

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Российской Федерации
«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»
«Ордена Трудового Красного Знамени Медицинский институт
имени С. И. Георгиевского»

Научно-исследовательская работа на тему:
**«ИССЛЕДОВАНИЕ IN VIVO ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
КОНЦЕНТРАТОВ ИЗ ВИНОГРАДНОГО СЫРЬЯ С НОРМИРУЕМЫМ
КОЛИЧЕСТВОМ ПОЛИФЕНОЛОВ»**

по специальности 14.03.03 – патологическая физиология

Исполнитель:
студент 6 курса
1 медицинского факультета
Радковский Владислав Алексеевич

Симферополь, 2023

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

- АГ – артериальная гипертензия
- АОА – суммарная концентрация водорастворимых антиоксидантов
- БКЛВ – концентрат полифенолов лозы винограда безалкогольный пищевой
- БКЛВ-2 – безалкогольный концентрат полифенолов лозы винограда с высоким содержанием транс-ресвератрола
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- НИР – научно-исследовательская работа
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ОП – опытный образец
- ССФВ – суммарное содержание фенольных веществ
- СТО – стандарт организации
- ФИБХ – Федеральный институт биоорганической химии
- ЭВВ – спиртосодержащий пищевой концентрированный экстракт виноградной выжимки

РЕФЕРАТ

ВИНОГРАДНАЯ ВЫЖИМКА, ЛОЗА ВИНОГРАДА, ЭКСТРАКТ,
КОНЦЕНТРАТ,
ПОЛИФЕНОЛЫ, ГИПЕРТОНИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ, АРТЕРИАЛЬНАЯ
ГИПЕРТЕНЗИЯ

Объектами исследований явились экспериментальные образцы продукции ФГБУН «ВНИИВиВ «Магarach» РАН»: спиртосодержащий пищевой концентрированный экстракт виноградной выжимки (ЭВВ); безалкогольный пищевой концентрат полифенолов лозы винограда (БКЛВ).

Целью данной работы явилось проведение экспериментальных исследований антиоксидантных и функциональных свойств *in vivo* продукции из виноградного сырья (выжимка, лоза) с нормируемым количеством полифенолов, разработанной в институте «Магarach».

Методы проведения исследований: при выполнении НИР использованы методы колориметрии, спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), соматометрические, биохимические, морфометрические методы, используемые в медицине. Статистическая обработка выполнялась с помощью программы Statistica 10.0.

Моделирование артериальной гипертензии осуществлялось оперативно, путем введения 0,1 мл 4% параформальдегида в верхний полюс обеих почек.

Экспериментально смоделирована и подтверждена артериальная гипертензия, при которой артериальное давление составляло $193 \pm 20,3$ мм.рт.ст. Морфологическим подтверждением являлась степень поражения почечной паренхимы, выраженный нефросклероз, увеличение комплекса интима-медия грудной аорты, гипертрофия миокарда, изменение соотношения коркового и мозгового вещества надпочечников. Сохранение биохимических показателей липидного профиля и почечных маркеров свидетельствовало о чистоте модели и отсутствии метаболического компонента.

Применение экспериментальных образцов показало значимое снижение артериального давления на 21 мм. рт. ст. (10,7 %) ($p < 0,000$) при коррекции БКЛВ и на 36 мм. рт. ст. (17,3 %) ($p < 0,005$) при коррекции ЭВВ. Статистически значимы оказались морфологические изменения органов-мишеней. Так, наблюдалось меньшее увеличение комплекса интима-медия грудной аорты крыс, получавших концентраты в сравнении с группой без коррекции; значимо меньшая гипертрофия миокарда, отражающаяся в диаметре кардиомиоцитов; значимо большее увеличение относительной площади коркового слоя надпочечников при отсутствии коррекции полифенолами. Воздействие экспериментальными образцами оказало эффективное качественное влияние на состояние сердечно-сосудистой системе, отражающееся на стенке сосудов, наличие и масштабы периваскулярных отеков в сердце, сердечный индекс (соотношение массы сердца к массе крысы, мг/г), состояние и степень повреждения клубочков почки.

Спектрофотометрический анализ показал, что коррекция полифенольными концентратами достоверно снижает уровень эндотелина-1 в крови, что характеризует крайне положительное протективное воздействие на эндотелий и сохранение его функциональной активности.

Таким образом, проведенные исследования действий полифенолов доказали достоверность экспериментальной модели артериальной гипертензии, эффективность экспериментальных препаратов ЭВВ и БКЛВ, оказывающих значимое гипотоническое, антиоксидантное, цито- и гистопротекторное действие на ряд органов-мишеней.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
1 Объекты и методы исследований.....	10
1.1 Физико-химические методы исследования.....	11
1.2 Методы исследования <i>in vivo</i>	13
2 Экспериментальная оценка эффективности цито- и гистопротективного действия полифенольных концентратов при коррекции артериальной гипертензии.....	16
Заключение	29
Список использованных источников.....	30

ВВЕДЕНИЕ

В 2023 году проводилась научно-исследовательская работа, направленная на проведение экспериментальных исследований антиоксидантных и функциональных свойств *in vivo* продукции из виноградного сырья (выжимка, лоза) с нормируемым количеством полифенолов, разработанной в институте «Магарач» в период 2019-2021 гг.:

- спиртосодержащий пищевой экстракт виноградной выжимки, содержащий не менее 20,0 г/дм³ полифенолов;
- безалкогольный пищевой концентрат полифенолов из лозы винограда с общим содержанием полифенолов 9,8 г/дм³

Данные препараты на текущий момент не имеют аналогов по усваиваемости среди пищевых концентратов полифенолов лозы винограда, содержащих концентрацию стильбеновых веществ в разработанном экспериментальном образце.

Технология получения пищевого концентрата полифенолов из лозы винограда представлены в патенте на изобретение (RU) № 2748227 «Способ получения пищевого концентрата полифенолов винограда», дата приоритета 17.03.2020 [1].

Ранее уже было доказано, что концентраты полифенолов винограда обладают рядом функциональных свойств, обеспечивающих кардиопротективные свойства при ишемических болезнях сердца у крыс, оказывать значимое воздействие на течение системных обменных заболеваний, качественно влиять на биохимический состав крови, в частности на углеводный и липидный профиль [2-7]. Данными свойствами обусловлена актуальность дальнейшего проведения исследований представленных концентратов.

Основным направлением исследований по теме «Биологически активные продукты переработки винограда функциональной направленности для применения в энотерапии» являются наработка научной доказательной базы функциональных, антиоксидантных свойств инновационной продукции

функциональной направленности из виноградного сырья *in vivo*, в клинических условиях, для применения в энотерапии.

В связи с этим, целью НИР является оценка антиоксидантного действия экспериментальных образцов продукции с нормируемым количеством полифенолов (лоза, выжимка винограда) биохимическими методами, принятыми в фармации и медицине, в модельных экспериментах *in vivo*. Возникает необходимость в продолжении изучения антиоксидантных и функциональных свойств экспериментальных образцов продукции, разработанных ранее в институте «Магарач».

В связи с этим, целью данной работы явилось проведение экспериментальных исследований антиоксидантных и функциональных свойств *in vivo* продукции из виноградного сырья (выжимка, лоза) с нормируемым количеством полифенолов, разработанной в институте «Магарач»;

В задачи исследований входило:

- экспериментальное моделирование артериальной гипертензии путем химического повреждения паренхимы почек,
- экспериментальное инструментальное исследование эффективности модели артериальной гипертензии *in vivo*,
- морфологические, соматометрические, биохимические исследования для оценки уровня цито- и гистопротекторных свойств экспериментальных образцов продукции при коррекции экспериментальной артериальной гипертензии,

Обоснование необходимости проведения НИР. Проведение НИР необходимо для наработки экспериментальной доказательной базы функциональных, антиоксидантных свойств инновационной продукции из виноградного сырья *in vitro*, *in vivo* для применения в энотерапии.

Сведения о научно-техническом уровне (качестве) разработки. Работа выполнена на современном уровне, соответствует актуальным научным тенденциям развития НИР, направленным на расширение базовых знаний о

функциональной и биологической активности полифенольных пищевых продуктов из винограда.

