

ТБИЛИССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

**Т е а Ч а н а д и р и**

Коррекция окислительного стресса в иммунокомпетентных клетках (в спленоцитах) под действием комплекса катехинов зеленого чая на модели экспериментального алиментарного ожирения

14.00.36 – Алергология и иммунология

**А в т о р е ф е р а т**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Тбилиси  
2006**

**Работа выполнена в Институте медицинской биотехнологии Грузии.**

***Научные руководители - Корсантия Борис, Доктор медицинских наук, профессор***

**Саникидзе Тамара**, Доктор биологических наук, профессор.

**Официальные оппоненты: Готуа Майя**, Доктор медицинских наук, профессор

(14.00.36)

**Джавашвили Лали**, Кандидат медицинских наук (14.00.03)

Защита диссертации состоится \_\_\_\_\_ 2006 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета m 14.10 №5 в Тбилиском государственном медицинском университете (Тбилиси, 0177, пр. Важа-Пшавела, 33)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тбилиского государственного медицинского университета (Тбилиси, 0160, пр. Важа-Пшавела, 29)

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2006 года.

**Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук, профессор -**

**/Т. Чиковани/**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность проблемы** Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований, полученные в течении последних лет, дают возможность пересмотреть существующие теории о патогенезе ожирения и его осложнений. Во время ожирения наблюдается не простое увеличение массы жировой ткани, как энергетического

депо(как обсуждалось 40-50 лет назад), и эндокринно-метаболические изменения (гипотеза 1980-ых годов), одновременно выявляется и иммунная дисфункция. Это становится причиной иммунного дисбаланса и перестройки физиологии всего организма (Хаитов Р.М. 2000).

Проблема адекватной иммунотерапии при иммунодефицитных состояниях, возникших при ожирении, представляет интерес для врачей практически всех специальностей в связи с неуклонным ростом в контингенте пациентов с ожирением инфекционно-воспалительных заболеваний, особенно вызванных вирусными инфекциями с высокой вирулентностью, ауто-иммунных, аллергических и системных заболеваний, склонных к хроническому и рецидивирующему течению на фоне низкой эффективности проводимой базовой терапии, обуславливающих высокий уровень заболеваемости (Воробьев А.А 2001). Исследования, проведенные в последние годы во многих странах мира, показали, что в ожиренных пациентах важным аспектом в предупреждении рецидивов и осложнений, также условием соблюдения оптимального срока лечения, является сочетание базовой терапии с рациональной иммунокоррекцией (Воробьев А.А и соавт. 2003).

Новейшая патогенетическая концепция характеризует иммунодефицитные состояния, как снижение функциональной активности компонентов иммунной системы, что на биохимическом уровне определяется как ферментно-энергетический дефицит, и как снижение их количественных показателей, что на гисто-физиологическом уровне связано с нарушением течения клеточного цикла, снижением пролиферативной способности и/или про-апоптозной стимуляцией, а на биохимическом уровне ассоциируется с тем же ферментно-энергетическим дефицитом и биохимическим осуществлением про-апоптозного сигнала (Киселевский М.В. 2004). При первичных иммунодефицитах идентифицируются биохимические дефекты генетического обеспечения, вызывающие ферментно-энергетический дефицит, и проводится анализ молекулярно-генетических механизмов этой недостаточности (Яблчанский Н.И. 2005); Однако, в интересах клинической иммунологии входит изучение вторичных иммунодефицитных состояний, которые в количественных отношениях занимают доминирующее место и индуцируются неизученными пока механизмами дефекта ферментно-энергетического обеспечения. В их структуре классифицируется т.н. индуцированная форма (Хаитов Р.М. 2001), при которой нарушение иммунитета является вторичным по отношению к главному заболеванию и вызывается патогенетическими механизмами основного заболевания и/или составляет патогенетическое звено первичного заболевания, среди них иммунодефицитные состояния, вызванные метаболическим синдромом, включая сахарный диабет и ожирение (Тутельян А.В. 2004, Marti A.2001, Wellen K.et.al.2003, Neels J.et.al.2006, Weisberg S.et.al.2006). Они вызывают все больше интереса у исследователей и идет процесс идентификации патогенетических путей этих состояний на клеточных и биохимических уровнях.

Гистоморфологической манифестацией иммунной дисфункции при ожирении считается выявленный в адипозной ткани очаг хронического вяло-текущего воспаления. Этому свидетельствуют экспериментальные данные, указывающие на факт, что при ожирении происходит интенсивная инфильтрация макрофагами жировой ткани, положительно коррелирующая с ВМІ индексом, массой висцерального жира, объемом адипоцитов и интенсивностью продукции жировой тканью про-воспалительных цитокинов (Weisberg S, et al, 2003). В жировой ткани макрофаги включены в виде агрегантов и >90% локализованы вокруг погибших адипоцитов (Cinti S.et.al.2005, Dahlman I.et.al.2005). Росту аккумуляции макрофагов способствует усиленная продукция адипоцитами и жиро-тканевыми эндотелиоцитами специфического хемоаттрактанта MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) моноцитов (Dahlman I.et.al.2005, Sartipy P.et.al.2003, Takahashi K.et.al.2003, Weisberg S.et.al.2006) и медиатора дифференциации макрофагов SCF-3 (colony-stimulating factor) (Cecchini M.et.al.1994),

обеспечивая тем самым приток их костно-мозговых предшественников. Установлено, что хемотаксису моноцитов также способствуют факторы: изменения величины поверхностного заряда клеток и электродинамической силы потока; повышенная экспрессия -ICAM-[intracellular adhesion molecule]-1, интегринов  $\beta$ -2, селектинов E-P (Hotamisligil G.et.al.1995, Xu H.et.al.2003); также прямопропорциональное к росту массы жировой ткани увеличение концентрации про-восполительных протеинов TNF  $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL-8 (Bedoui S.et.al.2005, Sethi J.et.al.1999, Weisberg S.et.al.2006).

Активно рассматривается гипотеза причинно-следственной связанности нарушений биоэнергетики митохондрии с возникновением иммунной дисфункции при ожирении (Ченцов Ю.С. 2000, Obici S. 2002, Sullinan P. 2004). На биохимическом уровне это идентифицируется как ингибирование АТФ-образующих митохондриальных процессов и энергетический дефицит, который вторично опосредует снижение спонтанной и митоген-стимулирующей пролиферации и ферментно-энергетических функциональных способностей иммунных клеток. Также описан прямой путь митохондрия-индуцированной про-апоптозной стимуляции (Szewczyk A. 2002, Постнов Ю.В. 2004, Schon E. 2003, Tianzheng Y. 2006).

Согласно современной концепции патогенеза ожирения главным патогенетическим звеном этого процесса является системный окислительный стресс (Weisberg S.et.al.2006) - это центральное звено, инициирующее дефекты митохондриального окисления субстратов в жировой ткани (Keaney J.F., et al., 2003, Olust S.O., 2002). Предполагается, что на предклиническом этапе ожирения генерированный в жировой ткани окислительный стресс и изменения редокс-гомеостаза организма являются первичным механизмом образования воспалительного процесса и патологической перестройки общего гомеостаза (Mahadev K.et.al.2004). Избыточная аккумуляция жира в адипозных и неадипозных тканях положительно коррелирует с генерацией окислительного стресса. Эти данные получены как из экспериментальных, так из клинических исследований (Atabek M.et.al.2004, Keaney J.et.al 2003, Ozcelik O.et.al 2005). Основные данные об изменениях энергетического неспецифического метаболизма иммунных клеток получены при исследовании генетических моделей ожирения, где описаны разные стороны патологического изменения биоэнергетики митохондрии (Nicholls M 2002, Галоян А. А.2004, Katoh H. 2004).

Гиперпродукция свободных радикалов кислорода ведет к развитию апоптоза (Заллесский В. Соавт.2004). Проапоптозные сигналы от жировой ткани обуславливают усиление апоптозной активности не только адипоцитов, а других, особенно иммунных тканей (Howard et.al.1999).

На сегодняшний день хорошо изучены ведущие патогенетические метаболическо-эндокринные механизмы ожирения, а патогенетические механизмы иммунных сдвигов, в частности изменения энергетического метаболизма иммуннокомпетентных клеток, и генерации сигналов, запускающих процесс апоптоза до конца не установлены и ставят многие критические вопросы. При этом, вышеуказанные данные в основном получены на генетических моделях ожирения, мало данных от диэтиндуцированных экспериментальных моделей, хотя среди этиологических факторов превалирует расстройство пищевого поведения (Bedoui S. et.al.2005).

