

На правах рукописи

Приходько Вероника Александровна

**ВЛИЯНИЕ ОРНИТИНА И ЭМПАГЛИФЛОЗИНА НА ГЕПАТО-НЕЙРОНАЛЬНЫЕ
НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ**

3.3.6. — Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Оковитый Сергей Владимирович**

Официальные оппоненты:

Волчегорский Илья Анатольевич – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, заведующий кафедрой.

Саватеева-Любимова Татьяна Николаевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория безопасности лекарственных средств, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12 по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12 и на сайте <https://iemsfb.ru/external/prihodko-va/>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Мухин Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — это хроническое заболевание, при котором происходит избыточное накопление липидов в гепатоцитах в отсутствие повреждающего действия алкоголя и других токсических веществ. По современным оценкам, до 25% мирового населения страдают НАЖБП, что делает ее основной причиной хронической патологии печени (Younossi, Z. M., Henry, L., 2021). В Российской Федерации в 2014 г. НАЖБП выявлялась более чем у трети (37,3%) взрослого населения (Лазебник, Л. Б. [и др.], 2021). Ожидается, что НАЖБП и, в частности, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) станут наиболее частыми причинами развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, а также потребности в трансплантации печени в ближайшем будущем (Pais, R. [et al.], 2016).

Помимо метаболических расстройств, известен ряд психоневрологических и периферических нейрональных нарушений, ассоциированных с НАЖБП. Так, у 53% больных обнаруживаются признаки субклинической депрессии, а у 14% — клинической (Youssef, N. A. [et al.], 2013). Некоторые исследователи полагают, что те или иные когнитивные нарушения осложняют течение НАЖБП практически у всех больных, из которых половина испытывают их в легкой форме, а другая половина — в среднетяжелой или тяжелой (Newton, J. L., 2010). Тревожность и перепады настроения у таких пациентов часто сопровождаются повышенной утомляемостью и хронической усталостью (Moretti, R. [et al.], 2019). Кроме этого, в число потенциальных системных осложнений НАЖБП входит периферическая полинейропатия, наряду с миостеатозом, саркопенией и явлениями липотоксичности свободных жирных кислот лежащая в основе развития сенсомоторных нарушений и снижения физической работоспособности (Gonzalez, A. [et al.], 2020).

К лекарственным средствам, применение которых может быть показано у больных НАЖБП, относятся гепатопротекторы, гипогликемизирующие и гиполипидемические средства (Лазебник, Л. Б. [и др.], 2021). В настоящее время большинство фармакологических исследований направлено на оценку способности этих препаратов восстанавливать биохимические функции и нормальную гистоморфологическую картину печени, в то время как их эффективность в отношении психоневрологических осложнений НАЖБП остается весьма мало изученной. В качестве фармакологических агентов, потенциально способных корригировать вышеперечисленные нейрональные нарушения, среди прочих, представляют интерес L-орнитина L-аспартат (LOLA) — препарат с гепатопротекторной и гипоаммониемической активностью, — и эмпаглифлозин (EMPA) — ингибитор Na^+ /глюкозного котранспортера-2, противодиабетическое средство с широким рядом плеойтропных эффектов.

Степень разработанности темы исследования. В последнее время психоневрологические осложнения болезней печени, включая НАЖБП/НАСГ, привлекают все большее внимание исследователей. Установлено, что НАЖБП ассоциирована с повышенным риском развития тревожных, депрессивных, тревожно-депрессивных расстройств, нарушений восприятия, памяти и внимания, повышенной утомляемостью и снижением физической работоспособности (Youssef, N. A. [et al.], 2013; Moretti, R. [et al.], 2019; Colognesi, M. [et al.], 2020).

Значительно меньше исследований посвящено проявлениям дисфункции периферической нервной системы на фоне НАЖБП. Показано, что НАСГ является независимым фактором риска развития и прогрессирования диабетической полинейропатии (Mantovani, A. [et al.], 2017; Greco, C. [et al.], 2021). Кроме этого, частым осложнением цирроза печени является симметричная сенсомоторная полинейропатия с преобладанием поражения по аксональному типу, приблизительно в 2/3 случаев сочетанная с автономной нейропатией (Chaudhry, V. [et al.], 1999; Jain, J. [et al.], 2014). В настоящее время отсутствуют общепринятые экспериментальные модели центральных и периферических нейрональных осложнений прецирротической НАЖБП, которые обладали бы адекватной воспроизводимостью и клинической релевантностью.

ЕМРА, селективный ингибитор Na^+ /глюкозного котранспортера-2 (SGLT-2), является средством с преимущественно противодиабетической активностью, однако обладает широким спектром плеiotропных эффектов (Pawlos, A. [et al.], 2021; Krasnova, M., [et al.], 2020). По данным экспериментальных работ, ЕМРА обладает антиоксидантной и антиапоптотической активностью, а также косвенно подавляет активацию звездчатых клеток печени и клеток Купфера, что в сочетании с прямыми метаболическими эффектами обуславливает его гепатопротекторные свойства (Nasiri-Ansari, N. [et al.], 2021). Нейропротекторная и прокогнитивная активность ЕМРА была подтверждена на животных моделях сахарного диабета II типа (Lin, B. [et al.], 2014) и болезни Альцгеймера (Hierro-Vujalance, C. [et al.], 2020), а также в нескольких небольших клинических исследованиях (Perna, S. [et al.], 2018; Mone, P. [et al.], 2022). Применение ЕМРА у грызунов сопровождалось улучшением пространственной обучаемости и функции гиппокамповозависимых видов памяти (Lin, B. [et al.], 2014; Hierro-Vujalance, C. [et al.], 2020), а у пожилых пациентов с СД-II — улучшением общего когнитивного статуса и снижением утомляемости (Perna, S. [et al.], 2018; Mone, P. [et al.], 2022).

Для LOLA известно наличие гипоаммиемической, противовоспалительной, антиапоптотической, антицитолитической и анстистеатозной активности (Butterworth, R. F., Canbay, A., 2019; Canbay, A., Sowa, J.-P., 2019). В многочисленных экспериментальных

и клинических исследованиях было показано положительное влияние LOLA на минимальную (МПЭ) и явную формы печеночной энцефалопатии (ЯПЭ), а также выраженность саркопении и печеночную гемодинамику (Butterworth, R. F., McPhail, M. J. W., 2019). Применение LOLA позволяет улучшить состояние памяти, визуального восприятия, скорости психомоторных реакций у больных с МПЭ (Butterworth, R. F. [et al.], 2018; Pasha, Y. [et al.], 2018), а также снизить риск прогрессии МПЭ до ЯПЭ (Butterworth, R. F., 2020), уменьшить симптомы ЯПЭ (Abid, S. [et al.], 2011) и сократить время госпитализации больных (Abdo-Francis, J. M. [et al.], 2010). Тем не менее, подробных исследований LOLA и ЕМРА в качестве нейропротекторных, прокогнитивных и/или психотропных средств при курсовом применении на прецирротических стадиях НАЖБП не проводилось.

Целью настоящего исследования является оценка влияния орнитина аспартата и эмпаглифлозина на выраженность нейрональных нарушений и физическую работоспособность при экспериментальном стеатогепатите.

Задачи исследования:

1. Осуществить модификацию и оценку экспериментальной модели нейрональных нарушений у мышей C57Bl/6, ассоциированных с алиментарно-токсическим стеатогепатитом;
2. Исследовать влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на морфологическую картину печени, скелетных мышц и седалищного нерва животных при экспериментальном стеатогепатите;
3. Исследовать влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на проявления когнитивно-поведенческого и мнестического дефицита у животных при экспериментальном стеатогепатите;
4. Исследовать влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на нарушения нейромышечной передачи и состояние физической работоспособности животных при экспериментальном стеатогепатите.