Соответствие научно-технического результата приоритетным направлениям развития науки Российской Федерации. Результаты научно-исследовательской работы направлены на разработку технологий производства биологически активной пищевой продукции из винограда для здорового питания населения, обогащенной полифенолами – натуральными антиоксидантами, что согласуется с основными целями Стратегии повышения качества пищевой продукции РФ до 2030 года, утвержденной Распоряжением Правительства РФ от 29 июня 2016 № 1364-р, соответствует приоритетному развитию научных исследований в области здорового питания населения, в том числе для реабилитации и профилактики социально значимых заболеваний.

Актуальность исследований состоит в экспериментальной оценке безопасности и эффективности использования *in vivo* разработанных растительных пищевых продуктов, насыщенных функциональными ингредиентами- полифенолами винограда.

Научная новизна исследований состоит:

– в экспериментальной оценке свойств пищевого концентрата полифенолов лозы винограда на модели экспериментальной артериальной гипертензии у крыс с целью оценки уровня цито- и гистопротекторных свойств экспериментальных образцов;

Связь с другими научно-исследовательскими работами. Научно-исследовательская работа по заявленной теме является продолжением НИР, выполняемых в Институте за 2019–2021 гг., связанного с установлением критериев оценки биологической активности инновационных пищевых продуктов переработки винограда, насыщенных полифенолами, а также работ, направленных на исследование функциональной активности полифенольных концентратов на экспериментальной модели метаболического синдрома.

База проведения исследований. Исследования по теме проведены на базе Ордена Трудового Красного Знамени Медицинском институте имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», а также на базе лаборатории функциональных продуктов переработки винограда ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН», а также на базе лаборатории аналитических исследований, инновационных и ресурсосберегающих технологий на основании договора о научном сотрудничестве № 11/6-15/Б-49 от 18.05.2022 г.

1 Объекты и методы исследований

Объектами исследований являлись опытные образцы пищевых концентратов, разработанные в институте «Магарач» в 2019-2021 гг.:

- экстракт виноградной выжимки спиртосодержащий пищевой (ЭВВ),
- концентрат полифенолов лозы винограда безалкогольный пищевой (БКЛВ),

Физико-химические показатели образцов ЭВВ, БКЛВ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические показатели образцов ЭВВ, БКЛВ

Наименование показателя	Наименование образцов	
	ЭВВ	БКЛВ
Объемная доля этилового спирта, %	10,5	0,3
Относительная плотность при температуре 20 °С	1,101	1,1764
Массовая доля сухих веществ, %	23,9	15
Массовая концентрация титруемых кислот, г/дм ³	6,5	1,8
рН	3,75	3,95
Массовая концентрация фенольных веществ, г/дм ³ в том числе стильбеновых веществ	–	9,2 2,1

Экспериментальные исследования качественного и количественного состава полифенолов в спиртовых экстрактах выжимки и лозы винограда, в экспериментальных образцах продукции: спиртосодержащем пищевом концентрированном экстракте виноградной выжимки, безалкогольном пищевом концентрате полифенолов лозы винограда проводили методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent Technologies

(модель 1100) с диодно-матричным детектором; Концентрирование спиртовых экстрактов из виноградной выжимки и лозы винограда проводили на роторном испарителе Heidolph Laborata 4000 efficient отгонкой спирта под вакуумом при температуре 40-50 °С, остаточном давлении 0,1-0,2 атм. Массовую концентрацию фенольных веществ в экспериментальных образцах продукции определяли с использованием спектрофотометра UNICO модели 1200P, согласно Р 4.1.1672-2003 [8]. Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов определяли амперометрическим методом на приборе Цвет-Яуза-01АА в единицах концентрации стандартного антиоксиданта тролокс по ГОСТ Р 54037 [9].

1.1 Физико-химические методы исследования

Массовую концентрацию фенольных веществ в концентратах и экстрактах определяли колориметрическим методом согласно Р 4.1.1672-2003 [8]. Колориметрический метод определения фенольных веществ основан на том, что реактив Фолина-Чокальтеу при добавлении в исследуемый продукт окисляет фенольные группы, восстанавливаясь при этом в соединение голубого цвета, оптическую плотность которого определяют на фотоколориметре. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации фенольных веществ.

Порядок проведения контроля. Пипеткой вместимостью 1 см³ помещали 1 см³ исследуемого образца экстракта в мерную колбу вместимостью 100 см³ и доводили до метки дистиллированной водой при температуре (20±0,5) °С. В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещали 1 см³ исследуемого раствора. В каждую колбу добавляли 1 см³ реактива Фолина-Чокальтеу, мерной пипеткой вместимостью 10 см³ – раствор карбоната натрия. Доводили дистиллированной водой до метки при температуре (20±0,5) °С и перемешивали.

Через 30-40 мин измеряли оптическую плотность растворов в кювете 10 мм при длине волны 670 нм против контрольного раствора.

Массовую концентрацию фенольных веществ, C , мг/дм³, по галловой кислоте, определяли по градуировочному графику, используя для вычисления следующую формулу

$$C = K \cdot A \cdot ОП, \quad (1)$$

где K – коэффициент разбавления;

A – градуировочный коэффициент, мг/дм³;

ОП – оптическая плотность.

Построение градуировочной кривой проводили согласно [8] (раздел 9).

Вычисление проводили до первого десятичного знака после запятой. За окончательный результат принимали среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не превышало 33 мг/дм³ (для диапазона измерений 3000-20000 мг/дм³). Предел погрешности измерения массовой концентрации фенольных веществ при доверительной вероятности $P=0,95$ для диапазона измерения 3000-20000 мг/дм³ составлял ± 39 мг/дм³.

Качественный и количественный состав полифенолов суслы и экстрактов определяли методом ВЭЖХ, с использованием хроматографической системы Agilent technologies (модель 1100) с диодно-матричным детектором. Для разделения веществ применили хроматографическую колонку Zorbax SB-C18 размером 2,1×150 мм, заполненную силикагелем с привитой октадецилсилильной фазой с размером частиц сорбента 3,5 мкм. Хроматографирование проводили в градиентном режиме. Состав элюента: раствор А – метанол, раствор В – 0,6 %-ный водный раствор трифторуксусной кислоты. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Хроматограммы регистрировали при следующих длинах волн: 280 нм для галловой кислоты, (+)-D-катехина, (-)-эпикатехина и процианидинов; 313 нм для производных оксикоричных кислот; 306 нм для стильбенов и их производных; 371 нм для кверцетина; 525 нм для антоцианов. Расчет количественного содержания индивидуальных компонентов производили с

использованием калибровочных графиков зависимости площади пика от концентрации вещества, построенных по растворам индивидуальных веществ. В качестве стандартов использовали галловую кислоту, кофейную кислоту, (+)-D-катехин, кверцетин дигидрат, изокверцетин (Fluka Chemie AG, Швейцария), *транс*-ресвератрол, (-)-эпикатехин, сиреневую кислоту, *п*-кумаровую кислоту, кемпферол, феруловую кислоту (Sigma-Aldrich, Швейцария). Содержание кафтаровой кислоты 2-S-глутатионил кафтаровой кислоты – в пересчете на кофейную кислоту, коутаровой кислоты в пересчете на *п*-кумаровую кислоту, фертаровой кислоты в пересчете на феруловую кислоту, кверцетин-3-О-глюкуронида на изокверцитин, полимерных и олигомерных процианидинов производили в пересчете на (+)-D-катехин.

Биологическую активность суслу и спиртовых экстрактов выжимки, семян, гребней виноградной грозди оценивали по показателю суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов (АОА) в концентрации стандартного антиоксиданта тролокс амперометрически на приборе «Цвет-Яуза-01 АА», согласно ГОСТ Р 54037 [9].

Все определения проводили в трех повторностях. Результаты измерений обрабатывали стандартными методами математической статистики [10]. Воспроизводимость измерений – не менее 10 %. Сходимость – не менее 5 % при доверительной вероятности $P=0,95$. Различия значений величин считались достоверными при разнице не менее 5 %.

