличивается синтез триглицеридов и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП). Дислипидемия при ожирении характеризуется повышением в крови триглицеридов, общего холестерина, ЛПОНП, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и снижением липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Этот тип дислипидемии увеличивает риск развития ишемической болезни сердца в 2-4 раза по сравнению с общей популяцией. Интенсификация жирового и углеводного обмена тесно связана с оксидативными процессами свободных жирных кислот и свободнорадикальным окислением. В организме нарушается баланс между про- и антиоксидантными системами, происходит перекисное окисление мембранных фосфолипидов, развивается окислительное повреждение сосудистого эндотелия. Оксидативный стресс является одним из патогенетических звеньев атеросклероза, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, неалкогольного стеатоза (или стеатогепатита) печени.

Согласно современной концепции, ожирение рассматривается как вяло текущий хронический воспалительный процесс. В этом процессе адипоцитам отводится ведущая роль, поскольку они являются источниками цитокинов (фактора некроза опухоли - α (TNF- α), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1 (IL-1), monocyte chemoattractant protein-1 и др) и адипокинов (лептин, адипонектин, резистин и др). Все эти молекулы оказывают позитивное или негативное воздействие на активацию сигнальных путей воспаления и чувствительность к инсулину. В условиях оксидативного стресса имеется дисрегуляция выработки цитокинов и адипокинов в жировой ткани. Избыточная продукция воспалительных цитокинов, изменение уровня адипокинов, в частности, адипонектина, лептина, является одним из патогенетическим звеном развития патологий, ассоциированных с ожирением.

Исходя из вышесказанного, становится очевидной актуальность поиска лечебных препаратов, мишенью которых служат патогенетические звенья ожирения. Исследования последних лет выявили новые средства для коррекции ожирения, действие которых фокусировано на белой адипозной ткани в качестве терапевтической мишени регуляции метаболизма жировой ткани (Boss O., Berghem N., 2006). С этой целью все чаще применяются препараты растительного происхождения, характеризующиеся антиоксидантным эффектом и модулирующим действием на липидный обмен. Предметом нашего внимания стал препарат экстракт цитрусов. Экстракт цитрусов содержит флавоноиды – биологически активные вещества, витамины, в т. ч. витамин С. Согласно литературным данным, флавоноиды обладают способностью модулировать липидный обмен, регулируют содержание оксида азота. Цитрусовые флавоноиды и витамин С действуют как

“скавенджеры” свободных радикалов кислорода и значительно уменьшают их содержание в крови (Lonchamp M, Guardiola B, et al. 1989).

Исходя из вышесказанного, целью нашей работы являлось изучение роли механизмов свободнорадикального окисления в патогенезе ожирения и оценка эффективности корректирующего действия цитрусового экстракта в экспериментальной модели диетиндуцированного ожирения.

Задачи исследования:

1. Определение изменений физиологических показателей (интенсивность увеличения массы тела, массы висцерального жира, суточное потребление пищи и воды) у крыс в условиях моделирования диетиндуцированного ожирения (ДИ) и воздействия цитрусовым экстрактом.
2. Определение в крови у крыс в условиях моделирования диетиндуцированного ожирения (ДИ) и воздействия цитрусовым экстрактом:
 - 1) показатели липидного обмена (триглицеридов, общего холестерина, ЛПНП, ЛПВП).
 - 2) активности про- (супероксидрадикалов и липопероксидов) и антиоксидантной (каталазы, супероксид дисмутаза, церулоплазмина) систем.
 - 3) содержания аминотрансфераз (ALT, AST).
3. Определение в адипозной ткани у крыс в условиях моделирования диетиндуцированной тучности и воздействия цитрусовым экстрактом:
 - 1) интенсивности митохондриального дыхания;
 - 2) интенсивности процессов пероксидации липидов;
 - 3) уровня оксида азота;
 - 4) базальной и LPS – индуцированной продукции реактивных соединений кислорода и азота периферическими мононуклеарными клетками крови контрольных и находившихся на высококалорийной диете крыс.

Научная новизна работы:

1. Впервые в условиях моделирования ДИ ожирения и воздействия цитрусовым экстрактом проведено комплексное изучение изменений физиологических, биохимических, биофизических и иммунологических параметров в организме крыс.
2. Показано, что на фоне высококалорийной диеты, наряду с увеличением массы тела и висцерального жира, развивается дислипидемия и оксидативный стресс.
3. Показано, что в модели ДИ ожирения нарушение окислительного метаболизма и усиленная генерация реактивных форм кислорода и азота в висцеральном жире играет важную роль в развитии системного оксидативного стресса.
4. Впервые показано, что на фоне высококалорийной диеты у крыс частично меняется базальная и LPS индуцированная продукция реактивных соединений азота и кислорода мононуклеарными клетками.
5. Под действием цитрусового экстракта в организме нормализуется окислительный и липидный метаболизм, регулируется содержание оксида азота, что приводит к уменьшению системного оксидативного стресса и дислипидемии и к восстановлению окислительного метаболизма в висцеральном жире.

Основные положения, вынесенные на защиту:

1. В модели ДИ ожирения в организме крыс наблюдается нарушение липидного обмена и окислительного метаболизма, усиленная генерация свободных радикалов, изменение содержания оксида азота в крови и висцеральном жире.
2. Корректирующее действие цитрусового экстракта на окислительный и липидный метаболизм способствует нормализации окислительного метаболизма в висцеральном жире, уменьшению системного оксидативного стресса, содержанию оксида азота.

Практическая ценность работы:

На основании проведенных в эксперименте исследований установлено корректирующее действие цитрусового экстракта на ДИ ожирение и ассоциированный с ним оксидативный стресс, что может в дальнейшем способствовать более глубокому клиническому изучению и определению целесообразности клинического применения этого природного средства.

Апробация работы: Доклад о материалах и основных положениях диссертации был сделан на заседании ученого совета Института Медицинской Биотехнологии Грузинской Академии наук (протокол №4, 31 мая 2006).

Публикации: По материалам диссертации в рецензируемых журналах опубликованы 5 статей, из них 3 – в журналах международного обращения..

Структура и объем диссертации: Диссертация содержит 129 печатных страниц, состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, собственные исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации, список использованной литературы (187 источников). В диссертации приведены 16 таблиц, 2 фотоснимка, 10 диаграмм, 1 схема .

Материал и методы исследования.

Моделирование алиментарного ожирения.

Эксперименты проводились на половозрелых крысах - самках, весом 180-200г. (60 крыс). Экспериментальные животные были разделены на 3 группы:

I группа – контрольные животные (20 крыс)

II группа – алиментарное ожирение (20 крыс)

III группа – алиментарное ожирение на фоне инъекций цитрусового экстракта (20 крыс).