Научная новизна исследования. В работе впервые описана модификация модели центральных и периферических неврологических осложнений алиментарно-токсического стеатогепатита. Установлено, что НАСГ у мышей C57Bl/6 сопровождается увеличением тревожности с явлениями ажитации, транзиторным снижением краткосрочной распознающей памяти и прогрессирующим ослаблением кратко- и долгосрочной пространственной памяти.

Предложен новый метод статистической обработки, позволяющий проводить полуколичественный анализ данных гистологического исследования, полученных с

использованием балльных шкал. Обработка данных с использованием метода позволяет оценить достоверность различий между распределениями частот встречаемости балльных оценок в параллельных группах.

Показано, что НАСГ ассоциирован с нарушениями параметров нейромышечной передачи, позволяющими предположить наличие сочетанного поражения периферических нервов по аксональному и демиелинизирующему типу. Помимо этого, на фоне экспериментального НАСГ и фиброза печени наблюдается снижение физической работоспособности животных и уменьшение эффективности процессов постнагрузочного восстановления преимущественно центрального генеза.

Выявлено, что курсовое применение LOLA уменьшает выраженность повреждения печени и предупреждает развитие фиброза по данным гистоморфологического исследования. LOLA обладает многофазным анксиотропным эффектом, переходящим в умеренно выраженный анксиолитический на более поздних этапах формирования патологии. LOLA также предупреждает транзиторные нарушения распознающей памяти и способствует сохранению пространственной памяти животных, восстанавливает скорость проведения нервного импульса по периферическим нервам и увеличивает эффективность процессов краткосрочного постнагрузочного восстановления.

Продемонстрировано, что ЕМРА при курсовом применении уменьшает выраженность повреждения печени и предупреждает развитие фиброза по данным гистоморфологического исследования. ЕМРА обладает многофазным анксиотропным эффектом, переходящим в выраженный анксиолитический на более поздних этапах формирования патологии. Помимо этого, ЕМРА способствует сохранению распознающей и пространственной памяти экспериментальных животных и восстанавливает скорость проведения нервного импульса по периферическим нервам.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлено, что гистологически верифицированная экспериментальная НАЖБП сопровождается стойкими когнитивно-поведенческой дисфункцией, расстройствами гиппокамповидных видов памяти, нарушениями нейромышечной передачи и ухудшением физической работоспособности преимущественно центрального генеза.

Адаптированный алгоритм полуколичественного анализа данных гистологического исследования может быть использован для оценки выраженности гистологических изменений в исследуемом материале, а также сравнения и определения статистической значимости различий оценок морфологической картины в параллельных группах.

Результаты исследования позволяют рекомендовать LOLA и ЕМРА для дальнейшего изучения в качестве потенциальных средств фармакологической коррекции

психоневрологических нарушений, ассоциированных с НАЖБП. LOLA представляет интерес в качестве потенциального фармакологического агента, уменьшающего выраженность повреждения печени, корригирующего отдельные психоэмоциональные нарушения, проявления мнестической дисфункции, нарушения нейромышечной передачи, утомляемости и процессов постнагрузочного восстановления при курсовом приеме на прецирротических стадиях НАЖБП. ЕМРА представляет интерес в качестве потенциального лекарственного средства, уменьшающего выраженность повреждения печени, корригирующего проявления тревожно-депрессивных расстройств, нарушения памяти и функционального состояния нейромоторного аппарата на прецирротических стадиях НАЖБП.

Связь с планом научно-исследовательских работ университета и отраслевыми программами. Поиск и разработка новых средств с нейропротекторной активностью рассматривается как одна из приоритетных задач современной российской медицинской науки (научные платформа медицинской науки «Неврология» и «Фармакология») согласно Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 апреля 2013 г. №281 «Об утверждении научных платформ медицинской науки». Разработка и исследование новых средств фармакологической коррекции системных осложнений метаболических патологий является одним из приоритетных направлений фундаментальных и поисковых научных исследований (3.2.4. Фармакология и фармация (фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности)) согласно Распоряжению от 31 декабря 2020 г. №3684-р Об утверждении Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

Методология и методы исследования. Исследование проводилось в период с 2019 по 2022 гг. с использованием современных методов экспериментальной медицины и фармакологии, включая гистоморфологическое исследование, поведенческие тесты («Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Черно-белая камера», «Спонтанное чередование в Т-лабиринте», «Распознавание нового объекта»), методы анализа функции нейромоторного аппарата (стимуляционная электронейромиография) и оценки физической работоспособности лабораторных животных (тесты «Вынужденное плавание», «Трехнагрузочная плавательная проба»). Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных в соответствии со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 81 от

03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Алиментарно-токсический стеатогепатит у мышей ассоциирован с увеличением тревожности, ослаблением распознающей и пространственной памяти, нарушениями нейромышечной передачи и ухудшением толерантности к аэробно-анаэробным физическим нагрузкам;
2. Орнитина аспартат при курсовом применении оказывает отсроченный анксиолитический эффект, способствует сохранению распознающей и пространственной памяти, восстанавливает скорость проведения нервного импульса по периферическим нервам и увеличивает эффективность процессов краткосрочного постнагрузочного восстановления;
3. Эмпаглифлозин при курсовом применении оказывает отсроченный анксиолитический эффект, способствует сохранению распознающей и пространственной памяти и восстанавливает скорость проведения нервного импульса по периферическим нервам.

Личный вклад автора. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования. Автору принадлежит ведущая роль в проведении исследования на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационного исследования использованы в научно-исследовательской деятельности кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО СПХФУ в рамках исследований лекарственных средств с гепатопротекторной и нейропротекторной активностью. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс по учебной дисциплине «Фармакология» в рамках программы высшего образования — программы специалитета по направлению подготовки 33.05.01 Фармация, профиль Фармация, очной формы обучения.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методик, соответствующих поставленным целям и задачам исследования. Сформулированные выводы подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературных данных, корректностью статистической обработки полученных результатов. Основные результаты

работы были доложены на XVI и XVII научно-практических межрегиональных конференциях «Биомедицина и биомоделирование» (Московская область, Санкт-Петербург, Ростов-на-Дону, Россия; 2020 г., 2022 г.), X и XII Всероссийских научных конференциях студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация — потенциал будущего» (Санкт-Петербург, Россия; 2020 г., 2022 г.), и международном конгрессе “The International Liver Congress-2021” (Лондон, Великобритания; 2021 г.), Международной фармацевтической конференции “Drug Development: From Design to Customer-2022” (Ереван, Армения; 2022 г.) и XVIII Международной Пироговской научной медицинской конференции (Москва, Россия; 2023 г.).

Объем и структура диссертации. Полный объем диссертации составляет 184 страницы, в том числе 67 рисунков и 2 таблицы. Диссертация включает введение, обзор литературы (глава 1, с. 16-44), главу материалов и методов исследований (глава 2, с. 45-58), главу с результатами собственных исследований и их обсуждением (глава 3, с. 59-147), заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и список использованных источников. Литературный указатель включает 269 источников, из них 251 — на иностранном (английском) языке.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 — в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук согласно перечню ВАК.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение научной работы.

В первой главе (обзоре литературы) изложена актуальная информация об эпидемиологии, этиопатогенезе, центральных и периферических неврологических осложнениях неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), современным подходам к их фармакотерапии, а также механизмах действия и спектре фармакологической активности орнитина аспартата (LOLA) и эмпаглифлозина (ЕМРА). По результатам анализа литературных данных сделан вывод об актуальности оценки LOLA и ЕМРА в качестве потенциальных средств фармакокоррекции центральных и периферических нейрональных осложнений НАЖБП.