Исходя из вышесказанного, **целью** нашего исследования явилось установление механизмов развития системного окислительного стресса и дислипидемии, генерации про-апоптозных сигналов в спленоцитах и эффективности коррегирующего воздействия обладающих антиоксидантной и антиапоптозной активностью катехинов зеленого чая на течение процессов свободнорадикального окисления и апоптоза иммунных тканей (спленоцитов) в рамках диэт-индуцированной экспериментальной модели ожирения .

Для достижения поставленной цели необходимо было разрешить следующие **задачи**:

1. В условиях моделирования диэт-индуцированного ожирения и воздействия катехинов зеленого чая на крысах установление изменения физиологических параметров

- (интенсивности увеличения массы тела, ежедневного потребления пищи и воды, кумуляции (массы) висцерального жира).
2. В условиях моделирования диет-индуцированного ожирения и воздействия катехинов зеленого чая на крысах в крови:
    - а) установление изменения параметров липидного обмена (содержание триглицеридов, общего холестерина, LDL, HDL);
    - б) установление изменения активности про- ( $Mn^{2+}$ -комплексов, супероксидрадикалов, липопероксидов и NO) и антиоксидантной (каталазы, супероксиддисмутаза, церулоплазмина,  $Fe^{3+}$ -трансферина, метгемоглобина) систем крови;
  3. В условиях моделирования диет-индуцированного ожирения и воздействия катехинов зеленого чая на крысах в селезенке:
    - а) установление изменений основного процесса биоэнергетического метаболизма - активности митохондриального дыхания (NADH-убихинон-оксидоредуктазно ферментных FeS –центров, I и  $\Delta H$  семихиноновых форм убихинонов и флавопротеинов);
    - в) установление интенсивности процессов перекисного окисления липидов и нарушении целостности мембран.
    - г) установление интенсивности синтеза ДНМ в спленоцитах (ЭПР сигналы лимитирующего синтез ДНМ фермента рибонуклеотидредуктазы)
  4. Установление эффективности действия катехинов зеленого чая на модели индуцированного окислительным стрессом апоптоза (изменения  $\Delta\psi_m$ ) в спленоцитах крыс.

### **Научная новизна работы**

- Впервые на модели диет-индуцированного ожирения у крыс комплексно изучены изменения физиологических, биохимических и биофизических параметров и показано, что на фоне получения высококалорийной пищи у крыс с увеличением массы тела и висцерального (парагонадного) жира, имеет место развитие дислипидемии и окислительного стресса.
- На модели диет-индуцированного ожирения установлено, что гиперлипидемия и окислительный стресс обуславливают подавление интенсивности митохондриального дыхания иммуннокомпетентных клеток, в частности спленоцитов.
- Впервые установлено, что на фоне высококалорийной пищи воздействие катехинов зеленого чая обеспечивает нормализацию окислительного и липидного метаболизма в организме и способствует восстановлению работы митохондриальной системы спленоцитов.
- Впервые показано, что катехины зеленого чая способствуют снижению интенсивности индуцированного окислительным стрессом апоптоза в спленоцитах крыс.

### **Положения, выносимые на защиту:**

- I. На модели ДИО уже на ранних стадиях ожирения в организме крыс имеют место нарушения липидного обмена и окислительного метаболизма, что способствует генерации окислительного стресса, снижению интенсивности энергетического метаболизма и интенсификации апоптоза спленоцитов.
- II. Корректирующее воздействие катехинов зеленого чая на окислительный и липидный метаболизм, также их анти-апоптотная активность обеспечивает нормализацию редокс-гомеостаза организма и энергетического метаболизма селезенки и защиту спленоцитов от инициации липоапоптоза.

## Практическая значимость работы

В результате проведенных исследований выявлена коррегирующая активность катехинов зеленого чая на интенсивность окислительного стресса стимулированного ожирением и на интенсивность апоптоза спленоцитов, индуцированного окислительным стрессом на диет-индуцированной модели ожирения. На основании полученных результатов рекомендуем применение катехинов зеленого чая для превенции ожирения и сопутствующих его иммунных дисфункций.

### Апробация работы.

Материалы диссертации доложены на заседании Ученого совета Института медицинской биотехнологии Грузии.

### Публикации.

Вокруг диссертационной темы в изданиях международного обращения опубликованы 4 научных труда.

### Объем и структура работы.

Диссертация состоит из 135 страниц, содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, выводы и список использованной литературы.

В диссертации приведены 14 таблиц, 10 диаграмм, 7 схем и 6 рисунков, список использованной литературы содержит 316 источника.

## Материалы и методы исследования

**1. Модулирование диетиндуцированного ожирения *in vivo*.** Эксперименты проводились на половозрелых белых крысах самках весом 180-200 г (60 крыс). В течение первой недели животные (60 крыс) получали стандартное питание и воду *ad libitum*. Впоследствии животные рандомизированно были разделены на 3 группы: Животные I контрольной группы (20 крыс) в течение следующих 7 недель получали стандартную пищу и воду *ad libitum*. Животные II группы (диетиндуцированное ожирение –DIO) (20 крыс) в течение следующих 7 недель получали смешанную пищу, которая состояла из стандартной пищи (47%), сладкого концентрированного молока (44%), растительного масла (8%) и растительного крахмала (1%) (диета #C 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ (West D., et al., 1992)), и воду *ad libitum*. Животные III группы (DIO+катехины)(20 крыс) в течение 3 недель получали смешанную пищу, которая состояла из стандартной пищи (47%), сладкого концентрированного молока (44%), растительного масла (8%) и растительного крахмала (1%) (диета #C 11024, Research Dietes, New Brunswick, NJ (West D., et al., 1992)), и воду *ad libitum*, а в течение последующих 4 недель им параллельно со смешанной пищей делались инъекции катехинов зеленого чая дозой 15 мг/кг. Через 8 недель после начала эксперимента у умерщвленных животных определялась масса висцеральной жировой ткани.

### 2. Биохимические исследования.

**Определение активности каталазы в плазме крови.** Активность антиоксидантного фермента каталазы определяли по методу Aebi (1984), модифицированного М. А. Королюком и Л. И. Ивановой (1988) на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО.

**Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в плазме крови.** Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом Fried-a (1970), модифицированного Е. В. Макаренко (1988) на спектрофотометре СФ-46 ЛОМО.

**Определение содержания холестерина, триглицеридов и липопротеидов низкой плот-ности (LDL) в плазме крови.** Содержание общего холестерина, триглицеридов и липопротеидов низкой плотности (LDL) в плазме крови определяли реактивами фирмы

Randox на аппарате Centrifichem-600. Содержание липопротеидов высокой плотности (HDL) измеряли тем же методом после осаждения липопротеидов низкой плотности (LDL) и липопротеидов очень низкой плотности (VLDL) фосфовольфраматом магния. Концентрация липопротеидов низкой плотности (LDL) вычисляли по формуле:  
 $LDL(\text{мг/дл}) = \text{XC} - (\text{TG} : 5 + \text{HDL})$

### **3. Спектроскопические исследования методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).**

ЭПР исследования производились на радиоспектрометре РЭ-1307 (Россия), оперирующем в области сверхвысокой частоты 9.77 GHz при частоте модуляции 50 kHz при температуре жидкого азота (-196<sup>0</sup>C). Регистрировали спектры ЭПР крови и селезенки. В крови определяли ЭПР сигналы, определяющие активность прооксидантных металлов переходной группы  $\text{Mn}^{2+}$  ( $g_1=2,14$ ), метгемоглобина (MetHb) ( $g=6,0$ ) и антиоксидантной (церулоплазмина ( $g=2,05$ ),  $\text{Fe}^{3+}$ -трансферрина ( $g=4,3$ )) системы (Пулатова М.К., и др., 1999). В селезенке регистрировали показатели митохондриального дыхания (ЭПР сигналы семихиноновых форм флавинов и убихинонов ( $g=2,00$ ) и железосерных (FeS) центров ( $g=1,94$ )), ЭПР сигналы лимитирующего синтез ДНК фермента рибонуклеотидредуктазы ( $g=2,005$ ),  $\text{Mn}^{2+}$ -содержащих центров ( $g=2,14$ ). Регистрация спектров ЭПР производилась при амплитуде модуляции 0,6 мТ и мощности микроволнового излучения 100 мВт.