В течение первой недели все крысы (60 животных) принимали стандартную пищу "Puruna rodent chow" (Жир – 20,6%, белок – 32,4%, углеводы – 47%) и воду ad libitum. Затем животные рандомизированно были разделены на 3 группы. Животные контрольной (I) группы в течение 7 недель принимали стандартную пищу и воду ad libitum. Животные II группы в течение 7 недель находились на смешанной диете, состоящей из стандартной пищи (47%), сладкого сгущенного молока (44%), растительного масла (8%) и растительного крахмала (1%) (Жир – 29,6%, белок – 14,8%, углеводы – 55,6%) (диета #C 11024, Research Diets, New Brunswick, NJ (West D., et al., 1992), и принимали воду ad libitum. Животные III группы в течение 3 недель принимали смешанную пищу и воду ad libitum. В течение последующих 4 недель параллельно смешанной диете им проводились инъекции цитрусового экстракта в дозе 30 мг/кг.

8 недель спустя после начала эксперимента у животных производился забор крови для биохимических, биофизических, иммунологических исследований. Затем животных умертвляли под эфирным наркозом. Взвешивали массу висцеральной адипозной ткани.

Определение активности каталазы в сыворотке крови.

Активность антиоксидантного фермента каталазы определяли по методу Н. Аebi (1984), модифицированному М. А. Королюком, Ивановой Л.И. и др. (1988), с помощью спектрофотометра СФ-46 ЛОМО.

Принцип данного метода основан на способности перекиси водорода образовывать стойко окрашенный комплекс с солями молибдена.

На 0,1 мл сыворотки крови добавляли 2мл 0,03%-го раствора H_2O_2 . В ложной пробе вместо сыворотки использовали 0,1 мл дистиллированной воды. Эти пробы в течение 10 минут помещали в водяную баню при температуре $25^{\circ}C$. После этого добавляли 1мл 4%-го раствора молибдата аммония. Интенсивность полученного окрашивания определяли на длине 410 нм волны на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО.

Активность каталазы в сыворотке определяли с помощью следующей формулы:

$$E = (A_{\text{ложн}} - A_{\text{пр}}) \cdot V \cdot t \cdot k$$

Где E является активностью каталазы (мкат/л).

$(A_{\text{ложн}} - A_{\text{пр}})$ – экстинцией ложной и пробной пробирок;

V – объем пробы (0.1 мл);

t – период инкубации (10 мин);

k – коэффициент ммольной экстинции перекиси водорода, равный $22,2 \cdot 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Молекулярной активностью считается число молей субстрата, преобразованное 1 молекулой фермента в 1 минуту.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по методу Ried (1970), модифицированному Макаренко (1988).

Эритроциты промывали в физиологическом растворе в соотношении 1:2. Проводили гемолиз 0,5 мл эритроцитарной массы с помощью 0,5 мл трис-НСI (рН=7,4). Для осадки гемоглобина к гемолизату добавляли 0,25мл 96%-го раствора этанола и 0,15 мл хлороформа, центрифугировали в течение 10 мин. при частоте 5000 оборотов..

Для определения СОД к 0,02 мл супернатанта добавляли инкубационную среду, содержащую 2,7 мл буфера (0,05М K_2HPO_4 и 0.1 мМ EDTA), 0,1мл нитросинего тетразола (начальная концентрация 1,5 мМ), 0,1мл метилсульфат-метилфеназона и определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ – 46 ЛОМО на длине 540 нм волны (E_1). Затем в пробу добавляли 0,1 мл NADH; оставляли на 10 мин. в темноте при $t=30^{\circ}C$, после этого снова определяли оптическую плотность (E_2). О реакции судили по разнице поглощений (E_1-E_2). За единицу активности (СОД) принимали 50% торможения реакции восстановления нитросинего тетразола. Активность фермента выражали в единицах на 1 мл эритроцитов.

Определение глюкозы в крови.

Содержание глюкозы в крови определяли с помощью стандартных индикаторов Medi-test

Определение общего холестерина, триглицеридов и липопротеидов низкой плотности (LDL) и липопротеидов высокой плотности (HDL) в сыворотке крови.

Содержание общего холестерина, триглицеридов в сыворотке крови определяли с помощью рефлектофотометра типа Acctrend-GCT (фирма Roche).

HDL определяли с помощью диагностических наборов in vitro (Lachema-chol-250).

LDL высчитывали по формуле: $LDL \text{ хол} = \text{общ.хол} - HDL \text{ хол} - \text{тг}/5$

Индекс атерогенности высчитывали по формуле: $\text{общ.хол} - HDL \text{хол} / HDL \text{хол}$

Определение аминотрансфераз в сыворотке крови.

Аминотрансферазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом. Длина волны $\lambda=540\text{нм}$. Был использован набор Lachema (AST ALT 180).

Метод основан на определении оптической плотности 2-оксиглутаровой кислоты и гидразина пировиноградной кислоты в щелочной среде. Для остановки ферментативного процесса в инкубационной среде был использован 2,4-динитрофенилгидразин. Увеличение оптической плотности пропорциональна концентрации пировиноградной кислоты.

Спектроскопические исследования электронно парамагнитного резонанса (ЭПР).

ЭПР исследования проводились на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), оперирующем на сверхвысокой частоте 9.77 GHz с модуляционной частотой 50 kHz при температуре жидкого азота ($-196^{\circ}C$).

Изучали ЭПР спектры крови и висцерального жира. В крови определяли ЭПР сигналы прооксидантной (ионов переменной валентности (Mn^{2+} ($g_1=2,14$), Fe^{2+} ($g=2,37$, $\Delta H=350\text{Гс}$), метгемоглобина (MetHb) $g=6,0$)) и антиоксидантной (церулоплазмина ($g=2,05$), Fe^{3+} -трансферрина ($g=4,3$)) (Пулатова В и др. 1999). Регистрация спектров производилась на 0,6мТ амплитуде модуляции и на мощности микроволнового излучения 100 мВт.

В висцеральном жире определяли показатели митохондриального дыхания (ЭПР сигналы флавинов и семихиноновых форм убихинонов ($g=2,00$) и железосульфатных (FeS) центров ($g=1,94$); ЭПР сигналы Mn^{2+} содержащих комплексов ($g=2,14$).

С целью определения свободной окиси азота в крови и висцеральном жире применяли спин-ловушку диэтилдитиокарбамат натрия (DETC) (SIGMA). DETC (в дозе 50 мг/кг) и Fe^{2+} -цитрат (50 мг $FeSO_4 \cdot 6H_2O + 250$ мг натрия цитрат кг) вводили интраперитонеально. Животных забивали через 10 мин. после введения спин-ловушки. ЭПР спектры $NO-Fe^{2+}-(DETC)_2$ комплексов определялись при температуре жидкого азота на микроволновой мощности в 20 мвт.

С целью определения пероксидрадикалов ($LOO\cdot$) в крови и висцеральном жире использовали спин-ловушку α -фенил -тетр-бутилнитрон (PBN) (SIGMA), которую вводили интраперитонеально в дозе 50 мг/кг.[17]. Животных забивали через 10 мин. после введения спин-ловушки. ЭПР спектры $LOO\cdot$ определяли при комнатной температуре на микроволновой мощности в 20 мвт.