1.2 Методы исследования *in vivo*

Экспериментальные исследования воздействия полифенолов на экспериментальную модель артериальной гипертензии выполнены на 50 белых крысах линии Wistar категории SPF возрастом 6 месяцев, масса тела 180-280 г. В качестве модели артериальной гипертензии использовали способ моделирования ренопаренхиматозной артериальной гипертензии у крыс почек путем введения 0,1 мл 4% параформальдегида в верхний полюс обеих почек. Операция проводилась под легким эфирным наркозом. Игла погружалась на

глубину 0,7 см, вводимая по нижнему краю реберной дуги, в то время, как свободной рукой придерживалась хорошо пальпируемая и подвижная почка со стороны живота [11].

Длительность моделирования составила 6 недель. Для подтверждения развития артериальной гипертензии были произведены замеры артериального давления крыс непрямым методом с помощью системы неинвазивного измерения кровяного давления у небольших животных (Віорас NIBP200) до оперативного вмешательства, а также спустя 6 недель.

В ходе эксперимента были сформировано 4 группы животных:

- контроль - интактные животные (n=10);
- опытная группа - животные, с развившейся артериальной гипертензией, без коррекции (АГ, n=10);
- опытная группа - животные с развившейся артериальной гипертензией, с введением БКЛВ (АГ+БКЛВ, n=15);
- опытная группа - животные с развившейся артериальной гипертензией, с введением ЭВВ (АГ+ЭВВ, n=15).

Концентрат полифенолов лозы винограда безалкогольный пищевой (БКЛВ) использовался в рекомендуемой дозе в перерасчете на ресвератрол 0,9 мг/кг (FDA, Российский центр надзора за пищевыми продуктами), эквивалентно содержанию 2 мг/кг вместе с 0,5 мл воды. Концентрированный экстракт виноградной выжимки спиртосодержащий пищевой (ЭВВ) был использован в дозе 0,60 мг/кг вместе с 0,5 мл воды.

Препараты вводились в виде готового раствора с помощью желудочного зонда 1 раз в сутки. Группа животных с артериальной гипертензией (АГ) без коррекции получала аналогичным способом соответствующее количество дистиллированной воды. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, регламентированным Приказом Минздрава России №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации», этическим принципам, установленным Европейской конвенцией по защите

позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Эксперимент одобрен комитетом по этике ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» (протокол № 10 от 06 декабря 2022 г.).

Эвтаназию проводили по завершению эксперимента путем ингаляции 96 % диэтилового эфира с целью изучения структуры головного мозга и органов висцеральных систем.

В ходе эксперимента использовались следующие методы исследования, средства измерений и оборудование:

Соматометрические – взвешивание крыс до оперативного вмешательства, спустя 6 недель моделирования, спустя 16 недель получения препаратов; биохимические – рутинные методы определения мочевины, креатинина, общего холестерина, липопротеидов высокой и низкой плотности с использованием коммерчески доступных наборов (автоматический биохимический анализатор ERBA XL-180 производства «Erba Lachema», Чехия); методы общей морфологии: макроскопическое исследование органов (размеры, форма, цвет, срез) срезов почек, надпочечников, сердца, аорты, головного мозга экспериментальных крыс с помощью световой микроскопии при окраске гематоксилином и эозином с последующей морфометрией. Морфометрический подсчет выполнялся с помощью программы Aperio ImageScore с последующей статистической обработкой с помощью программы Statistica 10.0 (использовались параметрические (Т-критерий Стьюдента) и непараметрические критерии (W-критерий Вилкоксона для зависимых выборок, U-критерий Манна Уитни для независимых выборок). Данные считались статистически значимыми при значениях $p > 0,05$.

Контроль артериального давления осуществлялся до оперативного моделирования, спустя 6 недель для подтверждения возникновения стойкой артериальной гипертензии, а также спустя 16 недель после начала введения концентратов с помощью системы неинвазивного измерения кровяного давления у малых животных (Biopac NIBP200, «Biopac Systems, Inc.», США).

Манжета аппарата надевалась на основание хвоста крысы, предварительно помещенной в пенал в подогреваемом боксе. Измерение систолического давления производилось троекратно, с перерывом между измерениями в 5 минут. Запись и обработка данных проводилась на компьютере, с помощью программы «Acq Knowledge 4.2 for MP150».

Эндотелин-1 определялся методом иммуноферментного анализа с использованием реактивов Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Endothelin1 (EDN1), CLOUD-CLONE CORP (USA). В качестве антикоагулянта использовалась ЭДТА, пробирки с образцами центрифугировались в течение 15 минут с ускорением 1000g в течение 30 минут после их получения с использованием Biosan LMC-3000. Анализ образцов был основан на конкурентном методе ИФА. Конкурентная реакция происходит между Эндотелином-1, меченным биотином, немеченым Эндотелином-1 (в 7 образцах или контроле) и сорбированными антителами специфичными к Эндотелину-1. После инкубации несвязавшийся конъюгат удалялся отмывкой. Затем авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена добавлялся в каждую лунку планшета и проводилась инкубация. Количество связанного конъюгата пероксидазы хрена обратно пропорционально концентрации EDN1 в образце. После добавления ТМБ интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации EDN1 в образце. Образцы анализировались с помощью Multiscan FL (Thermoscientific, Finland), измерение спектра поглощения проводилось на длине волны 450 нм.

2 Экспериментальная оценка эффективности цито- и гистопротективного действия полифенольных концентратов при коррекции артериальной гипертензии

Согласно результатам современных исследований, гипертоническая болезнь является наиболее распространенной среди заболеваний сердечно-сосудистой системы, которые, в свою очередь, занимают ведущее место в структуре заболеваемости [12]. Не менее 45% летальных исходов, вызванных

сердечными патологиями, а также более 50% инсультов являются следствием артериальной гипертензии [13]. в то время как согласно статистическим данным Всемирной Организации Здравоохранения только осложнения артериальной гипертензии становятся причиной 9,4 млн. случаев смерти в мире ежегодно [14]. Помимо непосредственного повреждающего агента, гипертоническая болезнь является значимым фактором риска заболеваний сосудистой системы (магистральных и периферических сосудов), хронических заболеваний почек, когнитивных нарушений и т.д. [15]. 26-ти летнее исследование Национального медицинского исследовательского центра терапии и профилактической медицины Минздрава России показало, что повышенное систолическое артериальное давление статистически снижает ожидаемую продолжительность жизни в среднем на 12 лет [16], а экономических ущерб от прямых и косвенных потерь ежегодно составляет около 869 млрд. руб [17].

Немаловажным фактом является то, что повышенное артериальное давление оказывает не прямое, а косвенное воздействие на все ткани и органы человеческого организма, так у 72 % больных гипертонической болезнью без ассоциированных клинических состояний зарегистрировано поражение органов-мишеней, из которых у 26 % отмечается однокомпонентное поражение, у 25 % – двухкомпонентное поражение, у 21 % – трехкомпонентное поражение органов-мишеней [18]. Наиболее распространенными органами, которые поражаются при гипертонической болезни являются сердце, с возникновением гипертрофических процессов (39-53%) [19], аорта и магистральные сосуды (11%) [20], почечный аппарат (10%) [21], морфологические изменения также являются факторами риска для многих заболеваний. К примеру, с морфологической точки зрения, увеличение комплекса интима-медиа в аорте на 0,1 мм увеличивает риск развития инфаркта миокарда на 11%. Данный факт доказывает, что помимо снижения целевого уровня артериального давления (АД), необходимо уделять внимание протекции органов-мишеней и тканей организма.

Что касается терапии артериальной гипертензии, то следует отметить, что более значимым является не сколько сам факт получения соответствующей терапии, сколько снижение фонового уровня артериального давления. Так, по результатам метаанализа, включившего рандомизированные плацебо-контролируемые исследования, снижение АД на 10 мм. рт. ст. уменьшает риск инсульта на 27%, ишемической болезни сердца (ИБС) — на 17%, хронической сердечной недостаточности — на 28% и смерти от всех причин — на 17% [22].