С целью определения содержания свободного оксида азота в селезенке и в крови животных использовали спин-ловушку диэтилдитилкарбамат натрия (DETC) (SIGMA).

С целью определения содержания липопероксидрадикалов ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ) в селезенке и в крови использовали спин-ловушку  $\alpha$ -фенил-*tert*-бутилнитрон (PBN) (SIGMA).

С целью определения содержания супероксидрадикалов в селезенке и в крови животных использовали спин-ловушку 5,5-диметил-1-пиролин-IV-оксид (DMPO) (SIGMA).

### **4. Моделирование окислительного стресса и исследование антиапоптозной активности катехинов зеленого чая *in vitro*.**

#### ***Моделирование апоптоза в культуре спленоцитов.***

С целью моделирования апоптоза в культуре спленоцитов производили механическую гомогенизацию селезенки интактных животных. Полученный гомогенат центрифугировали при 1000g в течении 10 минут. Осажденные клетки помещали в предварительно приготовленную рабочую среду (среда 199, 10% телячья сыворотка, 1% раствор пенициллина и стрептомицина и 0,03% глутамата). Клетки спленоцитов были разделены на 3 группы: I группа - интактные; II группа – к клеткам добавляли перекись водорода дозой 100  $\mu\text{M}$ ; III группа – к клеткам одновременно добавляли перекись водорода дозой 100  $\mu\text{M}$  и раствор катехинов зеленого чая дозой 3  $\mu\text{г/мл}$ . Клетки подвергались 24 часовой инкубации при температуре 37<sup>0</sup>C в условиях постоянной подачи 10%  $\text{CO}_2$ .

#### ***Исследование апоптоза в культуре спленоцитов.***

Через 24 часа после инкубации методом проточной цитометрии в клеточной культуре определяли митохондриальный потенциал  $\Delta\psi_m$  с использованием липофильной катионной флуоресцентной пробы 3,3'- dihexyloxacarbocyanine iodide - DiOC<sub>6</sub>. Для определения митохондриального потенциала  $1 \times 10^5$  клетки инкубировали в течении 15 минут при температуре 37<sup>0</sup>C с 20  $\mu\text{l}$  0.2  $\mu\text{M}$ -ого раствора DiOC<sub>6</sub>. Исследования проводили посредством аппарата FACScan (Becton Dickinson, US). Возбуждение DiOC<sub>6</sub> наблюдалось при 488 nm, эмиссия измерялась при 530 nm.

## Результаты собственных исследований

Целью нашего исследования являлось при моделировании ДЮ-ожирения на биохимическом и биофизическом уровне рассмотреть и идентифицировать существующие корреляционные связи между механизмами, приводящими к метаболической и иммунной дисфункции. Мы спровоцировали алиментарное ожирение и комплексно изучили общие физиологические, также биофизические параметры крови и селезенки крыс. При этом получили следующие результаты:

Нами было выявлено, что в результате потребления высококалорийной пищи (ВКП) в течении 7 недель интенсивность увеличения массы тела крыс на 43% превышала интенсивность увеличения массы тела у крыс, находящихся на стандартном питании. При этом животные контрольной группы прибавляли в весе сравнительно медленно в течении последних 4 недель, чем в первые 3 недели. Интенсивность прибавления в весе крыс, находящиеся на высококалорийной диете, наоборот, статически достоверно увеличивается в течении последних 4 недель по сравнению показателями контрольной группы и показателями этой же группы в первые 3 недели. Мы заключили, что *потребление высококалорийной пищи значительно увеличивает коэффициент прибавления в весе у крыс.*

Также, при этом, у животных, находящихся на высококалорийной диете, количество потребляемой в день пищи на 23% превышало количество пищи потребляемых животными контрольной группы. Исходя из этого, мы заключили, что *высококалорийная пища вызывает гиперфагию у крыс.*

По литературным данным, гиперфагия является основным этиологическим фактором ДЮ-ожирения как у животных, так и у людей (West D, 2005) и вызывает патологическую т.н. постпрандиальную (послеобеденную) гиперликемию и гиперлипидемию, что ассоциируется с замедлением катаболизма триглицеридов и функциональными и количественными изменениями гипопротеидов (Чазова И. 2004). Из количественных изменений выделяют повышение концентрации в основном хиломикрон, триглицеридов и липопротеидов очень низкой плотности (55% составляют триглицериды) (Мкртумян А.М. 2004) и резкое снижение количественных показателей холестерина из липопротеидов высокой плотности, вызванное патогенетическим изменением метаболизма печени (переполнение гепатоцитов триглицеридами и холестерином, инактивация печеночной липопротеидлипазы) (Перова И.В. 2001). Из функциональных изменений описаны гликолизирование белков липопротеидов на фоне гипергликемии (Schwartz M., Kahn S. 1999) и перекисное окисление липидов липопротеидов факторами окислительного стресса (Berthezene F, 1993, Syvanne M., Taskinen M 1997). По причине таких модификации экспрессированная на эндотелиоцитах и гепатоцитах липопротеидлипаза не улавливает выдоизмененные липопротеиды и они, задерживаясь в кровяном русле, становятся источником повышенного потока липидов в ткани, в том числе и в иммунные. Имунокомпетентные клетки крови проявляют фагоцитирующую активность по отношению к этим липидным частицам и это считается ведущим механизмом патогенеза атеросклероза (Pipeng L. 2005).

Похожую картину мы получили в нашей экспериментальной модели ДЮ-ожирения, где был определен липидный спектр крови:

В крови, находящихся на высококалорийной диете крыс, содержание общего холестерина возросло на 62%, триглицеридов - на 65%, а LDL – на 31%, а содержание HDL снизилось на 14% по сравнению с соответствующими контрольными значениями. Таким образом, *на фоне высококалорийной диеты в*



*организме крыс имеет место нарушение липидного обмена и развитие дислипидемии (II-б типа).*

В физиологических условиях на избыточный поток экзогенных липидов (гипертриглицеридемия, экзогенная гиперхолестеринемия) организм отвечает увеличением синтеза липидных запасов. Но на каком-то этапе или под действием какого-то механизма избыток энергетического потока включает компенсаторные пути метаболизма липидов и углеводов. Целью этой компенсации является приостановление липогенеза. Описаны следующие биохимические направления метаболической стрессовой стимуляции при ожирении: с одной стороны, быстрый рост внутриклеточной концентрации промежуточных продуктов липидного обмена, в частности диацилглицерола (DAG)(+210%), длинноцепочного ацил-КоА (+640%) и малонил-КоА (+220%), также продукта гексозаминного метаболизма глюкозы UDP-GlcNAc (+73%), опосредует активацию некоторых серин-треонин-киназных путей (JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase), IKK (inhibitor of kappa kinase), PKC- $\theta$ (protein kinase C)(Zick Y.2003)), которые при фосфорилировании субстрата IRS-1/2 рецептора инсулина вызывают инсулинорезистентность. Теми же механизмы микробные продукты (пептидогликанами, LPS и др), воздействуя на TLR(Toll-like receptor) рецепторы, вызывают врожденный иммунный ответ (Medzhitov 2001). С другой стороны, подтверждено, что в процессе возникновения инсулинорезистентности принимают участие и про-восполительные пути: активация NF- $\kappa$ B (nuclear factor-  $\kappa$ B) транскрипционного фактора, увеличение экспрессии цитокинов (TNF- $\alpha$  (+1700%), IL-1 $\beta$  (+440%))(Boden 2005), концентрация которых положительно коррелирует со степенью ожирения (BMI), с концентрацией лептина(модель ob/ob)(van Dielen FM et al 2001) и экспрессией лептинового рецептора (модель db/db) (Hansen MJ 2001). Интересно, что адипоциты, кроме про-восполительных протеинов, экспрессируют и рецепторы к ним, этим они представляют модель восполительной реакции, где адипоциты являются как источником, так и мишенью этого восполительного сигнала. (Ross SE et al 2002). При таком роде стимуляции свободные жирные кислоты выполняют роль лигандов для нуклеарных рецепторов, они преобразуют свою гидрофобную природу и приобретают свойства лигандов при связывании с внутриклеточными FABP (fatty acid binding protein) протеинами (Zimmerman 2002). Эти протеины экспрессируются в избыточном количестве в иммунных клетках и положительно коррелируют с содержанием холестерина и триглицеридов в крови (Makowski 2004). Таким образом, повышение запасов триглицеридов вызывает включение вышеописанных компенсаторных механизмов, целью которых является приостановление липогенеза, достижение этой цели возможно только с помощью появления инсулинорезистентности тканей-мишеней (Mandato C., et al., 2005), при которой ингибирование ADD-1/SREBP-1c транскрипционного фактора вызывает подавление активности генов, ответственных за липогенез (Kim JB et al 1998, Shimomura I 1999, Foretz M 1999). Наивысшую липолитическую активность выявляет висцеральная (абдоминальная) жировая ткань, а у крыс соответствующим является парагонадный жир (Kissebah AH., 1994).