С целью определения в крови свободных радикалов кислорода (супероксид радикалов) применяли спин-ловушку 5,5 диметил-1-пролин-IV-оксид (DNPO) (SIGMA). Проводили инкубацию с DMPO (в дозе 50 mM на 1 мл крови) в течение 3 минут при комнатной температуре. ЭПР спектры супероксид радикалов определяли при комнатной температуре на микроволновой мощности в 20 мвт.

Изучение базальных и липополисахарид (LPS) - индуцированных реактивных соединений азота и кислорода на культуре мононуклеарных клеток крови крыс.

Культуру мононуклеарных клеток крови крыс получали посредством центрифугирования крови на фикал-непроницаемом градиенте (400g 40 мин) и инкубировали в клеточной среде с 100 IU/ml пенициллина и 100 IU/ml стрептомицина). Клетки помещали в стерильный сосуд и производили инкубацию с LPS (в дозе 50 ng/ml) с цитрусовым экстрактом (в дозе 0,03 mg/ml) при $t=37^{\circ}C$ в среде 5% CO_2 в течение 18 часов.

Затем в клеточной культуре с помощью метода ЭПР определяли содержание супероксид радикалов и свободной окиси азота по вышеописанной методике.

Статистическая обработка полученных результатов проводилось методом вариационной статистики с применением критерии Стьюдента (t) программным обеспечением STATISTICA/WGO (Stat Soft, USA 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований было установлено, что интенсивность увеличения массы тела крыс, принимавших высококалорийную пищу в течение 7 недель, на 59,6% превышала интенсивность соответствующего показателя крыс, находившихся на обычном питании. Вместе с тем, суточное количество употребляемой пищи и воды у крыс, находившихся на высококалорийной диете, превышало соответствующие показатели контрольных животных на 20% и 36%, соответственно.

На фоне потребления высококалорийной пищи в течение 7 недель масса висцерального жира на 57% превысила величину соответствующего параметра контрольных животных и составила 5.1% от всей массы тела (у контрольных животных – 3,8%) (диаграмма №5).

Таким образом, на основе анализа полученных результатов можно заключить, что на фоне высококалорийной пищи масса животных статистически достоверно увеличивается, в основном, за счет депонирования висцерального жира. Масса тела растет на фоне усиления

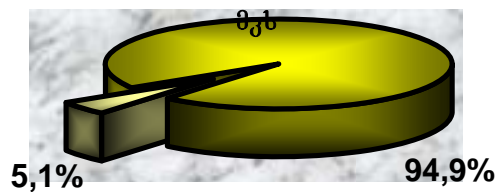
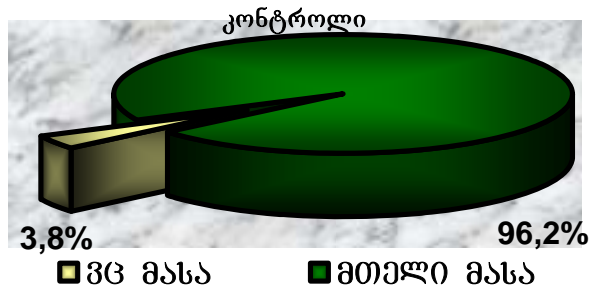
аппетита (суточного количества потребляемой пищи) и, соответственно, куммуляции энергии.

Один из механизмов прямого атерогенного действия ожирения – гипертриглицеридемия, и в меньшей степени, гиперхолестеринемия. Употребление высококалорийной пищи приводит к повышению синтеза триглицеридов печенью, который превосходит тканевую утилизацию богатых триглицеридами ЛПНП. В финале происходит накопление ЛПНП в организме. С увеличением веса снижается ЛПВП (Дедов И.И. 2004).

В результате наших исследований установлено, что в крови крыс, находившихся на высококалорийной диете, содержание холестерина, триглицеридов и ЛПНП статистически достоверно повышаются на 33%, 62% и 57,7%, соответственно, а содержание ЛПВП статистически достоверно снижается на 40,6% по сравнению с контрольными показателями. Коэффициент атерогенности повышается на 171%, т. е. на фоне высококалорийной диеты в организме крыс нарушается липидный обмен и развивается дислипидемия (диаграмма №6).

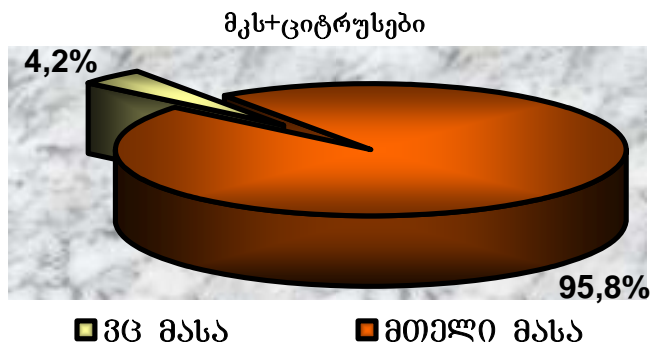
Диаграмма №5.

Воздействие цитрусового экстракта на массу висцерального жира крыс (г)