Во второй главе представлены материалы и методы исследований. Эксперименты были выполнены на 156 молодых взрослых мышах-самцах линии C57Bl/6. Для оценки динамики ранних и отдаленных неврологических осложнений НАСГ в исследование были включены 2 экспериментальные серии, представленные 3- и 6-месячными периодами моделирования НАСГ соответственно. В каждую экспериментальную серию были включены группы животных: 1) Интакт (здоровые животные); 2) Контроль (животные с экспериментальным НАСГ, не получавшие лечения); 3) LOLA (животные с экспериментальным НАСГ, получавшие терапию LOLA в дозе 1.5 г/кг/д перорально); 4) ЕМРА (животные с экспериментальным НАСГ, получавшие терапию ЕМРА в дозе 10 мг/кг/д перорально). Моделирование НАСГ осуществляли с использованием ранее описанной комбинированной модели, сочетающей использование высокожировой, высокоуглеводной («западной») диеты и введение гепатотоксиканта тетрахлорметана в дозе 0.32 мг/кг 1 р/нед внутривентриально.

Для оценки проявлений когнитивно-поведенческой дисфункции по окончании 1-го, 2-го и 3-го мес эксперимента 1, а также по окончании 6-го мес эксперимента 2 животных последовательно тестировали в тестах «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Черно-белая камера» (ЧБК). Для оценки состояния краткосрочной пространственной и распознающей памяти в эксперименте 1 использовали тесты «Спонтанное чередование в Т-лабиринте» (ТЛ-СЧ) и «Распознавание нового объекта» (РНО) соответственно. Для оценки кратко- и долгосрочной пространственной памяти в эксперименте 2 использовали тест «Лабиринт Барнс» (ЛБ).

Физическую работоспособность животных оценивали по окончании 1-го, 2-го и 3-го мес эксперимента 1, а также по окончании 6-го мес эксперимента 2 с помощью тестов «Вынужденное плавание» (ВП) и «Трехнагрузочная плавательная проба» (ТПП) с использованием грузов массой 7,5% от массы тела для обеспечения смешанной аэробно-анаэробной нагрузки. Исследование нейромышечной передачи и биоэлектрической активности скелетных мышц проводили по окончании 3-го мес эксперимента 1 методом стимуляционной электронейромиографии (ЭНМГ), регистрируя моторные ответы (М-ответы) *m. gastrocnemius* на стимуляцию *n. ischiadicus* слева и *m. biceps brachii* на стимуляцию *n. musculocutaneus* справа.

После проведения всех экспериментов животных подвергали эвтаназии и забирали ткань печени для проведения гистоморфологического исследования с использованием окраски гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по Ван Гизону в соответствии с общепринятыми протоколами. Оценивали выраженность гистоморфологических признаков НАЖБП: воспаления, жировой дистрофии гепатоцитов (ЖДГ), баллонной

(белковой) дистрофии гепатоцитов (БДГ), холестаза, некроза и фиброза, включая перипортальный сегментарный фиброз (ППСФ), фиброз центральных вен (ФЦВ), внутريدольковый перисинусоидальный фиброз (ВДПСФ) и наличие фиброзных септ (ФС), а также наличие патологической клеточной инфильтрации паренхимы. Стадирование фиброза печени осуществляли по шкале METAVIR-F. Выражаем глубокую благодарность руководителю отдела тканевых и патоморфологических методов исследования ФГБУ НИИДИ ФМБА России д.м.н. Кареву В.Е. за помощь в проведении исследования.

Анализ выживаемости и оценку относительного риска летального исхода проводили с помощью методов Каплана-Мейера и Мантела-Хенсела. Значимость различий между распределениями частот встречаемости шкалированных гистологических оценок определяли с помощью расширенного точного теста Фишера с поправкой Холма-Бонферрони для множественных сравнений в программной среде R 4.1.1 с интегрированной средой разработки RStudio 1.4.1717, а также пакета функций RVAideMemoire 0.9-81.

В третьей главе представлены результаты проведенного исследования. Экспериментальная НАЖБП у мышей C57Bl/6 сопровождалась статистически значимым увеличением относительного риска летального исхода в 5.02 (95% ДИ: 1.68-14.96) и 6.48 (95% ДИ: 1.09-38.38) раз по сравнению со здоровыми особями для 3- и 6-месячного периодов моделирования соответственно. В обеих экспериментальных сериях наблюдалось резкое падение массы тела животных на начальных этапах с дальнейшим постепенным восстановлением до исходных значений, что, предположительно, отражало постепенную адаптацию обменных процессов к условиям моделирования НАЖБП.

Макро- и микроскопическая картина ткани печени животных контрольной группы соответствовала НАЖБП на стадиях НАСГ и фиброза по окончании 3-месячного периода моделирования и стадии НАСГ — по окончании 6-месячного периода моделирования. Во всех образцах ткани печени, полученных от животных, подвергнутых моделированию НАСГ в течение 3 мес, выявлялся различной степени тяжести токсический холестатический гепатит, в 40% случаев носивший гранулематозный характер. Медианная суммарная оценка в группе Контроль по окончании 3 мес моделирования составила 17 баллов (95% ДИ: 16-18), что достоверно превышало результат группы Интакт (3 балла, 95% ДИ: 2-4; $p < 0.01$). Интегральные оценки выраженности фиброза по шкале METAVIR-F в 3 случаях (30%) были определены как F3, в 6 случаях (60%) — F2, и только в 1 случае (10%) — F1.

Динамика гистоморфологических признаков свидетельствовала о полном регрессе некротических и фибротических изменений ткани печени в долгосрочной перспективе (6 мес) моделирования НАСГ. Гистоморфологическая картина печени контрольных животных по окончании 6 мес моделирования характеризовалась наличием выраженной

крупнокапельной ЖДГ и БДГ с общим распространением до 60%. Во всех случаях также была выявлена очаговая инфильтрация паренхимы печени полиморфноядерными лейкоцитами.

Результаты тестов ОП, ПКЛ и ЧБК свидетельствовали о наличии у животных с патологией печени когнитивно-поведенческих нарушений, характеризовавшихся нелинейной динамикой развития ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Через 3 и 6 мес от начала исследования отмечалось преобладание поведенческих реакций тревожного типа с явлениями положительного тигмотаксиса и гиперлокомоции; поведенческий фенотип в наибольшей степени соответствовал картине астеноневротического синдрома.

Проявления мнестического дефицита у мышей с экспериментальным НАСГ включали ослабление феномена спонтанного чередования, снижение способности к дискриминации объектов и ухудшение консолидации пространственных представлений в тесте ЛБ ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (рис. 1). Результаты тестов свидетельствовали о развитии транзиторного нарушения распознающей памяти на ранних (2 мес) этапах с последующей компенсацией и прогрессирующего ослабления пространственной памяти, предположительно, связанных с поражением гиппокампа и ассоциированных структур головного мозга на фоне экспериментального НАСГ.

При проведении ЭНМГ-исследования было обнаружено значительное снижение максимальных амплитуд и пороговых сил тока, а также увеличение латентности М-ответов мышц верхней и нижней конечностей ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (рис. 2). Выявленные изменения могут быть следствием дистрофии и частичной гибели двигательных единиц, развития аксональной гипервозбудимости и снижения проводимости периферических нервных волокон, в т.ч. вследствие их демиелинизации.