В условиях 7-недельного потребления ВКП масса висцерального жира у животных на 57% превышала значение соответствующего параметра у животных контрольной группы, а его доля от всей массы тела возрастала на 1,75 (в контроле 3,85%, ВКД -5,6%). Таким образом, *на фоне высококалорийной диеты происходит деронирование жиров в висцеральной жировой ткани.*

С точки зрения биохимии избыточный поток нутриентов в адипоцитах приводит к нарушению внутриклеточного энергетического баланса в сторону увеличения поступления энергии. Быстрая адаптация к этим условиям, когда оно не сбалансировано запасанием, первоначально осуществляется повышением окислительных процессов и расходом избытка энергии таким образом (Bouchard C. et al 1990)). На этом этапе трансдукция энергии идет по двум направлениям: синтезом АТФ и теплообразованием. Но удержание в напряженном режиме синтеза такого рода невозможно сохранить в

течении продолжительного времени, поскольку это ведет к предельному напряжению клеточной ферментной архитектоники. Развивается т.н. ER–стресс (эндоплазматический стресс) и ROS–стресс (митохондриальный окислительный стресс) (Wellen K., Hotamisligil G 2006).

В проведенной нами серии экспериментов, методом ЭПР осуществлялось исследование крови, как периферического органа иммунной системы. Этот метод общепризнан и широко внедрен в практике, как прямой метод установления концентрации и химической природы свободных радикалов в тканевых образцах. Из результатов проведенных исследований следует: в крови крыс, находящихся на высококалорийной диете, имеет место интенсификация процессов свободнорадикального окисления, что проявляется накоплением супероксидрадикалов ( $O_2^-$ ) ( $g=2,01$ ) и липопероксидов ( $LOO^\cdot$ ) ( $g=2,00$ ), метгемоглобина ( $g=6,00$ ) и  $Mn^{2+}$ –содержащих комплексов ( $g=2,14$ ). *Эти изменения подтверждают механизмы интенсификацию свободнорадикального окисления, про-оксидантные стимуляции и начало иницирования процессов перекисного окисления липидов, ведущих к повреждению мембранных структур.*

В ходе нашего исследования в модели DIO –ожирения мы получили картину модуляции системы антиоксидантной защиты: *в результате интенсификации процессов про-оксидантной стимуляции изменяется активность системы антиоксидантной защиты*, после предельной активности наступает состояние ее стрессовой декомпенсации. Также, *интенсифицируются процессы деструкции мембран клеточных элементов крови*, что в наших исследованиях проявляется снижением активности церулоплазмينا ( $g=2,05$ ) на 21%, трансферина ( $g=4,2$ ) на 10%, супероксиддисмутазы на 18% и компенсаторной активацией каталазы на 44% в крови. При усиленном гемолизе эритроцитов, что проявляется появлением ЭПР сигнала метгемоглобина, повышается концентрация свободного железа и при дефиците восстанавливающих ее белков (церулоплазмينا и трансферина), идет Fe–опосредующая стимуляция про-окислительных свойств крови.

Эти данные коррелируют с литературными данными, свидетельствующими о том, что избыточная аккумуляция липидов в адипозных и неадипозных тканях оказывает воздействие на интенсивность окислительного метаболизма, способствует усиленному образованию реактивных форм кислорода (Talior I., et al., 2005, Tirosh O., et al., 2004, Atabek M.E., et al., 2004) и развитию системного окислительного стресса в организме (Keaney J.F., et al., 2003, Olust S.O., 2002, Prazny M., et al., 1999). Выявлена прямая корреляция между интенсивностью процессов свободнорадикального окисления и степенью ожирения, нарушении баланса между про- и антиоксидантной системами крови при ожирении (Robertson G., et al., 2001, Cazzola R., 2004). Нарушение баланса между про- и антиоксидантными системами крови способствует окислительному повреждению наружных клеточных и митохондриальных мембран (Cazzola R., et al., 2004).

Вторая волна липотоксического эффекта дислипидемии, осуществляется ударом и выполнением этого эффекта на иммунокомпетентные клетки. В адипозных тканях стимуляция липолиза определяет усиленный поток избыточного количества свободных жирных кислот к другим тканям, в том числе к иммунным. На фоне гиперлипидемии угнетение иммунной функции и, восстановление ее в условиях коррекции липидного обмена, показывает корреляционную связь между ними и способствует внедрению термина - «метаболическая иммунодепрессия» (Воробьев А.А. 2003). Выявлена прямая корреляция между степенью ожирения, интенсивностью свободно-радикального окисления и риском развития иммунодефицитного статуса (Dandona P., et al., 2001, Keaney J.F., Jr., et al., 2003, 23, Multu-Turkoglu U., et al., 2005, Ozcelik O., et al., 2005, Atabek M.F., et al., 2004). Описана отрицательная корреляционная связь между пролиферативной активностью лимфоцитов с дислипидемией (особенно T-CD4+ и NK) (Moussa M., 2000) и синтезирующей

способностью иммуноглобулинов (особенно IgG<sub>3</sub> и IgG<sub>4</sub>), а положительную связь установили между дислипидемией и экспрессией цитокинов (про-воспалительного класса TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4) (Вологжанин ДА.2001). Также на генетических моделях ожирения найдены атрофические изменения кортикального слоя тимуса и мальпигиевых тельцев селезенки (Howard JK. Et al 1999), также установлен факт CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфопении в тимусе, селезенке и крови (Tanaka S, 1998) и снижение интенсивности митоген-стимулированной пролиферации лимфоцитов селезенки (Moriguchi S, 1998). В клинических исследованиях, проводимых в популяции подростков были найдены связанные с ожирением пониженные пролиферативные способности субпопуляции NK и Т-лимфоцитов (Nieman DC 1999). Также в исследуемой группе женщин климактерического периода выявлено резкое снижение Т-клеточной (PHA и ConA – стимулированная пролиферация) и В-клеточной (PWM- стимулированная пролиферация) функции (Nieman DC et al. 1996), также изменения концентрации иммуноглобулинов при вакцинации против В-гепатита (Weber DJ 1996). Новейшим результатом считается найденное снижение выживаемости в мышцах, инфицированных штамом вируса, обладающим высокой степенью вирулентности (летальность неожиренных мышей – 4%, ожиренных – 40%) (Beck S. et al 2006).

Поиски механизмов функциональных и количественных изменений иммунокомпетентных клеток во время ожирения приводят к следующим заключениям: хронический высококалорийный поток, выступая в роли индуктора универсального повреждающего клеточные структуры механизма – окислительного стресса, приводит к компенсаторному ингибированию растущего АТФ-синтезирующего направления биоэнергетики клетки (Leibel RL., 1995), что генетически детерминированно (снижение экспрессии транскрипционного фактора PPAR $\alpha$ ). Этим организм защищает свое структурное строение. Вышеобсужденное направление компенсации включает снижение импорта жирных кислот в митохондрии (Lewis G.F., 2002) и инактивацию участвующих в  $\beta$ -окислении ферментов (ацетил- CoA синтетазы, ацил- CoA дегидрогеназы, 3-кетоацил-CoA тиолазы) (Kim J.1998, Patel L.2003). По этому, во время окислительного стресса, наряду с компенсаторными механизмами, происходит прямое снижение мембранного потенциала  $\Delta\psi_m$ , что и приводит к снижению синтеза АТФ, вызванного нарушением работы дыхательной цепи переноса электронов.