В последние годы большое внимание уделяется полифенольным соединениям как потенциальным протективным компонентам рациона в отношении хронических неинфекционных заболеваний. В популяционных исследованиях, проводившихся по всему миру, таких как HAPIEE, MEAL, PREDIMED, WOBASZII, Health Survey of Sao Paulo (ISA-Capital) было показано, что потребление полифенолов способствует снижению артериального давления, причем снижение риска составляло в разных группах до 30% [23-26].

Таким образом, исследование экспериментальных образцов полифенольных концентратов является весьма значимым в контексте лечения и профилактики артериальной гипертензии и ассоциированных процессов, а также осложнений и поражений органов-мишеней.

В результате проведенного исследования выявлено, что экспериментальное моделирование ренопаренхиматозной артериальной гипертензии путем химического повреждения верхних полюсов почек сопровождается стойким повышением артериального давления в среднем до $193 \pm 20,3$ мм. рт. ст. к 6-й неделе после оперативного вмешательства, развитием типичных морфологических изменений, таких как гипертрофия миокарда, увеличение толщины стенки аорты, наличие микрососудистых повреждений.

Значения артериального давления крыс до начала эксперимента находились в пределах нормальных значений и составляли в среднем

109,1±15,4 (таблица 2). В экспериментальных группах спустя 6 недель после оперативного моделирования артериальной гипертензии систолическое АД увеличилось в среднем более чем на 80 мм. рт. ст. ($p<0,000$) в сравнении с исходными значениями, максимально показатель достигал 241 мм. рт. ст. В группах, в которых проводилась коррекция полифенольными концентратами спустя четыре месяца терапии наблюдалось достоверное снижение цифр артериального давления в среднем на 21 мм. рт. ст. (10,7 %) ($p<0,000$) при коррекции БКЛВ и на 36 мм. рт. ст. (17,3 %) ($p<0,005$) при коррекции ЭВВ (рисунок 1). В группе с моделированной гипертензией без коррекции спустя четыре месяца наблюдалось достоверное повышение систолического артериального давления до 182,8±10,8 ($p<0,05$) (Рисунок 1).

Таблица 2 – Физиологические показатели у крыс, ($M\pm m$).

Показатель	Группа			
	Интактные, (n=10)	АГ, (n=10)	АГ+БКЛВ, (n=15)	АГ+ЭВВ, (n=15)
Масса тела, г	266,9±57,8	220,8±35,8	266,8±52	297,8±58,8
САД до моделирования, мм.рт.ст.	110±15,4	98,6±9	106,5±14,2	119,3±14,8
САД спустя 6 недель эксперимента, мм.рт.ст.	108±14,6	166,2±14	196±5,4	208±17,3
САД спустя 18 недель эксперимента,	110±10,8	182,8±10,8	175,2±19,6	172,2±28,2

мм.рт.ст.				
Примечание: САД - систолическое артериальное давление;				

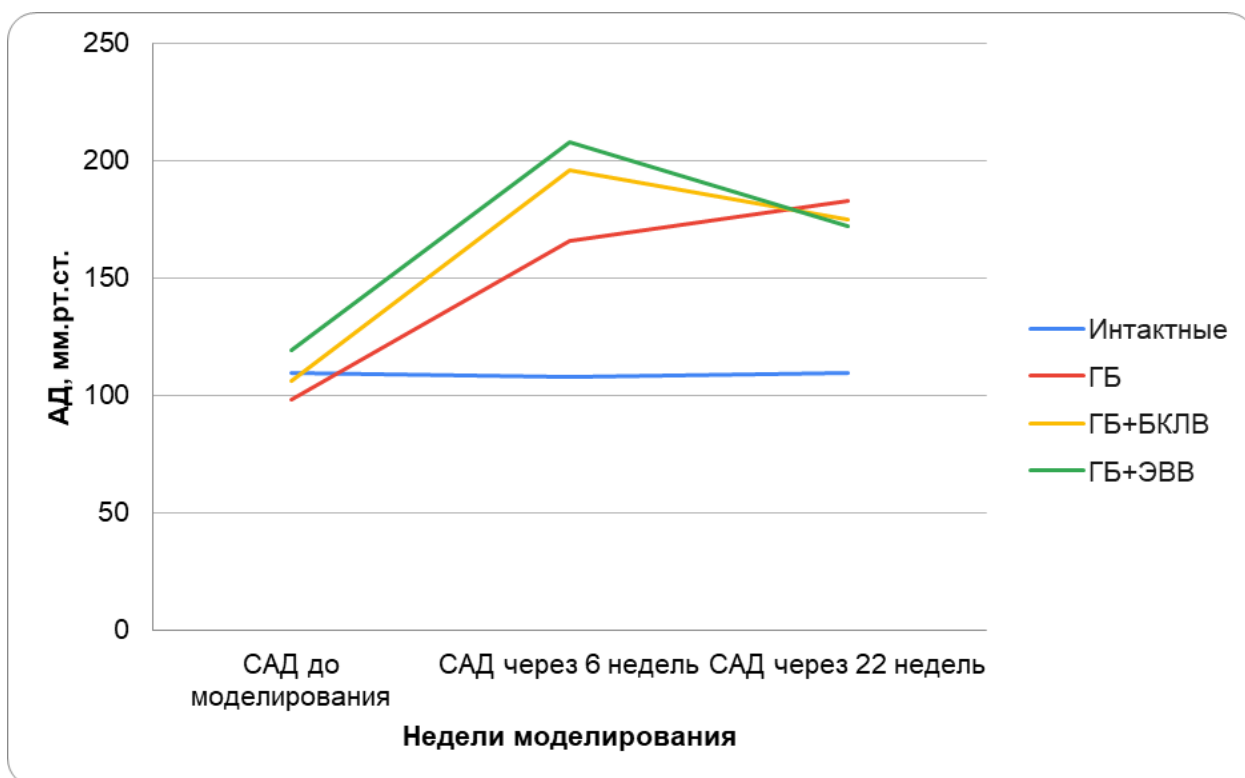


Рисунок 1 – Влияние продуктов, содержащих полифенолы, на уровень артериального давления крыс на модели артериальной гипертензии (22 недели эксперимента).

При моделировании артериальной гипертензии не наблюдалось значимых отклонений биохимических показателей крови, что позволяет исключить иные системные патологические процессы, которые могли привести к обнаруженным морфологическим изменениям органов и тканей. Модель химического повреждения почечной паренхимы позволяет оценить течение и проводить коррекцию изолированной артериальной гипертензии (Таблица 3).

Показатели, характеризующие функциональное состояние почек статистически значимо не различаются, что отражает компенсированное состояние после оперативного вмешательства. Липидный обмен также

находится в пределах нормальных значений, однако следует отметить, что при коррекции полифенольными концентратами уровень ЛПВП незначительно выше.

Таблица 3 – Биохимические показатели у крыс, (M±m).

Показатель	Группа			
	Интактные , (n=10)	АГ, (n=10)	АГ+БКЛВ, (n=15)	АГ+ЭВВ, (n=15)
Креатинин, мкмоль/л	45±6,3	50±5,6	49,4±10,3	48,8±4,7
Мочевина, ммоль/л	4,0±0,2	4,2±0,4	3,8±0,6	4,8±0,7
Холестерин, ммоль/л	1±0,2	1±0,2	1,1±0,2	1,2±0,2
ЛПНП, ммоль/л	0,37±0,06	0,4±0,07	0,34±0,08	0,45±0,14
ЛПВП, ммоль/л	0,63±0,1	0,55±0,1	0,72±0,1	0,67±0,2
Примечание: ЛПНП - липопротеиды низкой плотности; ЛПВП - липопротеиды низкой плотности * - достоверная разница с интактной группой; ** - достоверная разница с группой АГ;				

Для объективного подтверждения обнаруженных изменений был проведен морфологический анализ.