Экспериментальный НАСГ был ассоциирован со стойким снижением базовой толерантности к смешанным аэробно-анаэробным физическим нагрузкам ($p < 0.01$) с преобладанием в генезе центрального компонента. Одновременно наблюдалось уменьшение эффективности процессов срочной фазы постнагрузочного восстановления на ранних этапах моделирования патологии с ее последующей частичной компенсацией ($p < 0.05$) (рис. 3).

В группе LOLA доля погибших животных составляла 30.0% и 42.9%, в группе ЕМРА — 26.7% и 57.1% по окончании 3- и 6-месячного экспериментов соответственно. При оценке риска летального исхода относительно контрольной группы в течение 3 и 6 мес были получены значения 0.44 (95% ДИ: 0.20-0.99) и 1.27 (95% ДИ: 0.38-4.30) для LOLA и 0.36 (95% ДИ: 0.18-0.81) и 1.60 (95% ДИ: 0.52-4.89) для ЕМРА.

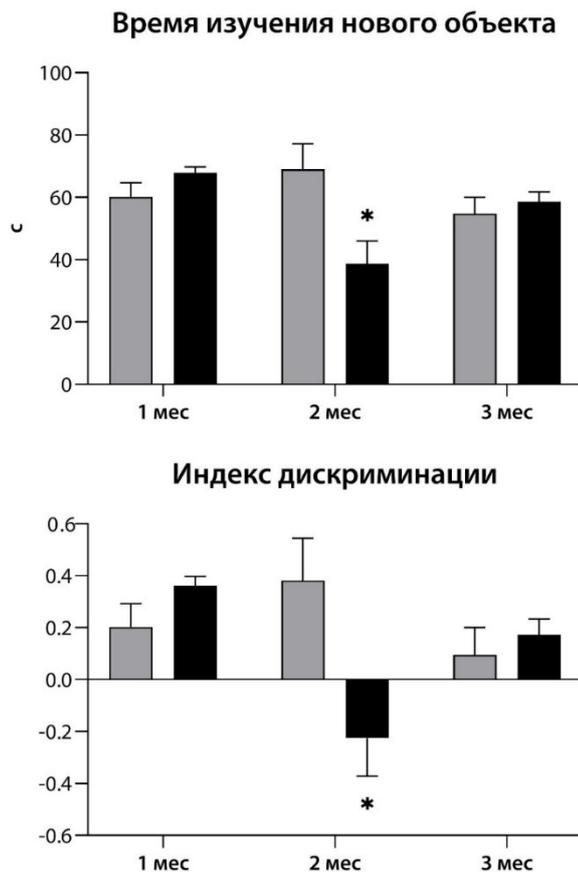


Рисунок 1. Результаты оценки краткосрочной распознающей памяти животных в тесте «Распознавание нового объекта». ■ — Интакт, ■ — Контроль, * — $p < 0.05$.

LOLA и EMPA достоверно снижали концентрацию аммиака в периферической крови на 38.8% и 31.1% по сравнению с Контролем ($p < 0.01$). LOLA также уменьшал содержание в крови лактата в среднем на 38.7% по сравнению с Контролем ($p < 0.05$).

Медианные суммарные оценки в группах LOLA и EMPA по окончании 3 мес моделирования составили 6 баллов (95% ДИ: 4-7) и 5 баллов (95% ДИ: 5-8) соответственно, что достоверно отличалось от результата контрольной группы (17 баллов, 95% 16-18; $p < 0.01$). При количественной оценке распределений балльных оценок статистически значимые различия между группами Контроль и LOLA были обнаружены для показателей: гепатит (1:3, $p < 0.01$), холестаз (1:2, 1:3, $p < 0.01$), некроз (0:2, $p < 0.05$; 0:3, $p < 0.01$), стадия фиброза по METAVIR-F (F0:F2, $p < 0.01$; F0:F3, $p < 0.05$), а также всех видов фибrotических изменений: ФЦВ (1:2, $p < 0.01$), ВДПСФ (0:1, $p < 0.05$) и ФС (0:2, $p < 0.01$; 0:3, $p < 0.05$). Значимые различия между группами Контроль и EMPA были обнаружены для показателей: гепатит (1:3, $p < 0.05$), холестаз (1:3, $p < 0.05$), некроз (0:2, $p < 0.05$; 0:3, $p < 0.01$), стадия

фиброза по METAVIR-F (F0:F2, $p < 0.01$; F0:F3, $p < 0.05$), ФЦВ (0:1, $p < 0.05$; 1:2, $p < 0.01$) и ФС (0:2, $p < 0.01$; 0:3, $p < 0.05$)

Таким образом, курсовая терапия LOLA или EMPA в течение 3 мес позволяла предупредить некротическое поражение гепатоцитов, значительно уменьшала выраженность воспалительного процесса, внутрипеченочного холестаза и фибротических изменений печени, а также полностью предупреждала развитие септального фиброза. Применение LOLA или EMPA в течение 6 мес также оказывало благоприятное влияние на выраженность воспалительных и дистрофических изменений ткани печени у животных с экспериментальным НАСГ.

Не было установлено статистически значимых эффектов LOLA или EMPA в отношении морфологической картины скелетной мышцы и *n. ischiadicus*.

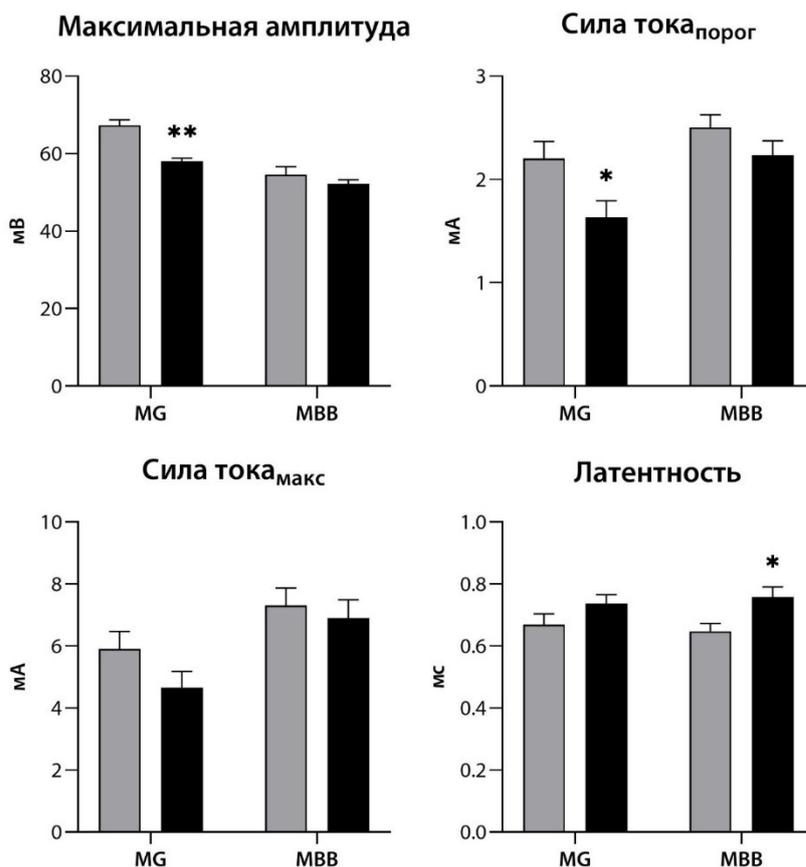


Рисунок 2. Основные параметры М-ответов *m. gastrocnemius* (MG) и *m. biceps brachii* (MBV) при электростимуляции *n. ischiadicus* и *n. musculocutaneus* соответственно. Сила тока_{порог} — пороговая сила тока, Сила тока_{макс} — сила тока, вызывающая М-ответ с максимальной амплитудой; ■ — Интакт, ■ — Контроль, * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$.