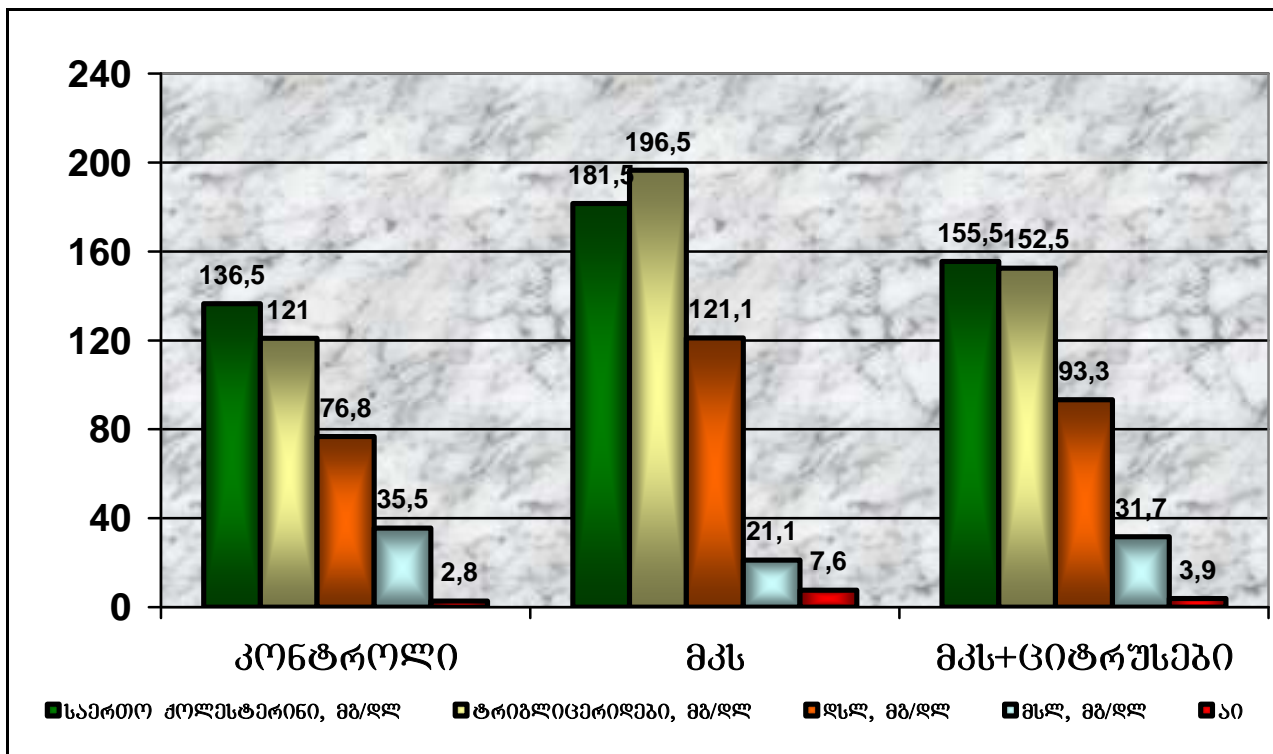


■ ვიზ მასა

■ მთელი მასა



დიაგრამა №6



В норме при избыточном поступлении жирных кислот в тканях активируются ферменты окислительного фосфорилирования, а неостребованная энергия с помощью разобщающих белков термогенинов (Uncoupling proteins - UCP) выделяется в виде тепла, т.е. включается т.н. компенсаторная окислительная система. Эту систему активирует PPAR γ (Peroxisom proliferators activator reseptory), который увеличивает экспрессию соответствующих ферментов. Эта компенсаторная система регулируется лептином. В условиях лептинрезистентности не происходит компенсаторного увеличения окисления свободных жирных кислот, усиливается синтез триглицеридов и активируется неокислительный путь метаболизма (перекисное окисление липидов и накопление керамидов). Куммуляция неокисленных метаболитов и керамидов вызывает липотоксические нарушения и, следовательно, способствует гиперлипидемии, инсулинорезистентности, кардиомиопатии и др

В условиях избытка свободных жирных кислот меняется активность липопротеидлипазы и печеночной липазы. В печени усиливается синтез триглицеридов, ЛПОНП, аполипопротеида В и развивается атерогенная дислипидемия.

На фоне высококалорийной диеты в жировой ткани активируются процессы липогенеза и липолиза. Субстратами для биосинтеза триглицеридов являются ацил СоА и активный глицерол - глицерол-3 фосфат. Ацил СоА активируется ферментом ацил СоА синтетаза. Что касается глицеролкиназы, жировая ткань данный фермент не содержит, поэтому источником глицерол-3 фосфата для биосинтеза триглицеридов является глюкоза. Богатая углеводами пища способствует интенсификации гликолиза. В жировой ткани активируются протеинкиназа С и NADPH, имеет место интенсивная продукция свободных радикалов (д. ჯოჯოხეთი. სამედიცინო ზოგადობა. 1996).. В физиологических условиях свободные жирные кислоты подвергаются митохондриальной β -оксидации, но при ожирении они превращаются в источники выработки реактивных соединений кислорода (Reddy J.K., Mannaerts G.P., 2004) и в дальнейшем способствуют повреждению клеток (Day C.P., 2002, Koteish A., Diebl A.M., 2001). Известно, что в избыточном количестве свободные жирные кислоты ингибируют транслокатор нуклеотида аденозина, ANT и, таким образом, способствуют уменьшению содержания АДФ в митохондриях. Снижение уровня АДФ, в свою очередь, приводит к замедлению электронного транспорта в митохондриальной электронно-транспортной цепи, что в дальнейшем может перерасти в нарушение электронно-транспортного комплекса в митохондриях. Замедление или расстройство электронного транспорта в митохондриальной респираторной цепи способствует утечке электронов и усиленному образованию реактивных форм кислорода (супероксид радикалов и перекиси водорода) (Hesley K., et al., 2000. Bergamini C.M., et al., 2004). Кроме того, аккумуляция жирных кислот в цитозоле вызывает пероксисомальную β -оксидацию жирных кислот, вследствие чего путем прямого переноса электронов на молекулярный кислород формируются гидропероксиды.

Избыток адипозной ткани при ожирении служит не только источником жирных кислот, но и продуцирует факторы (иммунологические, эндокринные, метаболические), участвующие в регуляции физиологических процессов, в том числе липидного и углеводного метаболизма, гомеостаза, кровяного давления, ангиогенеза и др. (адипонектин, лептин, резистин, транспортный белок холестерина эфиров и аполипопротеин Е, PAI-1 – plasminogen activator inhibitor 1, ангиотензиноген, VEGF – vascular endothelial growth factor и др.). (Boss O., Bergenheim N., 2006; Kahn B.B., Fkier J.S., 2000).

При ожирении нарушается метаболическая, иммунная и эндокринная функции адипозной ткани, что приводит к высвобождению жирных кислот, гормонов и провоспалительных молекул, и вызывает развитие вялотекущего воспаления в жировой ткани. Дисрегуляция продукции адипокинов и других сигнальных систем играет важную роль в развитии

ожирения, и связанных с ним, метаболических расстройств и патологических процессов. Например, в последнее время обсуждается новая теория патогенеза артериальной гипертензии при ожирении, связанная с гиперлептинемией. Уровень лептина тесно коррелирует с индексом массы тела (ИМТ), уровнем АД, ангиотензина и норадреналина. Лептин регулирует чувство насыщения на уровне дугообразного ядра гипоталамуса, от которого к паравентрикулярному ядру тянется богатая сеть аксонов. Стимуляция паравентрикулярного ядра приводит к активации симпатических нервов и повышению катехоламинов в плазме. Исследования выявили, что у лиц, страдавших ожирением, уровень артериального давления, концентрация лептина, инсулина и норадреналина оказались выше, чем у гипертоников с нормальной массой тела (Дедов И.И. 2004).