В ходе нашего эксперимента на фоне высококалорийного питания в селезенке у крыс выявлено повышение интенсивности ЭПР сигнала свободнорадикальных центров семихиноновых форм убихинонов и флавопротеидов ( $g=2,005$ ) на 32% по сравнению с контрольными показателями. Интерпретация этих данных приводит к следующему заключению: происходит разрыв в цепи переноса электронов на I (NADH-убихинон-оксиредуктазной) и III (убихинон-цитохром С-редуктазной) участках, что приводит к «утечке» электронов из этой цепи и в спленоцитах усиливается образование промежуточных флаво- и убисемихиноновых радикалов. Интенсивность ЭПР сигнала этих радикалов является ранним маркером инициации окислительного стресса в ткани селезенки. Иницированное свободнорадикальным окислением повреждения мембранных образований проявляется интенсификацией ЭПР сигнала Mn<sup>2+</sup>-комплексов ( $g=2,14$ ). Наряду с этими изменениями, выявляется интенсификация гемолиза эритроцитов и Fe-опасредованная про-оксидантная стимуляция спленоцитов, проявленная снижением на 30% интенсивности ЭПР сигнала Fe<sup>3+</sup>-трансферина ( $g=4,2$ ) и появлением ЭПР сигнала высокоспинного метгемоглобина ( $g=6,0$ ).

Также, в результате наших исследований было установлено, что на фоне воздействия высококалорийной диеты в селезенке крыс имеет место уменьшение интенсивности на 24% ЭПР сигнала FeS-центров NADH-дегидрогеназы ( $g=1,94$ ), что указывает на подавление энергопроизводительных процессов (АТФ) и усиление хронической продукции реактивных форм кислорода.

В селезенке крыс также зафиксировано увеличение интенсивности ЭПР сигнала базального  $\text{NO}^-$  ( $g=2,01$ ) и появляются сигналы  $\text{FeSNO}^-$  комплектов ( $g=1,94$ ), что связано с нитролизированием ионов железа I и IV комплексов дыхательной цепи и указывает на наличие *NO* индуцированных повреждений АТФ-синтезирующей способности клеток.

*Таким образом, на фоне кратковременного высококалорийного питания в селезенке крыс развивающиеся окислительные повреждения мембран приводит к ингибированию митохондриальной биоэнергетики и к подавлению энергопроизводительных (АТФ-синтезирующих) процессов.*

Во время наших исследований мы определяли интенсивность сигнала фермента, маркера пролиферативной способности спленоцитов, рибонуклеотид-редуктазы. Этот фермент катализирует синтез прямого предшественника ДНК 2-дезоксикарибонуклеозид-5-трифостата. Ее активный центр включает тирозиновый свободный радикал и исследуя интенсивность ее ЭПР сигнала, мы определяем ДНК-синтезирующую способность клеток в неповрежденных тканях. В группе ВКП интенсивность ЭПР сигнала снизилась на 54%, что свидетельствует об снижении пролиферативной способности спленоцитов.

Таким образом, анализируя данные, полученные на экспериментальной модели ДЮ-ожирения, мы пришли к следующим заключениям:

*Высококалорийная диета и развившаяся дислипидемия генерирует окислительный стресс. Он идентифицируется как механизм, приводящий к нарушениям структурного (мембранного) строения, функционального осуществления (АТФ-синтезирующей способности) метаболизма и пролиферационной способности (АТФ-дефицит и ингибирование синтеза ДНК) спленоцитов.*

По литературным данным, гистохимической особенностью иммунных клеток является их чрезмерная чувствительность и зависимость от общего энергетического баланса в организме (Хаитов Р.М. 2000): при постоянно идущем процессе пролиферации иммунные клетки воспроизводят свою генетическую информацию с высокой скоростью и для этого чаще переходят из G0 фазы в G1 фазу, включаясь в клеточный цикл с ее митотическим заключением. Эти этапы сильно энергоемкие, по этому дефицит АТФ приводит к прерыву клеточного цикла и количественному дефициту иммунных клеток (Романовский Ю.М. 1984, Труфакин В.А. 2000, Gavrilova O. et al. 2003). На биохимическом уровне АТФ – зависимым является весь химизм осуществления функциональных способностей иммуноцитов, в том числе открытый недавно механизм рецепторной передачи информационного сигнала, в котором участвует т.н. сигнальный АТФ (Карелин А. 1998, Доценко 2001). Синтез такого рода АТФ происходит с помощью NADH-специфической протонофорной редок-системы и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - АТФазы (Crane FL. 1990), внедренной в наружную мембрану иммуноцитов. АТФ синтезирующая активность обеих, митохондриальной и наружно-мембранной, систем зависит от целостности мембранного строения, поэтому основой дефицита иммунных ресурсов является разрушение мембранного строения этих клеток (Карелин А. 1998, Доценко 2001).

На фоне окислительных повреждений даже точечный разрыв мембраны митохондрии приводит к снижению разности ее мембранного потенциала ( $\Delta\psi\text{m}$ ) не только на участке разрыва, но и по всей длине ее мембранного строения, поскольку она имеет эквипотенциальную проводниковую поверхность (Ионичева Л.В.2006). Эти изменения приводят к высвобождению из матрикса в цитоплазму апоптогенных белков (цитохрома С, прокаспаз 2,3,9, АIF-флавопротеида). Цитохром С, вызывая конформационные изменения АRAF-1 фактора, включает реакцию аутокаталитического процессинга прокаспазы 9, которая в свою очередь опосредует активацию всего каскада каспаз и вызывает апоптозную гибель клетки (Buttke and Sandstrom 1994, Slater et al 1995, Rollet-

Labelle et al 1998, Chandra et al 2000, Mates and Sanchez-Jimenez 2000). Таким образом, иницированный окислительным стрессом коляпс  $\Delta\psi_m$  выступает в роли раннего маркера про-апоптозного внутриклеточного сигнала (Szewezyk A. 2002).

В нашем эксперименте *in vitro* на клеточной культуре спленоцитов крыс мы изучили роль реактивных соединений кислорода (перекиси водорода  $H_2O_2$ ) в инициации апоптоза. Как нами было установлено, после 24 часовой инкубации спленоцитов с перекисью водорода, клеточная популяция, имеющая высокий потенциал  $\Delta\psi_m$  (M1) снижается 5-жды, а популяция с низким потенциалом (M2) увеличивается на 55,4%. Таким образом, *подтверждается интенсификация про-апоптозной стимуляции спленоцитов на фоне окислительного стресса.*

Многолетнее исследование результатов антиоксидантной терапии позволило судить об ее эффективности при коррекции нарушений иммунного статуса (Иларионов М.Ю. 2000). Во время лечения хронических воспалительных процессов антиоксиданты выявили свою мембраностабилизирующую способность. При дефиците эндогенных антиоксидантов, встречающегося во время разных нозологий, целесообразным является заполнение этого недостатка экзогенными аналогами. Основу биоактивности этих веществ составляет их способность прямо инактивировать свободные радикалы и преостановить их образование путем восстановления эндогенных антиоксидантов (Голиков А.П. 2003). Трудно внедрить в практику некоторые синтезированные антиоксиданты из-за их неустойчивости, множественных побочных свойств и противодействия. В связи с этим, привлекают интерес к себе активные компоненты пищевых растений, которые употреблялись в течении веков. Поскольку модель пищевого поведения резко изменился в течении последнего столетия и оно является ведущим этиологическим фактором ДИО-ожирения, мы сочли целесообразным изучить активные компоненты зеленого чая, как вещества, имеющего профилактические и возможно и терапевтические, эффекты влияния на патогенез этой нозологии и ее осложнений, в виде иммунодефицитного состояния.

Поэтому, мы изучили пути корректирующего влияния катехинов зеленого чая на метаболизм клеток, их липидный и окислительный обмен при ожирении, которые позволили бы достичь восстановления нарушенного при этом энергетического баланса иммунных тканей и понижения интенсивности развивающегося в них процесса апоптоза.