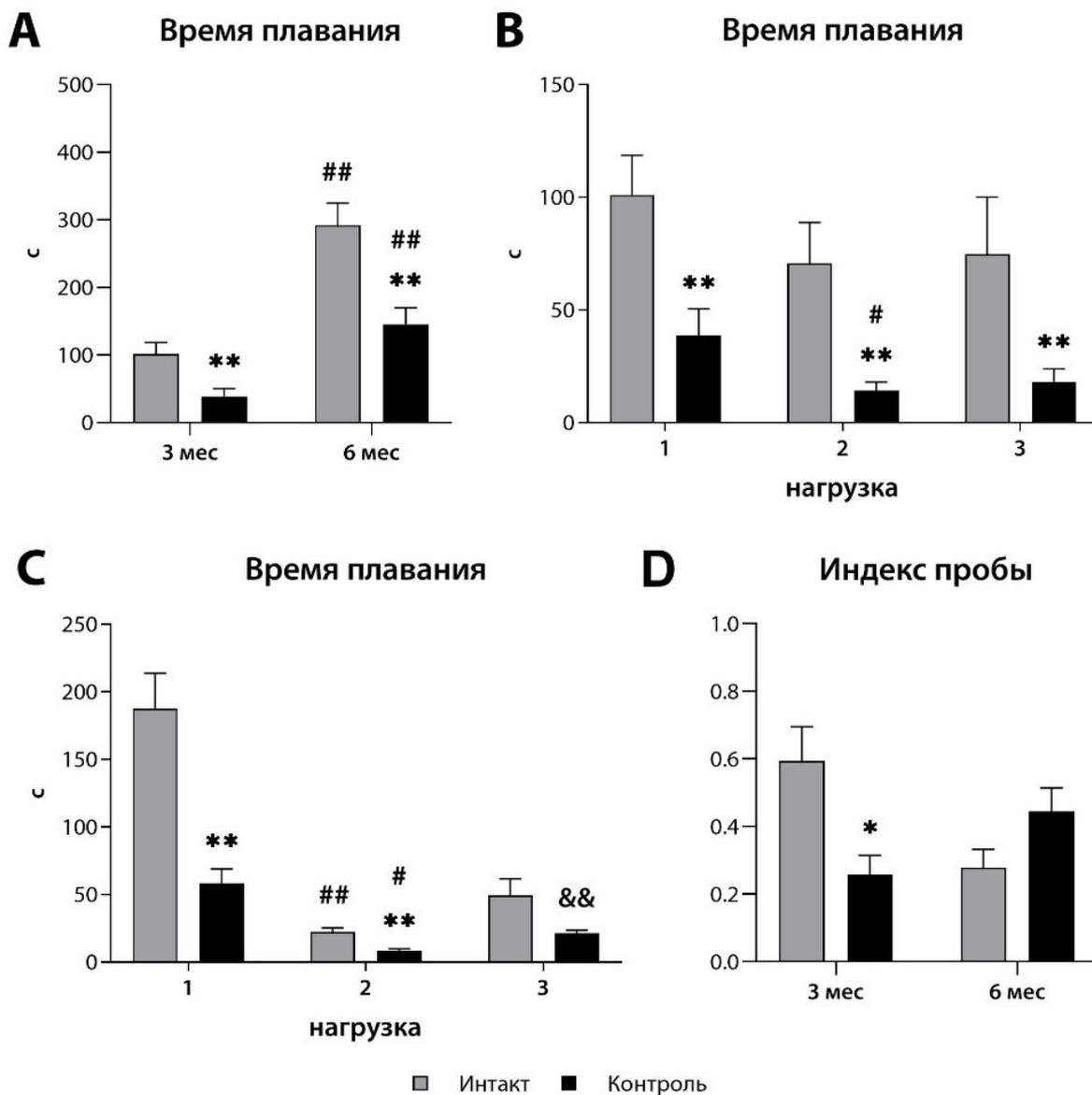


Рисунок 3. Результаты оценки физической работоспособности животных в тесте «Вынужденное плавание» (А), в тесте «Трехнагрузочная плавательная проба» через 3 мес (В) и 6 мес (С) от начала эксперимента, а также значения индекса пробы (D). **А:** ** — $p < 0.01$ по сравнению с Интактом; ## $p < 0.01$ по сравнению с 3 мес; **В, С, D:** * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с Интактом; # — $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с 1-й нагрузкой; && — $p < 0.01$ по сравнению со 2-й нагрузкой.

Когнитивно-поведенческие изменения, ассоциированные с применением LOLA, в тесте ОП имели нелинейную зависимость от длительности моделирования НАСГ и несколько фаз различного характера. На начальном этапе (1 мес) изменения в поведении животных были слабо выражены и неспецифичны. На промежуточном этапе эксперимента

(2 мес) было зафиксировано наибольшее влияние LOLA на поведение мышей в ОП, выражавшееся в психомоторной активации и гиперлокомоции.

В условиях экспериментального НАСГ у мышей ЕМРА обладал умеренным противотревожным действием через 3 мес и более выраженным — через 6 мес, в то время как на более ранних этапах (1-2 мес) его эффекты были изменчивы и малоспецифичны. Динамика их формирования в использованных нами тестах была в целом аналогична таковой в группе, получавшей LOLA, а также динамике развития когнитивно-поведенческого дефицита, ассоциированного с НАЖБП. Предположительно, такой характер развития центральных эффектов LOLA и ЕМРА может быть обусловлена сочетанием нескольких факторов: 1) прогрессированием основного заболевания и ассоциированных нарушений; 2) неадекватной адаптацией обменных процессов в организме животных к оказываемому внешнему воздействию; 3) сложным многофазным паттерном собственной психотропной активности соединений.

По данным тестов ТЛ-СЧ, РНО и ЛБ, применение LOLA способствовало компенсации транзиторного снижения краткосрочной распознающей памяти в ранний период и поддерживало консолидацию пространственной памяти через 6 мес моделирования патологии печени. ЕМРА способствовал компенсации транзиторного снижения краткосрочной распознающей памяти на ранних этапах, а также увеличивал эффективность консолидации аллоцентрической пространственной памяти (рис. 4).

В группе животных, получавших терапию LOLA, наблюдалось достоверное уменьшение максимальных амплитуд М-ответов *m. biceps brachii*, а также уменьшение латентности ответов обеих мышц на электростимуляцию ($p < 0.01$ во всех трех случаях). В группе животных, получавших терапию ЕМРА, наблюдалось статистически значимое увеличение максимальных амплитуд М-ответов *m. gastrocnemius* ($p < 0.01$). Таким образом, предположительно, применение LOLA и ЕМРА способно частично предотвратить поражение периферических нервов и дисфункцию нейромоторного аппарата, возникающие на фоне болезни печени (рис. 5).

У мышей с 3-месячной моделью НАСГ, получавших терапию LOLA, среднее значение индекса пробы (ИП) в тесте ТПП превышало таковое в контрольной группе в более чем 2.5 раз (0.66 против 0.26, $p < 0.05$), однако по окончании 6 мес моделирования значения этого показателя в двух группах практически не различались (0.63 против 0.45). Значения ИП в группе животных, получавших ЕМРА, по сравнению с контролем были значительно выше через 3 мес (0.61 против 0.26, $p < 0.05$) и ниже — через 6 мес моделирования НАСГ (0.20 против 0.45, $p < 0.05$) (рис. 6).