После оперативного моделирования артериальной гипертензии (22 недели эксперимента) макроскопически определялось уменьшение размеров почки, верифицировалось место инъекции. В почечной паренхиме сформировались поврежденные участки, которые характеризовались развитием рубцовых изменений в корковом и мозговом веществе. На рисунке 2а изображен продольный срез почки крыс после моделирования, определяется обширный участок фиброза, представляющий верхний полюс почки. Пораженная область сморщена, уменьшена в размере, относительно сохранной паренхимы нижнего полюса, определяется множество кистозно расширенных почечных канальцев. При микроскопическом исследовании почек крыс интактной группы определялась нормальная структура почечной паренхимы с сохраненной гистологической архитектурой (рисунок 2б).

При большем увеличении (рисунок 2в) можно наблюдать преимущественное заполнение органа фиброзной тканью, диффузную воспалительную лимфо-гистиоцитарную инфильтрацию. Соединительная ткань определяется во всех структурных элементах: мезангий клубочков, капсула клубочка, интерстиций (рисунок 2д-и). Капсула клубочков значительно расширена, в просвете можно обнаружить скопления гомогенных эозинофильных масс, что свидетельствует о нарушении фильтрационного барьера. Проксимальные почечные канальцы в состоянии дистрофии и некроза.

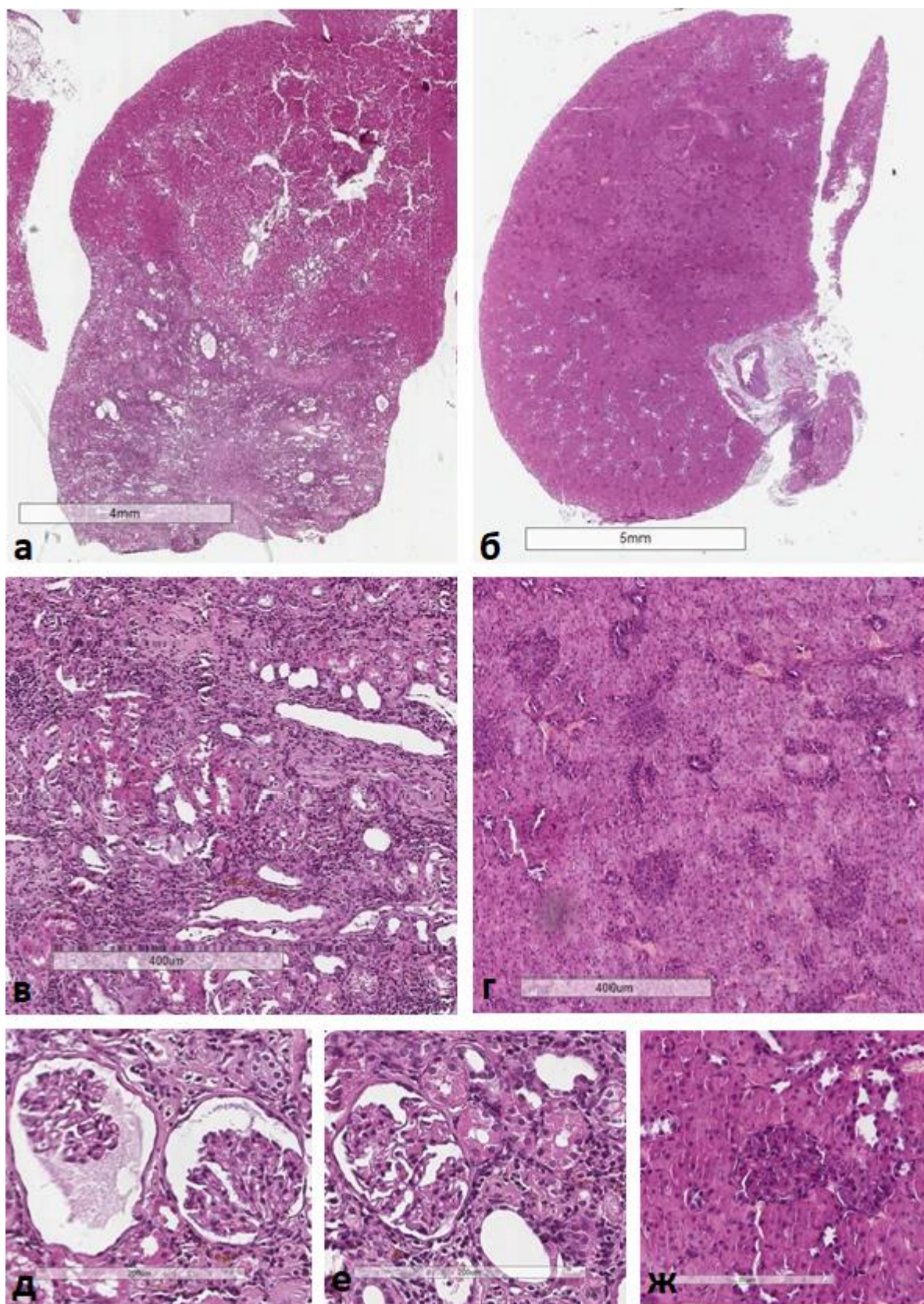


Рисунок 2 – Морфологические изменения почечной паренхимы после оперативного моделирования артериальной гипертензии. Гематоксилин-эозин.

а. Группа АГ. Почка, обширный участок фиброза в верхнем полюсе почки.

- б. Интактная группа. Почка.
- в. Группа АГ. Фиброз в тканевых элементах почки. Ув. 10х.
- г. Интактная группа. Нормальная структура паренхимы почки Ув. 10х.
- д. Группа АГ. Фильтрат в просвете капсулы клубочка. Диффузное разрастание соединительной ткани. Ув. 20х.
- ж. Группа АГ. Дистрофия и некроз эпителия проксимальных почечных канальцев. Ув. 20х.
- и. Интактная группа. Нормальная структура клубочка и канальцев. Ув. 20х.

Развитие артериальной гипертензии сопровождалось формированием гипертрофии миокарда сердца крыс, что проявляется в увеличении массы миокарда и диаметра кардиомиоцитов (Таблица 4). Для объективного исследования и сравнения массы миокарда рассчитывался показатель отношения массы сердца (мг) к массе тела (г) (МС/МТ). Оценка МС/МТ позволяет снизить вероятность неверной интерпретации результатов и исключить изменения, которые в большей степени обусловлены массой тела животного.

Таблица 4 – Морфофункциональные показатели сердца у крыс, (M±m).

Показатель	Группа			
	Интактные , (n=10)	АГ, (n=10)	АГ+БКЛВ, (n=15)	АГ+ЭВВ, (n=15)
Масса сердца/масса крысы, мг/г	3,9±0,1	4,7±0,2*	4,4±0,2**	4,4±0,2**
ДКМЦ, мкм	8,4±0,2	12,8±0,1 *	11,7±0,2**	11,4±0,5**
Примечание - ДКМЦ - диаметр кардиомиоцитов; * - достоверная разница с интактной группой; ** - достоверная разница с группой АГ;				

Так в группе с экспериментально моделированной гипертензией значение этого показателя составляет $4,7 \pm 0,2$ что достоверно ($p < 0,000$) превышает значение интактной группы ($3,8 \pm 0,1$). В группе с коррекцией артериальной гипертензии с помощью полифенольных концентратов наблюдалось достоверно более низкий показатель. В группе с БКЛВ значение МС/МК составляло $4,3 \pm 0,2$ на уровне значимости $p < 0,05$, а в группе с ЭВВ - $4,4 \pm 0,2$ на уровне значимости $p < 0,005$ (Рисунок 3).