Во время 7-недельной диеты на фоне инъекций раствора катехинов зеленого чая (группа ДИО+катехины зеленого чая) интенсивность прибавления в весе (на 40%) и количество потребляемой в день пищи (+22%) не отличается от соответствующих параметров в группе ДИО, тогда как, количество потребляемого в день воды уменьшается 0,25-жды. Таким образом, *катехины во время стимуляции ВКП не изменяют параметры интенсивности прибавления в весе, но намечается тенденция снижения гиперфагии в течении последних 4 недель.*

Также на фоне инъекции катехинов уменьшается масса накопленного висцерального жира (-1,8%), что указывает на *способность катехинов ингибировать липогенез.*

Под действием катехинов зеленого чая в крови крыс, потребляющих ВКП, содержание триглицеридов, общего холестерина и LDL уменьшается на 78%, 45% и 44% соответственно и составляет 88%, 117% и 87%-ов от значений, характерных для группы контроля. При этом, концентрация HDL увеличивается на 18% и составляет 104% контрольного показателя. Таким образом, можно заключить, что *катехины зеленого чая обладают способностью корректировать липидный обмен в организме.*

По нашим результатам, на фоне высококалорийной диеты под действием катехинов происходит восстановление про-антиоксидантного равновесия: активность каталазы уменьшается на 39% и составляет 105% контрольного показателя, в то же время восстанавливается активность СОД (до 108% контрольного показателя), уменьшается интенсивность сигнала ЭПР церулоплазмينا (на 16%), снижается

соответствующий показатель метгемоглобина (3,5-жды),  $Mn^{2+}$ -комплексов (2,7-жды), повышается интенсивность сигнала  $Fe^{3+}$ -трансферина до 98% контрольного показателя, исчезают ЭПР сигналы супероксидрадикалов ( $O_2^-$ ) и липопероксидов ( $LOO^\cdot$ ).

Можно заключить, что на фоне ВКП катехины зеленого чая способствуют нормализации процессов свободнорадикального окисления и про-оксидантной стимуляции, выявленной в крови.

Также, под действием катехинов в ЭПР спектре селезенки на 20% снижается интенсивность сигнала свободнорадикальных центров семихиноновых форм, а интенсивность FeS центров NADH-дегидрогеназ повышается до 99% контрольного показателя. В месте с этим снижается показатель ЭПР сигнала  $Mn^{2+}$ -комплексов (2-жды) и метгемоглобина (2,9-жды), повышается интенсивность сигнала  $Fe^{3+}$ -трансферина до 92% контрольного показателя.

Таким образом, под действием катехинов зеленого чая при ВКП восстанавливается работа электротранспортной системы митохондрии, уменьшается интенсивность процессов перекисного окисления фосфолипидов и ПОЛ-индуцированного гемолиза эритроцитов, что приводит к стабилизации АТФ-синтезирующей способности клеточных систем спленоцитов.

Способствуя убавлению интенсивности окислительного стресса и интенсификации энергогенеза, катехины зеленого чая восстанавливают активность рибонуклеотид-редуктазы до 92% контрольного показателя, что по литературным данным в условиях окислительного стресса обуславливает поддержание пролиферации спленоцитов.

В группе ВКП под воздействием катехинов снижается интенсивность сигнала ЭПР базального  $NO^\cdot$ , что обеспечивает снижение интенсивности  $FeSNO^\cdot$  нитрозильных комплексов и выявляет реверсию  $NO$ -индуцированного снижения процессов окислительного фосфорилирования.

После 24 часовой инкубации спленоцитов с перекисью водорода при добавлении катехинов на 22% увеличивается количество клеток с высоким потенциалом ( $\Delta\psi_m$ ), что указывает на способность катехинов стабилизировать показатель ( $\Delta\psi_m$ ) мембранного потенциала митохондрий и их анти-липоапоптозную активность.

Эти данные коррелируют с литературными данными, по которым катехины зеленого чая характеризуются ярко выраженной антиоксидантной (Loest H.B., et al., 2002, Murse T., et al., 2005, Wang Z.Y., et al., 1994, Pan M.H., et al., 2000, Higdon J.V., Frei B., 2003, Yokozawa T., et al., 2002, Skrzydlewska E., et al., 2002, Negishi H., et al., 2004, Chen C., et al., 2000, Negishi H. et al., 2004, Yokozawa T., et al., 2002, Yokozawa T., et al., 1999, Yokozawa T., et al., 2002) и регулирующей метаболизм липидов (Raedestorff D.G., et al., 2003, Raedestorff D.G., et al., 2003, Loest H.B., et al., 2002, Murase T., et al., 2002, Tjburg L.B., et al., 1997, Crespy V., et al., 2004, Wu L.Y., et al., 2004) активностью. Основой фармакологического действия катехинов зеленого чая является антиоксидантная активность этих соединений: как способность непосредственной детоксикации свободных радикалов кислорода (Higdon J.V., Frei B., 2003 Levites Y., et al., 2003), также воздействие на активность транскрипционных факторов (NFkB) и антиоксидантных ферментов (Higdon J.V., Frei B., 2003).

## Выводы

1. В модели ДИО-индуцированного ожирения увеличение массы тела животных происходит в основном за счет депонирования висцерального жира. Увеличение массы происходит на фоне гиперфагии и дислипидемии.

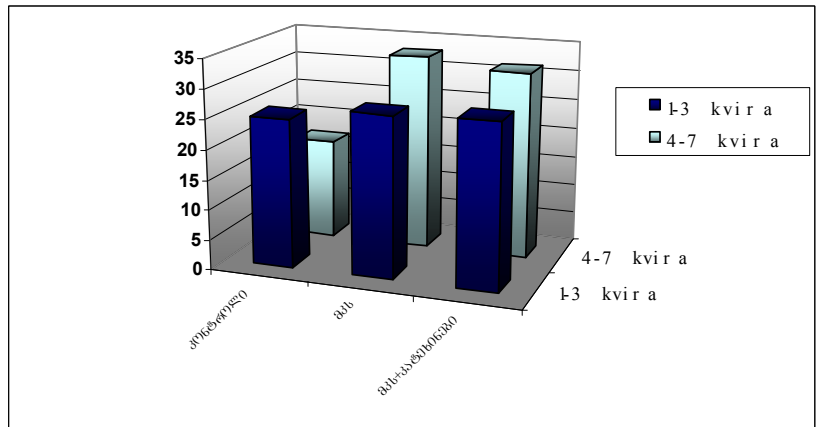
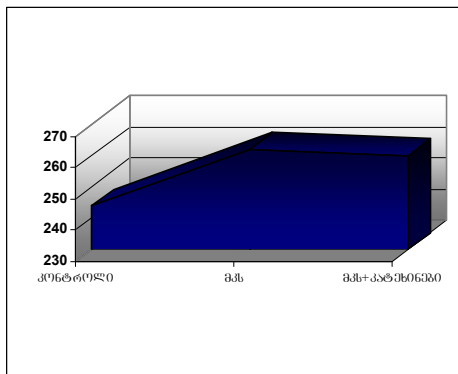
2. В модели ДИО-индуцированного ожирения развивающаяся дислипидемия опосредует нарушение процессов митохондриального дыхания и энергогенеза иммунных клеток (спленоцитов) и тем самым определяет инициацию процессов пероксидации (что проявляется накоплением супероксидрадикалов ( $O_2^-$ ) и липопероксидов ( $LOO^\cdot$ )) и изменение активности ферментов антиоксидантной защиты (уменьшение активности церулоплазмينا и супероксиддисмутазы и увеличение активности каталазы)) и повреждение мембранных структур клеток (появление  $Mn^{2+}$  комплексов).
3. В модели ДИО-индуцированного ожирения в селезенке сниженная интенсивность энергогенеза, процессы окси- и липо-пероксидации определяют снижение синтеза ДНК, определяя тем самым снижение пролиферативной активности спленоцитов, что выявляется снижением ЭПР сигнала рибонуклеотидредуктазы.
4. В клеточной культуре спленоцитов избыток реактивных соединений кислорода вызывает снижение мембранного потенциала митохондрии ( $\Delta\psi_m$ ), что определяет увеличение проходимости митохондриальных мембран.
5. Корректирующее воздействие катехинов зеленого чая на интенсивность окислительного и липидного метаболизма и на повышенный мембранный потенциал митохондрии обеспечивает восстановление нарушенного энергетического метаболизма и нормального уровня мембранного потенциала митохондрии спленоцитов и защиту иммунных тканей (спленоцитов) от деструкции митохондрии и развития липоаптоза.

#### Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

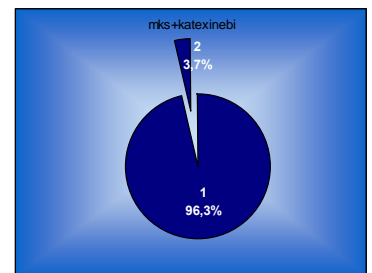
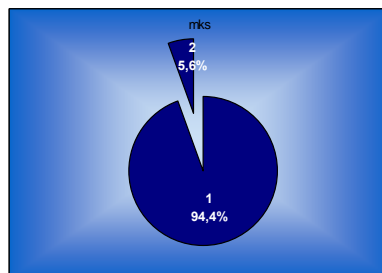
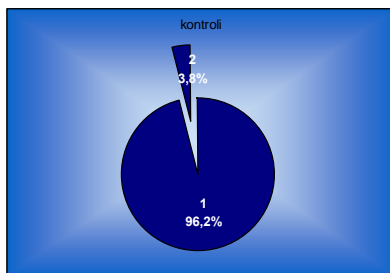
1. Эффективность катехинов зеленого чая при коррекции алиментарного ожирения в эксперименте. Georgian Medical News №9(126) сентябрь 2005, Стр 61-63 (соавт. Саникидзе Т.В., Есаиашвили М.В., Чхиквишвили И.Д., Датунашвили И.Т.)
2. Effect of preparations on the intensity of weight gaining and lipid metabolism parameters during experimental alimentary obesity. Annals of Biomedical research and Education, Tbilisi State Medical University, Vol 5, Issue 1, July-September 2005, p. 14-17 (co-avt Sikharulidze M., Esaiashvili M., Chkhikvishvili I., Tkhilava N., Ekaladze E., Machavariani M.)
3. Нарушение окислительного метаболизма печени при экспериментальном алиментарном ожирении и его коррекция. Georgian Medical News №2(131) февраль 2006, Стр 85-87 (соавт. Есаиашвили М.В., Чхиквишвили И.Д.)
4. Катехины зеленого чая – регуляторы апоптоза в спленоцитах крыс. Экспериментальная и клиническая медицина №4(29) март 2006, стр 60-62

#### Воздействие катехинов на интенсивность прибавления веса ( $\Delta g$ ) у крыс, находящихся на разной диете

|              | Неделя                      |                              |                              |                              |                             |                             |                             |                                     |
|--------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
|              | 1-0                         | 2-1                          | 3-2                          | 4-3                          | 5-4                         | 6-5                         | 7-6                         | 7-1                                 |
| Контроль     | 9,0±1,7                     | 12,0±3,0                     | 13,0±3,0                     | 7,0±1,5                      | 3,0±1,5                     | 3,0±1,5                     | 4,0±1,5                     | <b>42,0±1,0</b>                     |
| ВКП          | 11,0±3,5<br>P <sub>k</sub>  | 16,0±2,5<br>P <sub>k</sub>   | 11,0±2,5<br>P <sub>k</sub>   | 8,0±2,5<br>P <sub>k</sub>    | 9,0±1,0<br>P <sub>k</sub>   | 7,0±0,7<br>P <sub>k</sub>   | 9,0±0,5<br>P <sub>k</sub>   | <b>60,0±2,6<br/>P<sub>k</sub></b>   |
| ВКП+катехины | 8,0±3,0<br>P <sub>mks</sub> | 16,0±3,0<br>P <sub>mks</sub> | 11,5±2,5<br>P <sub>mks</sub> | 14,5±2,5<br>P <sub>mks</sub> | 6,0±2,7<br>P <sub>mks</sub> | 6,5±0,7<br>P <sub>mks</sub> | 5,0±0,5<br>P <sub>mks</sub> | <b>69,0±3,0<br/>P<sub>mks</sub></b> |



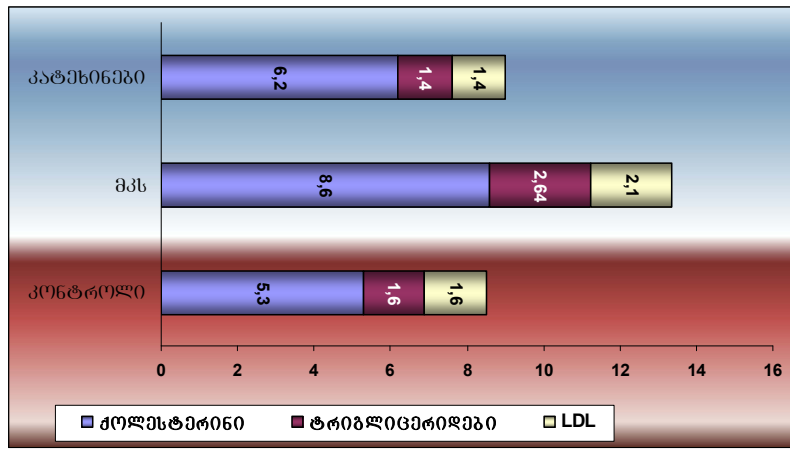
**Воздействие катехинов на интенсивность прибавления парагонадного жира (г) у крыс, находящихся на высококалорийной диете**



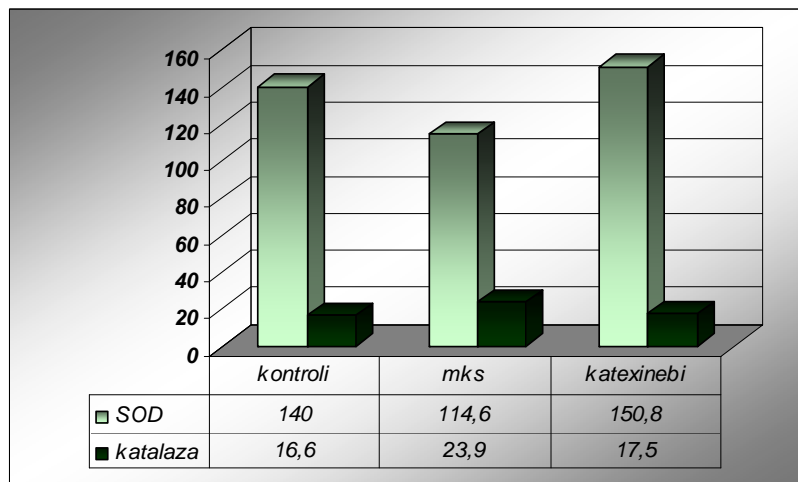
**Воздействие катехинов зеленого чая на содержание общего холестерина, триглицеридов и липопротеидов в крови у крыс, находящихся на высококалорийной диете**

|                              | Контроль<br>1 | ВКП<br>2                            | ВКП+катехины<br>3                                            |
|------------------------------|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Общий Холестерол<br>(ммол/л) | 5,3±1,5       | 8,6±2,1<br>p <sub>12</sub> <0,001   | 6,2±1,3<br>p <sub>13</sub> <0,05<br>p <sub>23</sub> <0,001   |
| Триглицериды (ммол/л)        | 1,6±0,8       | 2,64±1,13<br>p <sub>12</sub> <0,001 | 1,4±0,9<br>p <sub>12</sub> <0,01<br>p <sub>23</sub> <0,001   |
| LDL<br>(mg/dl) (მგ/დლ)       | 121,0±3,2     | 158,0±5,1<br>p <sub>12</sub> <0,001 | 104,7±5,3<br>p <sub>13</sub> <0,01<br>p <sub>23</sub> <0,001 |
| HDL<br>(მგ/დლ)               | 78,7±3,0      | 67,5±3,7<br>p <sub>12</sub> <0,001  | 81,05±3,7<br>p <sub>13</sub> <0,01<br>p <sub>23</sub> <0,001 |





Воздействие катехинов зеленого чая на активность антиоксидантных ферментов крови у крыс, находящихся на высококалорийной диете