Таким образом, курсовое применение LOLA не оказывало заметного влияния на базовый уровень физической работоспособности мышей с НАСГ, но способствовало увеличению эффективности процессов краткосрочного восстановления. Применение EMPA не оказывало эффекта на толерантность животных к физическим нагрузкам.

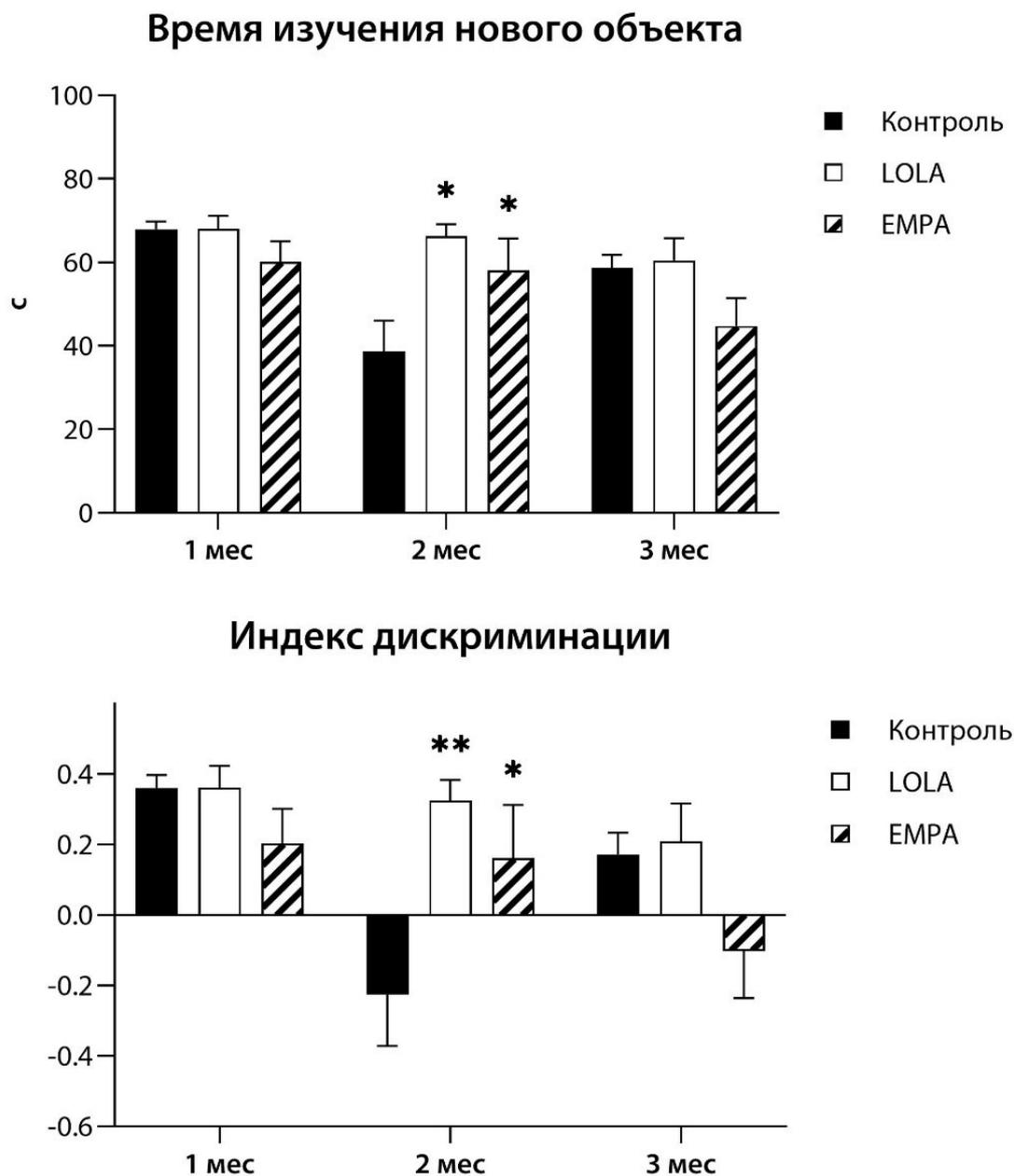


Рисунок 4. Влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на состояние краткосрочной распознающей памяти животных в тесте «Распознавание нового объекта» через 1, 2 и 3 мес от начала эксперимента. LOLA — орнитина аспартат; EMPA — эмпаглифлозин; * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с Контролем.

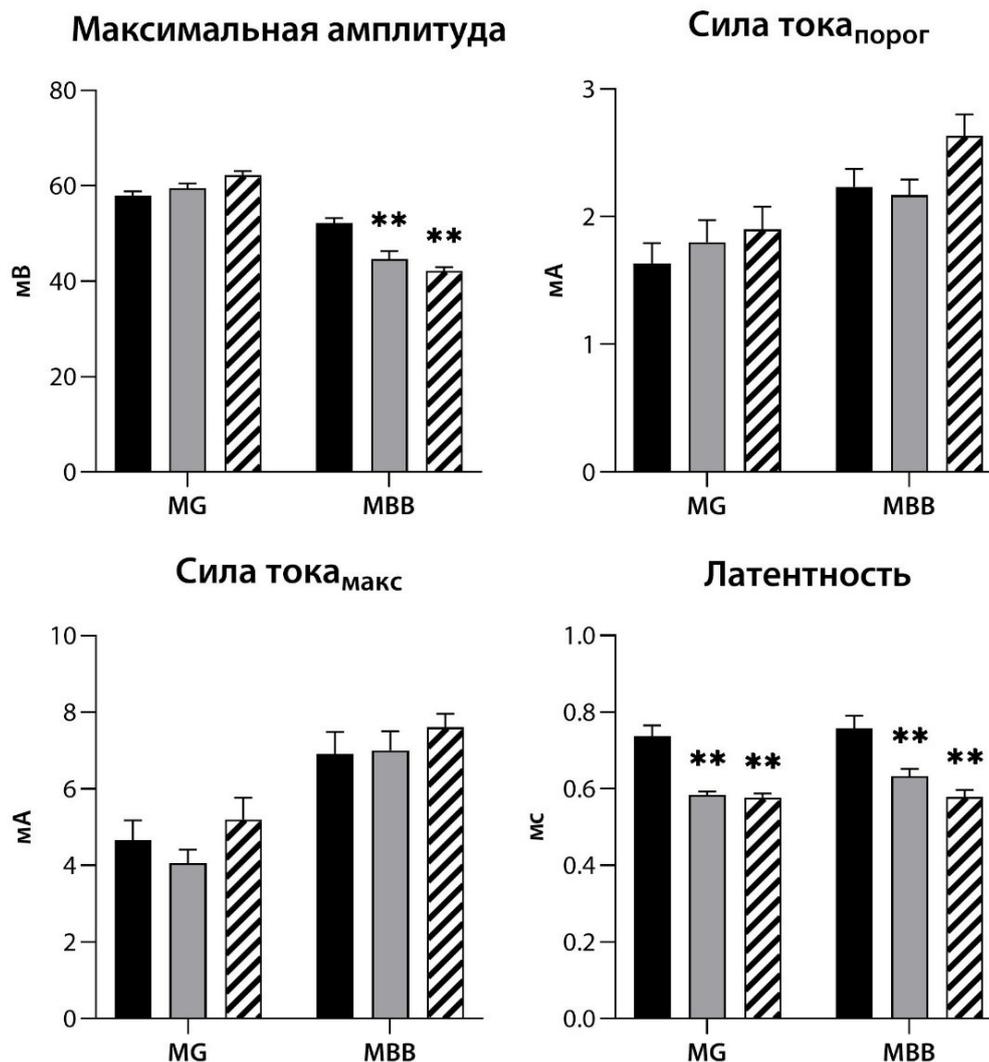


Рисунок 5. Основные параметры М-ответов *m. gastrocnemius* (MG) и *m. biceps brachii* (MBV) при электростимуляции *n. ischiadicus* и *n. musculocutaneus* соответственно. ■ — Контроль, ■ — орнитин аспартат, ▨ — эмпаглифлозин; Сила тока_{порог} — пороговая сила тока; Сила тока_{макс} — сила тока, вызывающая М-ответ с максимальной амплитудой; ** — $p < 0.01$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе осуществлена модификация алиментарно-токсического НАСГ у мышей. Полученная модель характеризовалась уровнем летальности 56.7% и 36.7% при длительности эксперимента 3 и 6 мес соответственно, что достоверно превышало уровень летальности среди здоровых животных ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Воспроизведение НАСГ сопровождалось характерными метаболическими нарушениями. Так, в контрольной группе наблюдалось значимое увеличение средних уровней аммиака периферической крови по сравнению с интактными животными ($p < 0.01$).