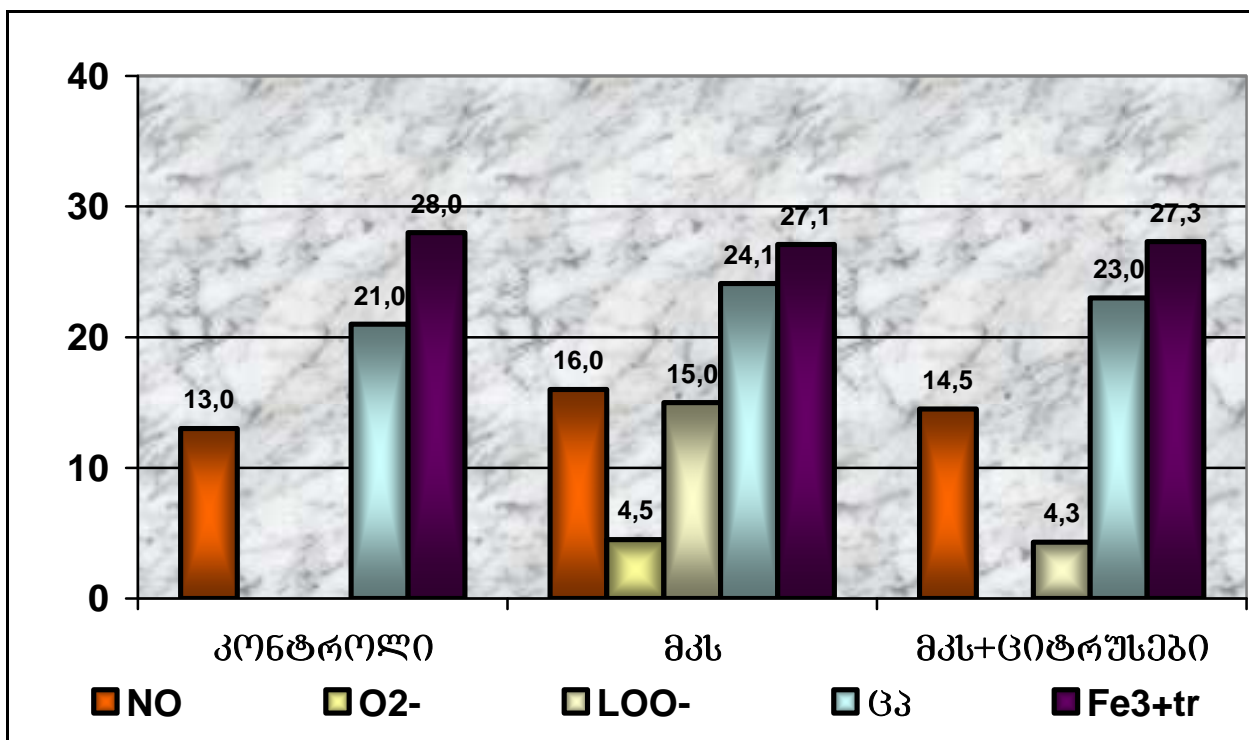
Существует мнение, что молекулярные механизмы экспрессии адипокинов в жировой ткани связаны с развитием окислительного стресса, характерного для аккумуляции жира в адипозной ткани. Можно сказать, что оксидативный стресс, развившегося на фоне дислипидемии как непосредственно, так и путем дисрегуляции выработки адипокинов и провоспалительных цитокинов участвует в развитии ожирения и ассоциированных с ним патологий. Адипоциты характеризуются высокой чувствительностью к окислительному стрессу. Было показано, что даже кратковременный оксидативный стресс уменьшает экспрессию мРНК адипонектина, лептина и резистина, и повышает экспрессию мРНК PAI-1 (Kamigaki M., et al., 2006, Soares A.F., et al., 2005).

Учитывая значительную роль оксидативного стресса в патогенезе ожирения, мы изучили интенсивность окислительного метаболизма в модели ДИ ожирения.

Согласно полученным данным, в крови животных, находившихся на высококалорийной диете, имеется интенсификация окислительных процессов, что проявляется в накоплении супероксид радикалов (O_2^-) и липопероксидов (LOO \cdot) (диаграмма №8).

Воздействие цитрусового экстракта на интенсивность парамагнитных центров крови крыс

Диаграмма №8



Интенсификация пероксидации липидов приводит к изменению активности антиоксидантной защитной системы, о чем в нашем исследовании свидетельствует статистически достоверное снижение активности СОД, компенсаторное повышение каталазы и церулоплазмينا в крови. Эти данные находятся в соответствии с данными литературы об изменении содержания антиоксидантов в крови (Cazzola R., 2004) и нарушении баланса между про- и антиоксидантной системами при ожирении (Robertson G., et al., 2001).

Нарушение баланса между про- и антиоксидантной системами в организме способствует оксидативному повреждению клеточных мембран (Cazzola R., et al., 2004), перекисному окислению мембранных фосфолипидов. Последнее наряду с дислипидемией участвует в развитии патологий, ассоциированных с ожирением (Hayden M.R., 2002, Cazzola R., et al., 2004). По данным некоторых исследований, окислительная модификация липидов способствует накоплению липопротеидов (ЛП), аккумуляции эфиров холестерина в макрофагах. Нарушается функция эндотелиальных клеток и тромбоцитов. Следовательно, модификация ЛП приводит к накоплению атерогенных липидов в артериальной стенке и способствует активности атерогенеза (Белова Л.А. 1998).

Furukava S. и его соавторы (2004) показали, что в развитии системного оксидативного стресса при ожирении важная роль отводится также нарушению окислительного метаболизма в аккумулярованном жире (адипоцитах) (Furukava S., et al., 2004). На основании проведенных исследований было установлено, что на фоне высококалорийной диеты в висцеральном жире повышается интенсивность процессов пероксидации, что подтверждается появлением интенсивных ЭПР сигналов липопероксидов (LOO[•]) и Mn²⁺-содержащих комплексов в ЭПР спектре висцерального жира (Таблица №13).

Таблица №13

Воздействие цитрусового экстракта на интенсивность парамагнитных центров висцерального жира крыс

	n	LOO ⁻	Mn ²⁺ g=2,14	FeS g=1,94	Св. р. g=2.00	
					I	ΔН
Контроль 1	6	-	-	6,0±0,8	5,0±0,4	11,0±0,5
ВКП 2	6	4,3±0,9	1,3±0,3	8.7±0,6 p ₁ <0,01	7,0±0,5 p ₁ <0,01	9,5±0,5 p ₁ <0,01
ВКП+цитрусы 3	6	2,3±0,9 P ₂₃ <0,001	-	6,2±0,7 p ₁ >0,1 p ₂ <0,01	6,0±0,7 p ₁ >0,1 p ₂ >0,1	10,7±0,5 p ₁ >0,1 p ₂ <0,01

На экспериментальной животной модели ожирения было установлено, что усиленная продукция реактивных соединений кислорода в аккумулированном жире должна быть обусловлена активацией в адипоцитах протеинкиназы С и NADPH-оксидазы и изменением экспрессии мРНК и активности антиоксидантных ферментов (Furukava S., et al., 2004, Talior I., et al., 2005, Inoguchi T., et al., 2000).

Одной из причин окислительного стресса при ожирении служит гипоксия разросшей жировой ткани. Развитие гипоксии связано, в свою очередь, с уменьшением разреза кровеносных сосудов на единицу массы адипозной ткани.

При ожирении некроз и апоптоз адипоцитов носят активный характер. В условиях интенсификации некроза наблюдается усиленная инфильтрация адипозной ткани макрофагами, что обнаруживается в гистологических исследованиях увеличением числа макрофагов в срезах эпидидимального жира. Усиленная инфильтрация жировой ткани макрофагами (Cinti S., et al., 2005) становится дополнительным источником цитокинов и реактивных соединений кислорода (Weisberg S.P., 2003, Xu H., 2003). Интенсивное образование высокорективных кислородных соединений в активированных макрофагах вызвано повышением в последних экспрессии и активности NADPH-оксидазы (Shiose A., et al., 2001, Suh Y.A., et al., 1999, Weisberg S.P. et al., 2003, Xu H., et al., 2003).