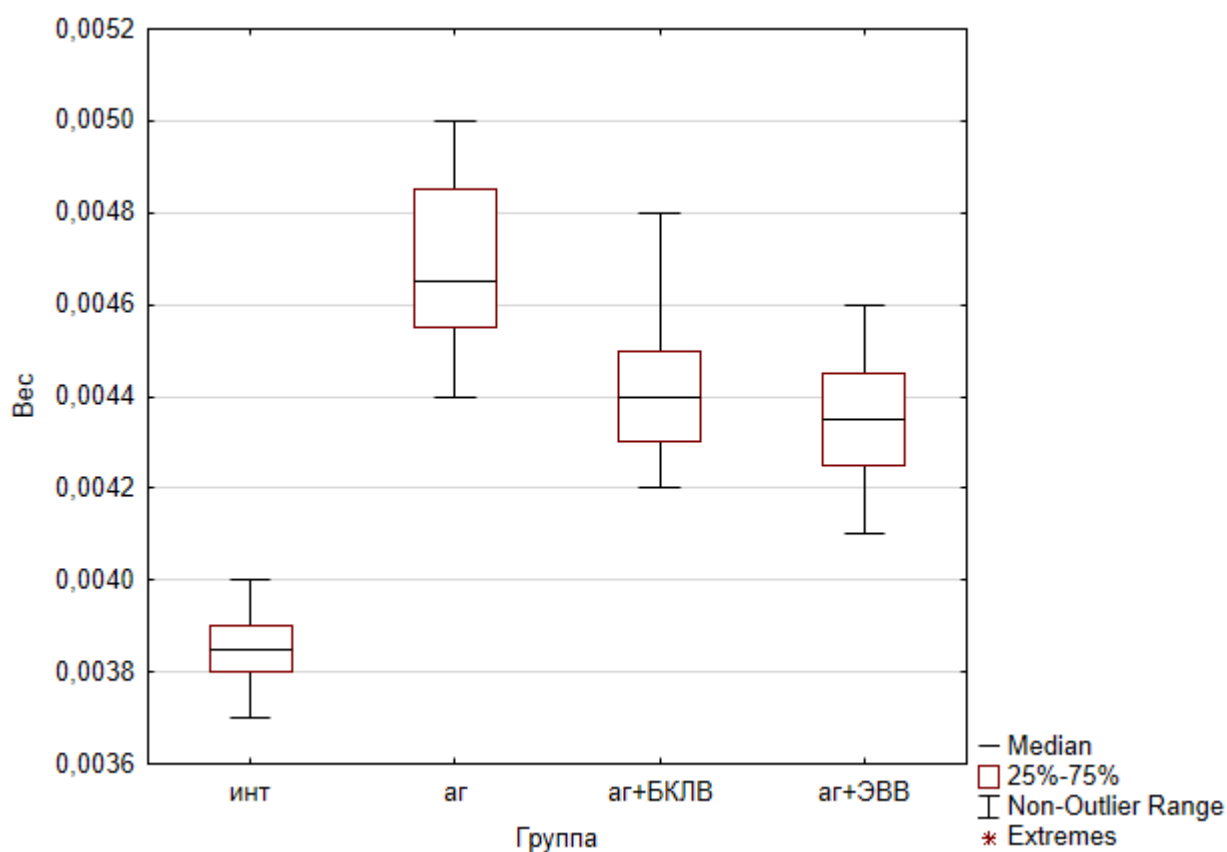


Рисунок 3 – Влияние продуктов, содержащих полифенолы, на развитие гипертрофии миокарда на модели артериальной гипертензии

Развитие артериальной гипертензии сопровождалось изменением морфологической структуры миокарда крыс. После оперативного моделирования во всех группах отмечается развитие гипертрофии миокарда, однако при коррекции экспериментальными образцами диаметр кардиомиоцитов ниже, на уровне значимости ($p < 0,05$). Наблюдались

изменения структуры стенок артериол с развитием фибриноидного пропитывания, гиалиноза, периваскулярного отека. В группе контроля эти изменения носят более выраженный характер, стенки сосудов значительно утолщены, деформированы, просвет заполнен гомогенными эозинофильными массами, визуализируется значительный периваскулярный отек, множество оптически пустых включений (Рисунок 4).

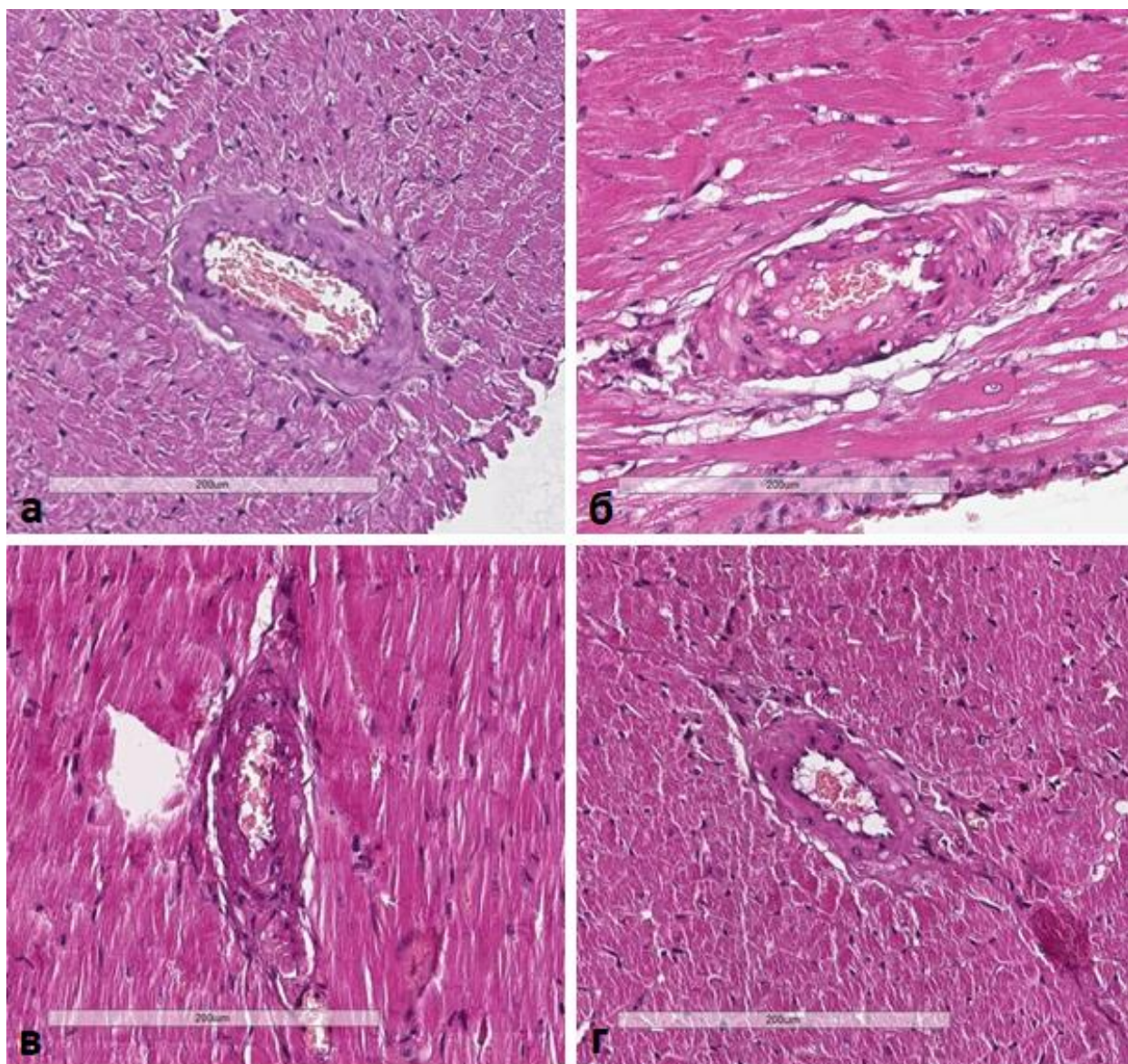


Рисунок 4 – Влияние продуктов, содержащих полифенолы, на структуру сосудов миокарда на модели артериальной гипертензии и при коррекции полифенольными концентратами.

а. Интактная группа. Миокард. Нормальная структура сосуда. Ув. 20х.

б. Группа АГ. Миокард. Артериола с признаками гиалиноза, выраженный периваскулярный отек, фиброз. Ув. 20х.

в. Группа АГ+БКЛВ. Миокард. Периваскулярный фиброз, невыраженный отек. Ув. 20х.

г. Группа АГ+ЭВВ. Миокард. Периваскулярный фиброз. Ув. 20х.