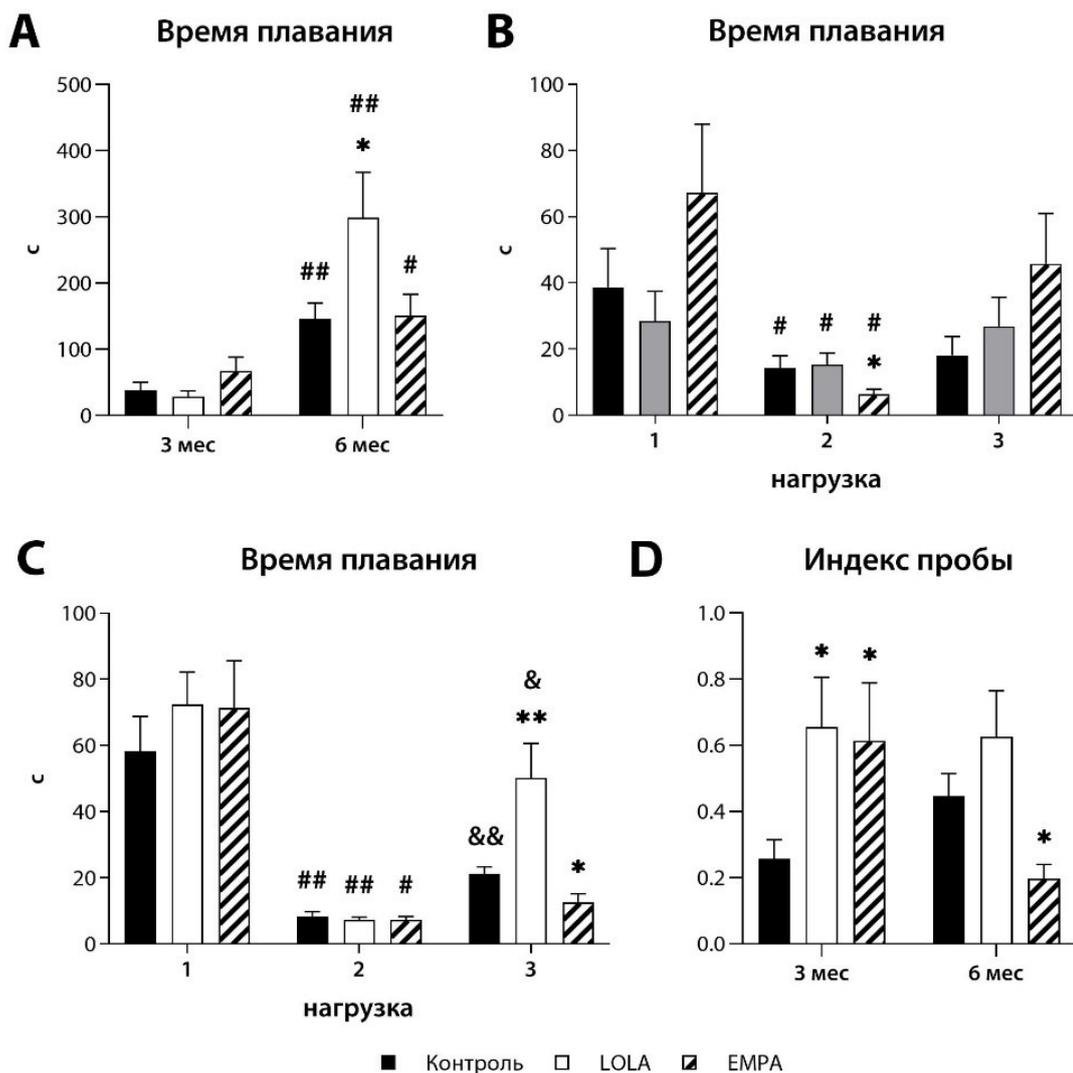


Рисунок 6. Влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на физическую работоспособность животных в тестах «Вынужденное плавание» (А), «Трехнагрузочная плавательная проба» через 3 мес (В) и 6 мес (С) от начала эксперимента, а также значения индекса пробы (D). LOLA — орнитин аспартат; EMPA — эмпаглифлозин; **А:** * — $p < 0.05$ по сравнению с Контролем; # — $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с 3 мес; **В, С, D:** * — $p < 0.05$ по сравнению с Контролем; # — $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с 1-й нагрузкой; & — $p < 0.05$, && — $p < 0.01$ по сравнению со 2-й нагрузкой.

Данные гистологического анализа свидетельствовали о наличии БДГ ($p < 0.05$, $p < 0.01$), холестаза ($p < 0.01$, $p < 0.05$), некроза ($p < 0.05$, $p < 0.01$), ФС ($p < 0.05$, $p < 0.01$) и стадии фиброза печени 2-3 по шкале METAVIR-F ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Морфологическая картина скелетной мышцы и *n. ischiadicus* в группе с НАСГ практически не отличалась от таковой у интактных животных.

В тестах ОП, ПКЛ и ЧБК животные с НАСГ демонстрировали нелинейную динамику изменений поведенческих реакций ($p < 0.05$, $p < 0.01$), что, предположительно, было связано с многофазным характером развития тревожного фенотипа у мышей. Наблюдаемые изменения поведения животных могут быть истолкованы как увеличение фоновой тревожности и/или сенситизация к аверсивному стимулу.

В тесте ТЛ-СЧ в группе с НАСГ наблюдалось прогрессирующее уменьшение частоты чередования, и через 3 мес от начала эксперимента различие между интактными и контрольными животными стало статистически значимым ($p < 0.01$). В тесте РНО мыши с патологией печени демонстрировали ухудшение распознавания объекта через 2 мес эксперимента ($p < 0.05$). Согласно полученным данным, НАСГ у мышей ассоциирован с транзиторным снижением краткосрочной распознающей и пространственной памяти на ранних этапах с последующей компенсацией.

В группе контрольных животных наблюдалось значительное снижение максимальных амплитуд ($p < 0.01$) и пороговых сил тока ($p < 0.05$) М-ответов *m. gastrocnemius*, а также увеличение латентности М-ответов *m. biceps brachii* ($p < 0.05$) на электрическую стимуляцию *n. ischiadicus* и *n. musculocutaneus* соответственно. В плавательных тестах мыши с НАСГ демонстрировали значительно ($p < 0.01$) меньшую толерантность к смешанным аэробно-анаэробным физическим нагрузкам как через 3, так и через 6 мес моделирования. При моделировании патологии печени наблюдалось снижение эффективности процессов срочной фазы постнагрузочного восстановления.