Важнейшим источником реактивных форм кислорода является митохондриальная дыхательная цепь. Усиленное образование реактивных соединений кислорода в митохондриях может быть обусловлено ингибирующим действием избыточных жирных кислот на митохондриальное дыхание в адипозной ткани (Lee CH, Evans RM, Olson P, et al. 2003). В результате нашего исследования было установлено, что в ЭПР спектре висцерального жира крыс, находившихся на высококалорийной диете, резко повышается содержание семиубихинонов электронного транспорта митохондриальной дыхательной цепи, что проявляется в повышении интенсивности соответствующего свободнорадикального ЭПР сигнала и уменьшении его полуширины (ΔН). Повышается также интенсивность ЭПР сигнала FeS центров NADH-дегидрогеназы. Эти данные свидетельствуют о нарушении электронного транспорта на участке NADH-убисемихинон-оксидоредуктазы в митохондриальной дыхательной цепи.

Участок NADH-убисемихинон-оксидоредуктазы является крайне чувствительным звеном митохондриальной дыхательной цепи. Нарушение его работы имеет место в условиях развития различных патологических процессов. Повреждение данного участка возможно под воздействием провоспалительных факторов (фосфолипазы A₂, жирных кислот и др.).

Ожирение является риск-фактором неалкогольного стеатоза или стеатогепатита (НАСГ). Существующая модель патогенеза НАСГ – теория “двух толчков” – объединяет известные факторы риска стеатогепатита. При

нарастании ожирения увеличивается поступление в печень свободных жирных кислот (СЖК) и развивается стеатоз печени – теория “первичного толчка”. Во время этого процесса происходят реакции окисления СЖК и образуются продукты перекисного окисления липидов и реактивные формы кислорода – оксидативный стресс - теория “второго толчка”. Теория “второго толчка” частично объясняет патогенез развития стеатогепатита. (Степанов Ю. М. и др. 2003)

Как известно, при участии аминотрансфераз в организме осуществляются процессы переаминирования. Аспаратаминотрансфераза (AST) катализирует переаминирование аспартата с α -кетоглутаратом с образованием оксалоацетата и глутамата. Аланинаминотрансфераза (ALT) катализирует перенос аминокрупп аланина на α -кетоглутарат с образованием пирувата и глутамата.

Как выше было отмечено, СЖК ингибируют транспортировку аденозиндифосфата (АДР) в митохондриях и, соответственно, замедляют работу митохондриальной электронно-транспортной цепи. Это вызывает снижение потребления субстратов клеточного дыхания (аминокислот цикла лимонной кислоты и жирных кислот). Снижение потребления аминокислот (глутамат, оксалоацетат, пируват) обуславливает накопление и выход трансаминаз AST и ALT в сосудистое русло на начальных стадиях ожирения, что проявляется повышением уровня аминотрансфераз в крови.

На основании проведенных исследований было установлено статистически достоверное повышение аминотрансфераз в крови крыс в пределах нормы. Следовательно, на ранних стадиях ожирения в печени возможно снижение интенсивности процессов энергогенеза в митохондриях.

В литературе существуют многочисленные данные о важной роли NO в метаболизме адипозной ткани. NO участвует в адипогенезе, липолизе, обмене глюкозы. В преадипоцитах и адипоцитах экспрессируются гены эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS), но не кодируется нейрональная NOS (nNOS), (Nisoli, E., C. Tonello, et al 1997; Elizalde, M., M. Ryden, et al 2000. Ryden, M., M. Elizalde, et al 2001).

In vitro NO стимулирует экспрессию двух адипогенных генов UCP (Uncoupling proteins) и PPAR γ (Peroxisom proliferators activator receptor γ) (Kapur, S., et al 1999; Andersson, K., N. Gaudiot, et al 1999; Ribiere, C., A. M. Jaubert, et al 1996; Nisoli, E., E. Clementi, et al 1998; Yan, H., E. Aziz, et al 2002). Аккумуляцию липидов и активность липогенных энзимов индуцирует iNOS. Синтез NO разными NOS формами определяет разнообразные процессы при ожирении. Например, если eNOS усиливает чувствительность тканей к инсулину, то iNOS участвует в развитии инсулинорезистентности. С одной стороны, NO способствует инсулинзависимой утилизации глюкозы в белой жировой ткани и увеличивает липидное депо, с другой стороны, ингибирует базальный и катехоламинстимулированный липолиз, контролирует лептининдуцированный липолиз (Roy, D., et al 1998. Gaudiot, N., A. M. Jaubert, et al 1998. Klatt, P., J. Cacho, et al 2000). **Экспозиция аргинина (донор NO)** способствует усилению липолиза, интенсификации окисления глюкозы в абдоминальной и эпидидимальной жировой тканях (Fu W.J., et al., 2005). Исходя из этих данных, NO функционирует в виде важнейшего аутокринного физиологического регуляторного сигнала, в локальной среде выявляется его контролирующая роль на липолиз или на липогенез.

На начальном этапе ожирения увеличивается выработка NO индуцибельным NOS. В адипоцитах экспрессия гена NOS усиливается под действием разных цитокинов. Избыточное NO уменьшает инсулинзависимый вход глюкозы в клетки, вызывает клеточный стресс, участвует в деструкции β -клеток. NO соединяется с супероксидрадикалом с образованием

пероксинитрита. Пероксинитрит характеризуется высокой цитотоксичностью и вызывает повреждение белков, липидов и ДНК

В результате наших исследований было установлено, что на фоне высококалорийной диеты в ЭПР спектре крови и висцерального жира крыс интенсивность ЭПР сигнала свободного оксида азота **статистически достоверное** увеличивается на 23% и 29%, соответственно, по сравнению с контрольными показателями (диаграмма №8, таблица №14). При высококалорийной диете увеличение содержания оксида азота в крови и висцеральной ткани может быть обусловлено избыточной выработкой индуцибельной NO. **(Воздействие цитрусового экстракта на изменение содержания NO в висцеральном жире крыс. Динамика NO в висцеральном жире крыс)**

ცხრილი 114.

ციტრუსების ექსტრაქტის ზემოქმედება მაღალკალორიულ დიეტაზე მყოფი ვირთაგვების ვისცერულ ცხიმში NO-ს შემცველობის ცვლილებებზე

	NO g=2,01
კონტროლი 1	8,5±0,9
მკს 2	12±1,2 p ₁₂ <0,001
მკს+ციტრუსები 3	10,3±1,0 p ₁₃ <0,001 p ₂₃ <0,001

По данными разных авторов, интенсификация оксидативного стресса в адипозной ткани при ожирении способствует нарушению NO-сигнала и развитию хронического воспаления (Kemigaki M, et al. 2006).