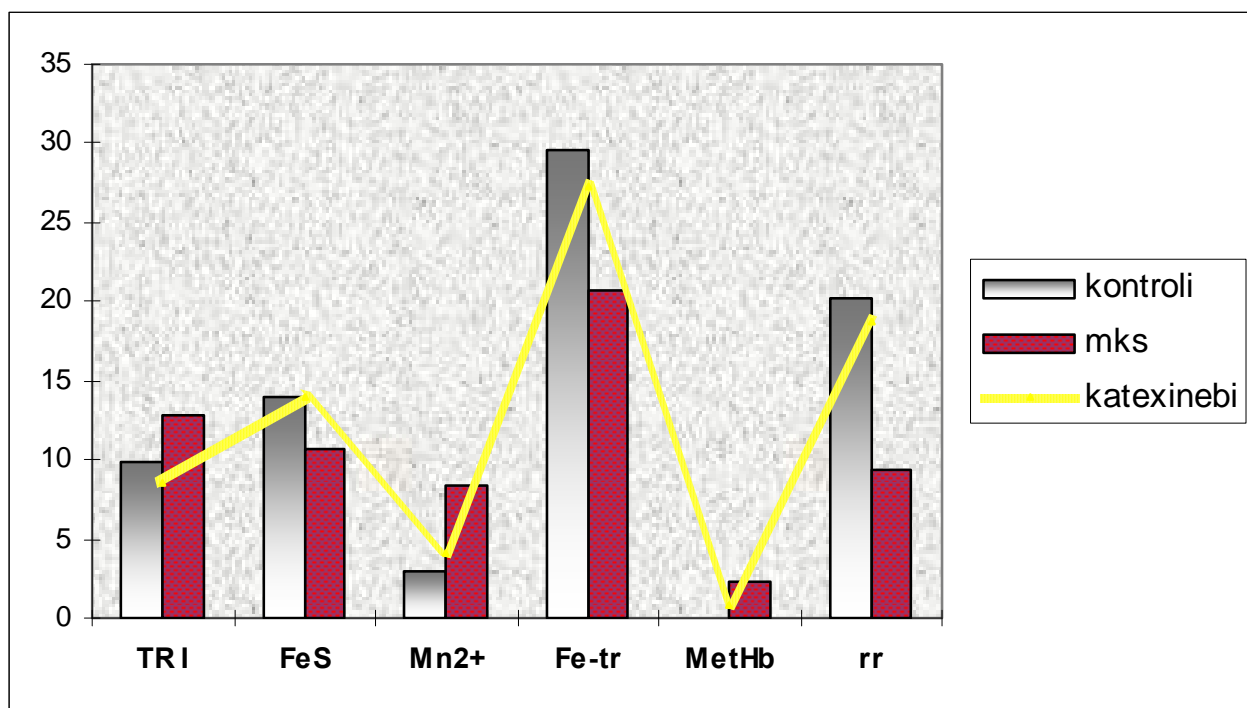
Воздействие катехинов зеленого чая на интенсивность парамагнитных центров крови у крыс, находящихся на высококалорийной диете

|                          | NO<br>g=2,01<br>1(მმ/მც)          | O <sub>2</sub> <sup>-</sup><br>g=2,00<br>1(მმ/მც) | LOO <sup>·</sup><br>g=2,00<br>1(მმ/მც) | ცპ-cp<br>g=2,05<br>1(მმ/მც)        | Fe <sup>3+</sup> -<br>ტრანსფ.<br>g=4,2<br>1(მმ/მც) | Mn <sup>2+</sup><br>g=2,14<br>1(მმ/მც) | MetHb<br>g=6,0<br>1(მმ/მც)        |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Контроль</b>          | 16,0±0,5                          | -                                                 | -                                      | 21,0±1,5                           | 28,0±1,4                                           | -                                      | -                                 |
| <b>ВКП</b>               | 14,0±0,5<br>P <sub>12</sub> <0,01 | 4,5±0,7<br>P <sub>23</sub> <0,001                 | 15,0±1,5<br>P <sub>23</sub> <0,01      | 16,5±2,0<br>P <sub>12</sub> <0,001 | 25,1±1,9<br>P <sub>12</sub> <0,001                 | 8,0±0,5<br>P <sub>23</sub> <0,001      | 5,3±1,5<br>P <sub>23</sub> <0,001 |
| <b>ВКП+катехин<br/>ы</b> | 15,5±0,6<br>P <sub>14</sub> >0,1  | -                                                 | -                                      | 20,0±1,8<br>P <sub>13</sub> >0,1   | 27,3±1,1<br>P <sub>13</sub> >0,1                   | 3,0±1,0<br>P <sub>23</sub> <0,001      | 1,5±0,6<br>P <sub>23</sub> <0,001 |

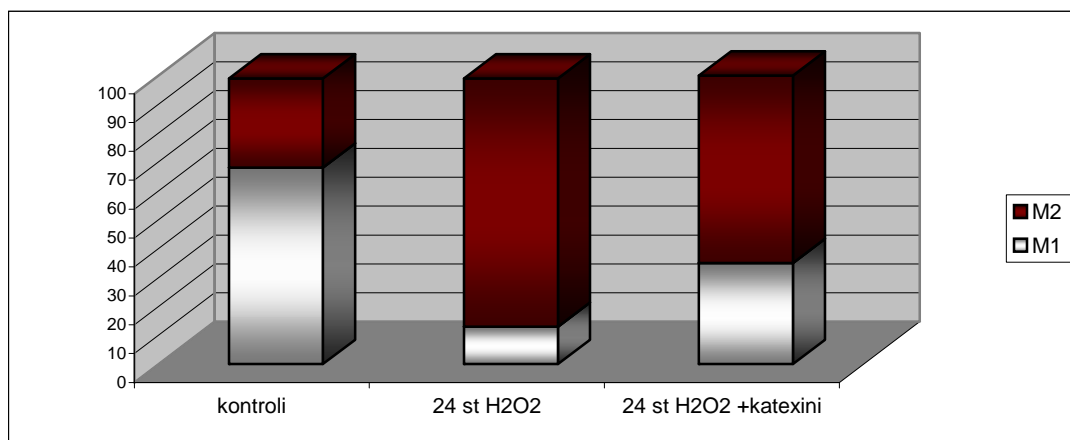
**Воздействие катехинов зеленого чая на интенсивность парамагнитных центров крови у крыс, находящихся на высококалорийной диете**

**Воздействие катехинов зеленого чая на интенсивность парамагнитных центров селезенки у крыс, находящихся на высококалорийной диете**

|                     | <b>Mn<sup>2+</sup></b><br><b>g<sub>1</sub>=2,14</b><br>1(∂∂/∂∂) | <b>Fe<sup>3+</sup>-tr</b><br><b>g=4,2</b><br>1(∂∂/∂∂)    | <b>MetHb</b><br><b>g=6,0</b><br>1(∂∂/∂∂)                | <b>FeS</b><br><b>g<sub>2</sub>=1,94</b><br>1(∂∂/∂∂)      | <b>σ.б.</b><br><b>G=2,005</b>                           |                                                          | <b>rr</b><br><b>g=2,005</b><br>1(∂∂/∂∂)                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                     |                                                                 |                                                          |                                                         |                                                          | I 1(∂∂/∂∂)                                              | ΔH (Hs)                                                  |                                                           |
| <b>Контроль</b>     | 3,0±0,2                                                         | 29,6±0,8                                                 | -                                                       | 14,0±0,8                                                 | 9,8±0,4                                                 | 12,3±0,5                                                 | 20,2±1,5                                                  |
| <b>ВКП</b>          | 8,3±0,5<br>P <sub>12</sub> >0,1                                 | 20,7±0,6<br>P <sub>12</sub> <0,001                       | 2,3±0,6<br>P <sub>12</sub> <0,001                       | 10,7±0,6<br>P <sub>12</sub> <0,001                       | 12,89±1,5<br>P <sub>12</sub> <0,001                     | 15,2±0,4<br>P <sub>12</sub> >0,1                         | 9,3±1,8<br>P <sub>12</sub> <0,001                         |
| <b>ВКП+катехины</b> | 4,1±0,2<br>2p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> >0,1        | 27,3±0,7<br>p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> >0,1 | 0,8±0,7<br>p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> >0,1 | 13,9±0,7<br>p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> >0,1 | 8,6±0,7<br>p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> >0,1 | 11,9±0,5<br>p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> >0,1 | 18,7±1,8<br>p <sub>13</sub> >0,1<br>P <sub>23</sub> <0,01 |



## Воздействие катехинов зеленого чая на апоптозную активность клеточной культуры спленоцитов



## Флюорограмма клеточной культуры спленоцитов