Повышение значений артериального давления в экспериментальных группах сопровождалось развитием изменений морфологии аорты крыс. Во всех группах сохранялась гистологическая архитектура оболочек стенки аорты. В группах с моделированной артериальной гипертензией эластические мембраны медики имели извитое направление и непараллельное расположение. Визуализировались множественные оптически пустые включения, преимущественно в базальных отделах медики. В группах с коррекцией полифенольными концентратами эти изменения имели менее выраженный характер, толщина стенки была выше, чем у интактной группы, преимущественно за счет гладкомышечных компонентов (Рисунок 5).

При проведении морфометрического исследования было обнаружено достоверное утолщение комплекса интима-медиа (И-М) в группах с моделированной артериальной гипертензии, в сравнении с интактной.

При сравнении группы с АГ и групп, получавших терапию полифенольными концентратами, отмечаются статистически значимые различия как после применения БКЛВ ($p < 0,05$), так и ЭЭВ ($p < 0,05$) (Таблица 5).

Таблица 5 – Показатели толщины основных слоев аорты, ($M \pm m$).

Группа	Интима, мкм	Медиа, мкм	Комплекс интима-медиа, мкм
Интактные, (n=10)	6,7±1,4	73,6±8,3	84±11,7

АГ, (n=10)	9,9±2,3	114±27,1* p<0.0	123,9±27,6* p<0.0
АГ+БКЛВ, (n=15)	9,1±2,3	86±11** p<0.0	95,1±13,1** p<0.0
АГ+ЭВВ, (n=15)	8,6±1,8	85,7±15,9** p<0.0	94,3±16,6** p<0.0

Примечание:

* - достоверность по сравнению с интактной группой;

** - достоверность по сравнению с группой АГ;

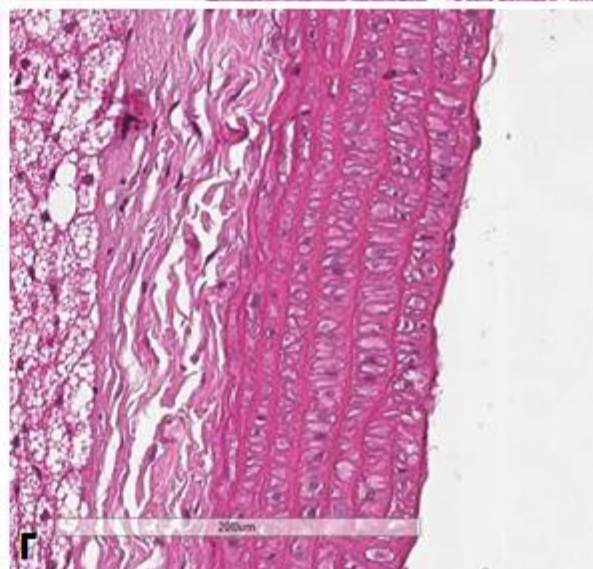
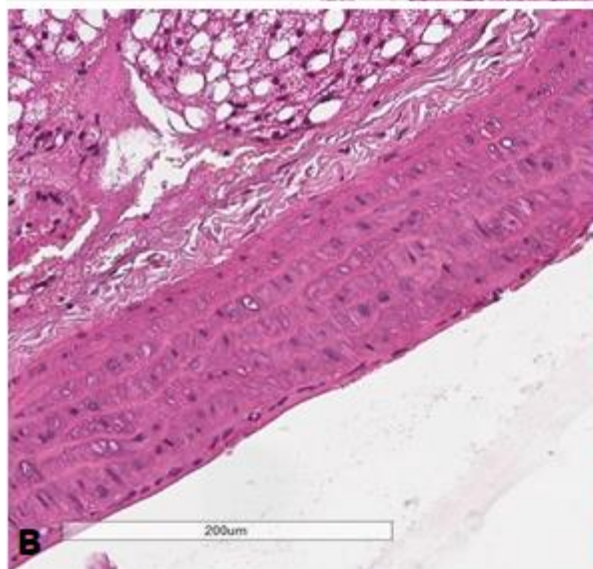
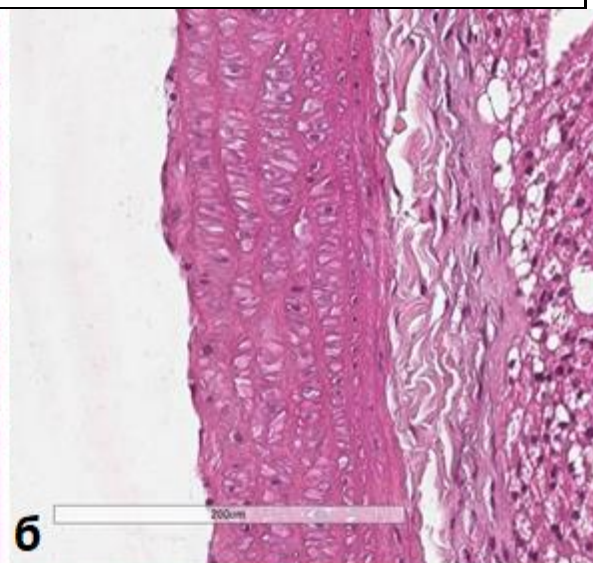
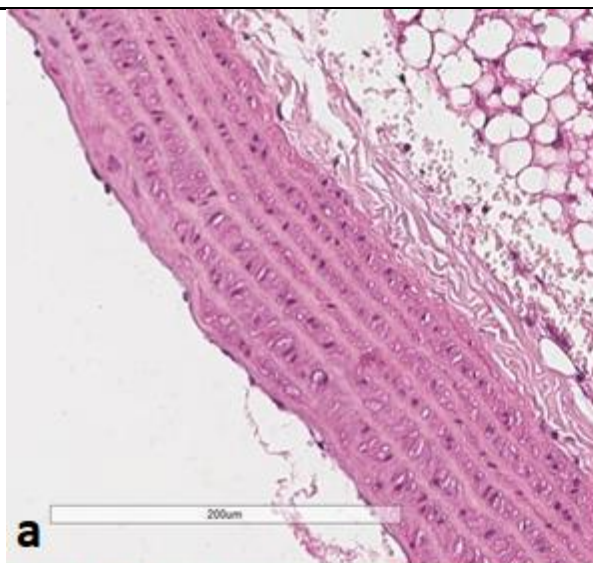


Рисунок 5 – Влияние продуктов, содержащих полифенолы, на структуру аорты на модели артериальной гипертензии и при коррекции полифенольными концентратами. Гематоксилин-эозин.

- а. Интактная группа. Нормальная структура стенки аорты. Ув. 20х.
- б. Группа АГ. Утолщение стенки аорты, преимущественно за счет меди. Нарушение параллельности эластических мембран. Преобладание гладкомышечных компонентов. Ув. 20х.
- в. Группа АГ+БКЛВ. Нарушение параллельности эластических мембран. Ув. 20х.
- г. Группа АГ+ЭВВ. Преобладание гладкомышечных компонентов. Ув. 20х.

Морфологический анализ надпочечников крыс не показал значимых отклонений от нормы. Наблюдалось нарушение соотношения коркового и мозгового вещества в пользу увеличения последнего в группе с моделированной артериальной гипертензией.

При сравнении группы контроля и опытной группы при коррекции БКЛВ наблюдалось статистически значимое изменение показателей относительной площади коркового и мозгового вещества надпочечников ($p < 0.05$). При коррекции ЭВВ соотношение коркового и мозгового вещества также приближалось к значениям интактной группы, но на уровне значимости $p < 0.05$ (Таблица 6).

Таблица 6 – Относительная площадь мозгового и коркового вещества, а также зон коркового веществ надпочечников крыс, ($M \pm m$).