Как отмечено выше, ожирение рассматривается как воспалительный процесс умеренной интенсивности (Dandona P, Aljada A, Bandyadhyay A.. 2004;. Grimble RF. 2002; Black P. 2003;.). Многочисленные исследования свидетельствуют о наличии связи между ожирением и активностью иммунной системы. Например, расстройство специфического иммунитета (уменьшение количества лимфоцитов в селезенке, тимусе, и периферической крови) выявлено у ob/ob и db/db мышей и Zucker крыс (Marti A, Marcos A, et al. 2001). Отмечается также нарушение врожденного иммунитета: в макрофагах крыс с генетическим ожирением снижается способность макрофагов элиминировать *Candida albicans* и продуцировать провоспалительные цитокины (Plotkin BJ, Paulson D, et al. 1996). В модели диетиндуцированного ожирения выявлены изменения клеточного и гуморального иммунитета (Lamas O, Martinez JA, Marti A. 2004; Mito N, Kitada C, et al. 2002). Адипозная ткань обладает способностью вырабатывать TNF-α (Pedersen M, Bruunsgaard H, et al. 2003). В генетической модели ожирения и при алиментарном ожирении в крови крыс имеется повышение уровня TNF-α (Ikeda A, Chang Kt, et al. 1998). Исследования, проведенные на людях свидетельствуют о снижении выработки провоспалительных маркеров (TNF-α, IL-6) параллельно с уменьшением массы тела (Hukshorn CJ, Lindeman JH, et al. 2004).

Важнейшими компонентами врожденного клеточного иммунитета являются моноциты и макрофаги. Как уже отмечалось, при ожирении макрофагам отводится значительная роль в развитии воспалительного процесса в жировой ткани (Wellen EW, Hotamisligil GS., 2003.). Тем не менее, непосредственная роль макрофагов и моноцитов в развитии ожирения до настоящего времени неизвестна. Интерес представляет вопрос о том, обусловлены ли функциональные изменения в адипозной ткани изменениями свойств моноцитов или

являются следствием взаимодействия макрофагов с локальной микросредой адипозной ткани. Если функциональная модификация моноцитов представляет собой результат вызванного ожирением нарушения метаболизма всего организма, то эта модификация должна проявиться и в условиях инкубации этих клеток в другой окружающей среде.

В результате проведенных исследований нам удалось установить, что в мононуклеарных клетках периферической крови (ВМС) крыс в условиях высококалорийной диеты, базальная выработка оксида азота статистически достоверно не меняется по сравнению с показателями контрольных животных; однако, интенсивность продукции супероксид радикалов превосходит таковую у контрольных животных.

На фоне стимуляции с помощью LPS интенсивность образования оксида азота и супероксид радикалов в мононуклеарных клетках периферической крови резко возрастает в обеих группах животных.

Наши исследования показали, что высококалорийная диета не оказывает значительного воздействия на продукцию мононуклеарными клетками периферической крови оксида азота, хотя вызывает интенсификацию выработки супероксид радикалов, что может быть обусловлено повышением активности NADPH-оксидазы в этих клетках.

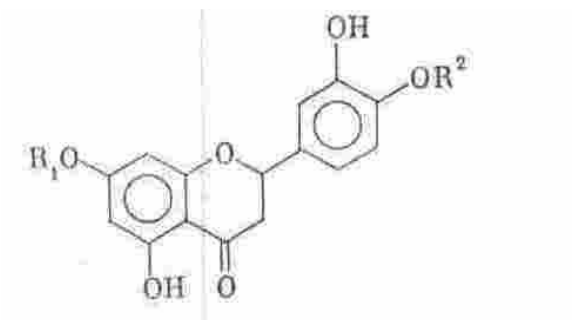
На основании результатов нашего исследования можно заключить, что мононуклеарные клетки периферической крови крыс, находившихся на высококалорийной диете, частично сохраняют функциональную активность на физиологическом уровне. Интенсификация окислительного стресса в адипозной ткани при ожирении может быть обусловлена трансформацией моноцитов в макрофаги в жировой ткани и генерированием свободных радикалов кислорода.

Коррекция дислипидемии, окислительного стресса, развивающегося при ожирении, представляет собой весьма перспективное направление лечения ожирения.

После начала инъекций экстракта цитрусов интенсивность увеличения веса у крыс, находившихся до этого на высококалорийной диете в течение 3 недель, снижалась на 29,6% по сравнению с соответствующим показателем и после завершения 4 недельного курса высококалорийной диеты и экстракта цитрусов составляла 88% от соответствующего показателя группы «высококалорийная пища». Из этого можно заключить, что в условиях

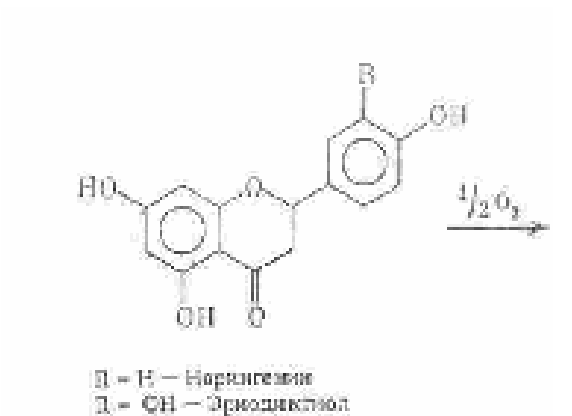
употребления высококалорийной пищи экстракт цитрусов способствовал снижению интенсивности увеличения веса животных. Как обнаружилось в результатах нашего исследования, инъекции экстракта цитрусов не оказывали действия на количество потребляемой пищи, но приводили к **статистически достоверному** снижению потребляемой воды на 20%. Вместе с тем, на фоне экстракта цитрусов уменьшалась масса аккумулированного висцерального жира.

Установлено, что под воздействием цитрусового экстракта в крови крыс, находившихся на высококалорийной диете уровень холестерина, триглицеридов и ЛПНП в крови **статистически достоверно** снижается на 14,3%, 22,4% и 50% соответственно, а уровень ЛПВП повышается на 50,2%, т. е. очевидно, что экстракт цитрусов обладает способностью коррегировать липидный обмен. Эти результаты коррелируют с литературными данными о способности экстракта цитрусов модулировать липидный обмен.



гесперидин

Экстракт цитрусов содержит флавоноиды, витамины (в большом количестве витамин С), минералы и др. Особо высокой биологической активностью из этих компонентов обладают флавоноиды. Главной составной частью флавоноидов является гесперидин. В малом количестве экстракт цитрусов содержит нарингенин, диосмин.



нарингенин

Флавоноиды обладают способностью коррегировать липидный обмен несколькими путями:

- флавоноиды цитрусов способны ингибировать эстерификацию и биосинтез холестерина (Borradaile N.M., Carroll K.K., Kurowska E.M. 1999) посредством ингибирования

участвующих в этом процессе 3-гидрокси-3-метил-глутарил –CoA (HMG-CoA) редуктазы и ацил CoA: холестерол О ацилтрансферазы (ACAT) (Kim H.J., Oh G.T., Park Y.B., Lee M.K., Seo H.J., Choi M.S. 2004, Lee M.K., Moon S.S., Lee S.E., Bok S.H., Jeong T.S., Park Y.B., Choi M.S. 2003; Lee S.H., Park Y.B., Bae K.H., Bok S.H., Kwon Y.K., Lee E.S., Choi M.S. 1999);

- уменьшают активность микросомальной фосфатидат дегидролазы в печени, способствуя этим снижению уровня триглицеридов в крови (Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. 2004; Park Y.B., Do K.M., Bok S.H., Lee M.K., Jeong T.S., Choi M.S. 2001)

- в 5-6 раз увеличивают экспрессию рецепторов LDL, способствуя этим их утилизации и деградации (Wilcox LJ, et al.2002).

- гесперидин и нарингенин уменьшают способность липидов связываться с апо В за счет уменьшения активности ACAT и микросомального транспортного белка (MTP) (Wilcox LJ, et al.2002).

Нормализация липидного обмена снижает повреждающее воздействие свободных жирных кислот на работу митохондриальной электронно-транспортной цепи и способствует восстановлению энергетического обмена и уменьшению оксидативного стресса.

Цитрусовые флавоноиды действуют как сквенджерс свободных радикалов кислорода и значительно уменьшают их содержание в крови (Lonchamp M, Guardiola B, et al. 1989). (Известно, что антиоксидантная активность флавоноидов в несколько раз превышает активность таких известных витаминов-антиоксидантов, какими являются витамины С, Е)

В результате наших исследований было установлено, что на фоне экстракта цитрусовых в крови и висцеральном жире крыс уменьшалось содержание супероксидрадикалов и липопероксидов, что указывало на уменьшение интенсивности свободнорадикального окисления.

В условиях применения цитрусового экстракта интенсификация расходования свободных жирных кислот в процессе энергетического обмена приводит к ограничению цитотоксичности этих соединений, что, в первую очередь, способствует восстановлению работы митохондриальной дыхательной цепи адипоцитов, вызывает интенсификацию потребления энергетических субстратов (аминокислот и жирных кислот), усиление энергетического обмена и проявляется в нормализации параметров интенсивности митохондриального дыхания в ЭПР спектре висцерального жира. Соответственно увеличивается интенсивность трансаминирования аминокислот. В крови снижается уровень трансаминаз, также снижается формирование реактивных соединений кислорода и липидов.

Флавоноиды обладают способностью регулировать содержание оксида азота. По данным Olszanecki R et al. гесперидин уменьшает экспрессию гена iNOS и, следовательно, выработку индуцибельного NO. С другой стороны, он увеличивает содержание и активность eNOS. Становится ясно, что гесперидин обладает модулирующим действием на выработку NO. Нарингенин уменьшает продукцию iNOS путем ингибирования NF-κB.

На фоне инъекции экстракта цитрусовых в ЭПР спектре крови и висцерального жира интенсивность ЭПР сигнала NO **статистически достоверно** уменьшается на 9,3% и 14% по сравнению группой “высококалорийная пища”.

Следует заметить, что экстракт цитрусовых не оказывал ощутимого эффекта на LPS-индуцированную продукцию оксида азота и супероксид радикалов *in vitro* инкубированными моноцитами.

Следовательно, фармакологический эффект экстракта цитрусовых должен быть обусловлен регулирующим действием этого препарата на липидный обмен, окислительный метаболизм и содержание оксида азота. Экстракт цитрусовых способствует восстановлению функционирования митохондрий в адипозной ткани и снижению оксидативного стресса, способствует сохранению уровня NO, что соответственно литературным данным, может

способствовать регуляции синтеза адипозных гормонов и восстановлению функционирования их сигнальных систем.

ВЫВОДЫ:

1. В диетиндуцированной модели ожирения масса крыс возрастает в основном за счет депонирования висцерального жира. Прибавление массы происходит за счет увеличения принятой пищи, и, следовательно, куммуляции энергии.
2. На фоне потребления высококалорийной пищи нарушается липидный обмен, что проявляется увеличением общего холестерина, триглицеридов, LDL и уменьшением HDL.
3. На фоне потребления высококалорийной пищи **в крови крыс** отмечается интенсификация свободнорадикальных окислительных процессов (кумуляция супероксидрадикалов (O_2^-) и липопероксидов (LOO^\cdot) и нарушение активности ферментов антиоксидантной защиты (уменьшение активности СОД, активация церулоплазмينا и каталазы).
4. Одной из причин интенсификации оксидативного стресса в адипозной ткани при диетиндуцированном ожирении служит нарушение работы митохондриальной дыхательной цепи (на участке NADH-убихинон-оксидоредуктазы) и накопление убисемихинонов под воздействием избыточных жирных кислот.
5. Высококалорийная диета вызывает увеличение содержания свободного оксида азота в крови и висцеральном жире экспериментальных животных.
6. На фоне высококалорийной диеты не меняется базальная и LPS-индуцированная продукция реактивных соединений азота, в то же время увеличивается базальная продукция супероксидрадикалов мононуклеарными клетками периферической крови.
7. Корректирующее действие экстракта цитрусов на липидный, окислительный метаболизм и содержание оксида азота обеспечивает нормализацию митохондриального дыхания, окислительного метаболизма, NO-опосредованной регуляторной системы, что приводит к снижению системного оксидативного стресса в организме и проявляется в восстановлении баланса между про- и антиоксидантными системами.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. T. Chanadiri, M.Sikharulidze, M. Esaiashvili, I. Chkhivshvili, N. Tkhilava, E. Ekaladze, M. Machavariani. Effect of plant preparations on the intensity of weight gaining and lipid metabolism parameters during experimental alimentary obesity. Tbilisi. State Medical University. Annals of Biomedical Research and Education. Volume 5, Issue 1, January-March 2005, pp. 14 -16.
2. М. Сихарулидзе, Н. Джанашия, М. Эсаиашвили, И. Чхиквишвили. Эффективность цитрусового экстракта при коррекции алиментарного ожирения в эксперименте. საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე. ბიოლოგიის სერია A. 2005 №6. ტომი 31. გვ. 883-888
3. М. Д. Сихарулидзе, И. Д. Ниорадзе, Н. Г. Тхилава, Т. В. Саникидзе, И.Д. Чхиквишвили. Корректирующее воздействие цитрусового экстракта на метаболизм печени при ожирении. ექსპერიმენტული და კლინიკური მედიცინა. N2 2006 გვ.55.-59
4. სიხარულიძე მ, ესაიაშვილი მ, გოგეშვილი ს. სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროანთეზიტი პასუხის მოდულაციის უნარი დიეტ-ინდუცირებული ექსპერიმენტული სიმსუქნის დროს. ექსპერიმენტული და კლინიკური მედიცინა. N4 2006 გვ. 49-51
5. Сихарулидзе М.Д, Джанашия Н.Г, Саникидзе Т.В, Гогешвили С.Г. Роль окислительного стресса в патогенезе ожирения. Georgian medical news. No.6 (135), Июнь 2006, стр. 123-126.