Группа	Показатели, %				
	ОП МВ	ОП КВ	ОП КЗ	ОП ПЗ	ОП СЗ
Интакты, (n=10)	15,1±2,6	84,9±2,6	20,7±4,1	60,3±4,2	19±5,8
АГ, (n=10)	26,5±6,2*	73,6±6,2*	14,1±1,1	59±7,9	26,9±6,9
АГ+БКЛВ, (n=15)	17,9±3,8**	82,1±3,7**	12,7±2,3	59,7±9,5	27,6±8,6
АГ+ЭВВ, (n=15)	18,8±4,2	81,2±4,2	12,6±1,9	62±3,5	25,5±4,5
<p>Примечание: ОП - относительная площадь; КВ - корковое вещество; МВ - мозговое вещество; КЗ - клубочковая зона; ПЗ - пучковая зона; СЗ - сетчатая зона</p> <p>* - достоверность по сравнению с интактной группой;</p> <p>** - достоверность по сравнению с группой АГ;</p>					

Применение экспериментальных полифенольных концентратов показало свою эффективность при исследовании эндотелиальной дисфункции. Так, при проведении спектрофотометрического исследования наблюдались статистически значимые различия уровня сывороточного эндотелина-1 в группе контроля и группах с коррекции полифенольными концентратами (Таблица 7).

Таблица 7 – Уровень сывороточного Эндотелина-1, (M±m).

Показатель	Группа		
	АГ, (n=10)	АГ+БКЛВ, (n=15)	АГ+ЭВВ, (n=15)
Эндотелин-1	82,7±19,6	58,1±9,9*	62,3±8,6*
Примечание: * - достоверность по сравнению с группой АГ;			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам выполненной НИР можно сделать следующие выводы:

1. Экспериментально смоделирована изолированная ренопаренхиматозная артериальная гипертензия, инструментально и морфологически доказана ее состоятельность, выражающаяся в поднятии артериального давления до $193 \pm 20,3$ мм.рт.ст. и наличии микроскопических признаков повреждения паренхимы почки. Биохимически доказано отсутствие метаболического компонента в экспериментальной модели, а также компенсированность состояния почек после химического воздействия.

2. Определена функциональная эффективность экспериментальных образцов, которая обеспечила снижение артериального давления в среднем на 21 мм. рт. ст. (10,7 %) при коррекции БКЛВ и на 36 мм. рт. ст. (17,3 %) при коррекции ЭВВ. В то время как в группе с моделированной гипертензией без коррекции спустя четыре месяца продолжалось повышение систолического артериального давления до $182,8 \pm 10,8$.

3. Проведен морфологический анализ цито- и гистопротективных свойств экспериментальных образцов:

- снижение выраженности гипертрофических процессов в миокарде, отображающихся в диаметре кардиомиоцитов и отношении массы сердца к массе крысы
- более выраженное фибриноидное пропитывание, гиалиноз, периваскулярный отек при отсутствии коррекции полифенолами
- меньшее повреждение стенок аорты и сниженные темпы роста ее толщины, наиболее выраженные в комплексе интима-медия
- тенденция к сохранению отношения коркового и мозгового веществ в надпочечниках, а также структурных зон коры надпочечника - клубочковой, сетчатой и пучковой
- значимое снижение выработки Эндотелина-1, по сравнению с группой с артериальной гипертензией

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Огай Ю.А., Черноусова И.В., Зайцев Г.П. и др. Способ получения концентрата полифенолов винограда / Свидетельство о государственной регистрации, №2748227С1 от 17.03.2020. - М. Роспатент, 2020
2. Кубышкин А.В., Шрамко Ю.И., Зяблицкая Е.Ю., Петренко В.И., Иващенко Н.А., Таримов К.О., Черноусова И.В., Огай Ю.А. Использование продуктов природного происхождения для коррекции абдоминального ожирения при экспериментальном метаболическом синдроме // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 563-567.
3. Кучеренко А.С., Петренко В.И., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Сорокина Л.Е., Ткач В.В., Огай Ю.А., Шрамко Ю.И. Изучение механизмов нейроденеративных процессов при экспериментальном моделировании метаболического синдрома // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14, № 1,2. – С. 211-216.
4. Петренко В.И., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Сорокина Л.Е., Шевандова А.А., Черноусова И.В. Огай Ю.А. Исследование противовоспалительного и антидиабетического действия полифенолов винограда на экспериментальной модели метаболического синдрома // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН». – 2020. – Т. XLIX. – С. 243–246.
5. Петренко В.И., Шевандова А.А., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И., Шрамко Ю.И., Макалиш Т.П., Огай Ю.А., Хусаинов Д.Р. Изучение роли дисметаболических механизмов в развитии нейродегенеративных процессов при экспериментальном моделировании метаболично-когнитивного синдрома // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2021. – Т. 16, № 2. – С. 187–191 <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16043>.

6. Зайцев Г.П., Черноусова И.В., Таримов К.О., Шрамко Ю.И., Жилиякова Т.А., Гришин Ю.В. Экспериментальный анализ биологической эффективности продуктов переработки винограда с нормируемым количеством полифенолов // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН». – 2022. – Т. LI. – С. 89-91.
7. Шевандова А.А., Петренко В.И., Дмитриевская С.А., Кубышкин А.В., Брауде И.Е., Корниенко Н.В., Зайцев Г.П. Патогенетическое обоснование нефропротективного действия полифенолов и БРА в эксперименте // Виноградарство и виноделие. Сборник научных трудов. – 2022. – Т. LI. – С. 107.
8. Руководство Р 4.1.1672–2003 Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 240 с.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
10. ГОСТ Р 54037-2010 Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов амперометрическим методом в овощах, фруктах, продуктах их переработки, алкогольных и безалкогольных напитках. – М.: Стандартинформ, 2011. – 11 с.
11. Дюйзен И.В., Елисеева Е.В., Романченко Е.Ф., Тартышникова А.В. Способ моделирования ренопаренхиматозной артериальной гипертензии у крыс / Свидетельство о государственной регистрации, №2507593С1 от 30.07.2012. - М. Роспатент, 2012
12. Lawes C.M., Vander Hoorn S., Rodgers A.: Global burden of bloodpressure-related disease // Lancet. – 2008. - №371. – P. 1513–1518
13. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G: A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990- 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study // Lancet. – 2012. - №380(9859). – P. 2224- 2260.

14. WHO A. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs sustainable development goals //World Health Organization. – 2023.
15. GBD 2015 Risk Factors Collaborators et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // Lancet. – 2016. – Т. 388. – №. 10053. – С. 1659.
16. Константинов В. В. и др. Профиль риска сердечно-сосудистого здоровья и его вклад в выживаемость у мужчин и женщин Москвы в возрасте 35-64 лет // Профилактическая медицина. – 2013. – Т. 16. – №. 1. – С. 3-7.
17. Баланова Ю. А. и др. Экономический ущерб от артериальной гипертензии, обусловленный ее вкладом в заболеваемость и смертность от основных хронических неинфекционных заболеваний в Российской Федерации // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2020. – Т. 16. – №. 3. – С. 415-423.
18. Бушмакина А. В. и др. Новый способ диагностики раннего субклинического поражения почек у больных гипертонической болезнью и возможности его коррекции в зависимости от тактики и выбора антигипертензивной терапии // Артериальная гипертензия. – 2012. – Т. 18. – №. 1. – С. 37-44.
19. Кузнецова Т.Ю. Клинико-генетические факторы предрасположенности к артериальной гипертензии и поражению органов-мишеней: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2009. – С. 28.
20. Salonen J. T., Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease //Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology. – 1991. – Т. 11. – №. 5. – С. 1245-1249.
21. Кардиология. Клинические рекомендации / под ред. Ю.Н. Беленкова, Р.Г. Оганова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 640 с.

22. Ettehad D. et al. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis //The Lancet. – 2016. – T. 387. – №. 10022. – C. 957-967.
23. Grosso G. et al. Dietary polyphenol intake and risk of hypertension in the Polish arm of the HAPIEE study //European Journal of Nutrition. – 2018. – T. 57. – C. 1535-1544.
24. Miranda A. M. et al. Association between polyphenol intake and hypertension in adults and older adults: A population-based study in Brazil //PloS one. – 2016. – T. 11. – №. 10. – C. e0165791.
25. Tresserra-Rimbau A. et al. Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: the PREDIMED study //Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. – 2013. – T. 23. – №. 10. – C. 953-959.
26. Zujko M. E. et al. Dietary total antioxidant capacity and dietary polyphenol intake and prevalence of metabolic syndrome in Polish adults: A nationwide study //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2018. – T. 2018.