LOLA и ЕМРА достоверно снижали смертность животных в 3-месячном эксперименте ($p < 0.05$). Препараты снижали концентрацию аммиака в периферической крови по сравнению с Контролем ($p < 0.01$); LOLA также уменьшал содержание в крови лактата ($p < 0.05$).

При анализе гистологических данных оценок статистически значимые различия между группами Контроль и LOLA были обнаружены для показателей: гепатит ($p < 0.01$), холестаз ($p < 0.01$), некроз ($p < 0.05$, $p < 0.01$), стадия фиброза по METAVIR-F ($p < 0.01$, $p < 0.05$), а также всех видов фибротических изменений ($p < 0.01$; $p < 0.05$). Значимые различия между группами Контроль и ЕМРА были обнаружены для показателей: гепатит ($p < 0.05$), холестаз ($p < 0.05$), некроз ($p < 0.05$, $p < 0.01$), стадия фиброза по METAVIR-F ($p < 0.01$, $p < 0.05$), ФЦВ ($p < 0.05$, $p < 0.01$) и ФС ($p < 0.01$, $p < 0.05$).

Влияние препаратов на поведение животных в тестах ОП, ПКЛ и ЧБК характеризовалось нелинейной динамикой с развитием непрямого анксиолитического эффекта на более поздних стадиях эксперимента (3-6 мес) ($p < 0.01$, $p < 0.05$).

В тесте ТЛ-СЧ LOLA и ЕМРА не оказывали значимого влияния на частоту спонтанного чередования животных в течение всего экспериментального периода. В тесте РНО через 2 мес эксперимента в группе LOLA время изучения нового объекта и индекс дискриминации значимо превышали таковые в контрольной группе ($p < 0.05$). ЕМРА через 2 мес от начала эксперимента увеличивал время, затрачиваемое мышами на изучение нового объекта, и индекс дискриминации ($p < 0.05$). При тестировании в ЛБ группа LOLA, в отличие от Контроля, не демонстрировала статистически значимого ухудшения оцениваемых показателей на 12-й день эксперимента по сравнению с 5-м днем. Таким образом, применение LOLA способствовало компенсации транзиторного снижения краткосрочной распознающей памяти в ранний период и поддерживало консолидацию пространственной памяти через 6 мес моделирования патологии печени. ЕМРА способствовал компенсации транзиторного снижения краткосрочной распознающей памяти на ранних этапах, а также увеличивал эффективность консолидации аллоцентрической пространственной памяти.

В группе животных, получавших терапию LOLA, наблюдалось достоверное уменьшение максимальных амплитуд М-ответов *m. biceps brachii*, а также уменьшение латентности ответов обеих мышц на электростимуляцию ($p < 0.01$). В группе ЕМРА наблюдалось статистически значимое увеличение максимальных амплитуд М-ответов *m. gastrocnemius* ($p < 0.01$). Предположительно, применение препаратов способно частично предотвратить поражение периферических нервов и дисфункцию нейромоторного аппарата, сопровождающие НАСГ.

В плавательных тестах применение LOLA не оказывало заметного влияния на базовый уровень физической работоспособности мышей с экспериментальным НАСГ, но способствовало увеличению эффективности процессов краткосрочного восстановления после аэробно-анаэробных истощающих нагрузок. На ранних этапах формирования патологии печени (3 мес) ЕМРА способствовал сохранению эффективности процессов постнагрузочного восстановления, однако не оказывал на них влияния в дальнейшем.

ВЫВОДЫ

1. Алиментарно-токсическая экспериментальная НАЖБП на стадиях НАСГ и фиброза печени у мышей C57Bl/6 ассоциированы с ухудшением выживаемости ($p < 0.01$, $p < 0.05$), увеличением показателей, характеризующих тревожность в поведенческих тестах ($p < 0.01$, $p < 0.05$) и ослаблением распознающей ($p < 0.05$) и пространственной памяти ($p < 0.01$). НАСГ также сопровождается нарушениями нейромышечной передачи ($p < 0.01$),

предположительно, свидетельствующими о наличии поражения периферических нервов, а также ухудшением толерантности к аэробно-анаэробным физическим нагрузкам ($p < 0.01$);

2. Орнитина аспарат при курсовом применении оказывает отсроченный анксиолитический эффект, что подтверждается снижением вертикальной и горизонтальной активности мышей в поведенческих тестах ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Препарат также способствует сохранению распознающей ($p < 0.05$) и пространственной памяти ($p < 0.05$);

3. Орнитина аспарат при курсовом применении восстанавливает скорость проведения нервного импульса по периферическим нервам, уменьшая латентность М-ответов скелетных мышц ($p < 0.01$), и увеличивает эффективность процессов краткосрочного постнагрузочного восстановления ($p < 0.05$);

4. Эмпаглифлозин при курсовом применении оказывает отсроченный анксиолитический эффект, что подтверждается снижением вертикальной и горизонтальной активности мышей в поведенческих тестах ($p < 0.01$, $p < 0.05$). Препарат также способствует сохранению распознающей ($p < 0.05$) и долговременной пространственной памяти ($p < 0.05$);

5. Эмпаглифлозин при курсовом применении восстанавливает максимальные амплитуды М-ответов скелетных мышц на электростимуляцию ($p < 0.01$), однако не влияет на процессы постнагрузочного восстановления.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Модифицированная модель алиментарно-токсического НАСГ может быть использована для воспроизведения НАЖБП у мышей. Модель позволяет воспроизвести основные морфологические и функциональные характеристики заболевания у человека и может считаться релевантной с точки зрения клинической практики.

2. Разработанный метод анализа может быть применен для полуколичественной оценки и определения статистической значимости межгрупповых различий шкалированных гистологических данных.

3. Целесообразно продолжить изучение гепато- и нейропротекторного эффектов орнитина аспарата и эмпаглифлозина с целью возможного расширения спектра показаний к их применению в клинической практике.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. Приходько, В. А., Сысоев, Ю. И., Поверяева, М. А., Бунят, А. В., Карев, В. Е., Ивкин, Д. Ю. и др. Влияние эмпаглифлозина и L-орнитина L-аспартата на поведенческо-когнитивные функции и физическую работоспособность при экспериментальном стеатогепатите // Вестник РГМУ. — 2020. — №. 3. — С. 53-62. doi: 10.24075/vrgmu.2020.034
2. Приходько, В. А., Поверяева, М. А., Сысоев, Ю. И., Шустов, Е. Б., Бунят, А. В. Оценка влияния эмпаглифлозина и L-орнитина L-аспартата на физическую работоспособность при экспериментальном стеатогепатите // Биомедицина. — 2020. — Т. 16. — №. 3. — С. 77-80. doi: <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-3-77-80>
3. Приходько, В. А. Влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на проявления мнестического дефицита при экспериментальном стеатогепатите // Биомедицина. — 2022. — Т. 18. — №. 3. — С. 128-132. doi: <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-128-132>

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Prikhodko, V.A., Bezborodkina, N.N., Okovityi, S.V. Pharmacotherapy for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Emerging Targets and Drug Candidates // Biomedicines. — 2022. — V. 10. — No. 2. — 274. doi: 10.3390/biomedicines10020274.
2. Приходько, В. А., Оковитый, С. В., Сысоев, Ю. И. Влияние стеатоза печени на поведение мышей линии C57BL/6 // Материалы X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация — потенциал будущего». — Санкт-Петербург, 2020. — С. 300-303.
3. Prikhodko, V. A., Sysoev, Y. I., Okovityi, S. V. Effects of empagliflozin and L-ornithine L-aspartate on behaviour, cognitive function, and physical performance in mice with non-alcoholic steatohepatitis // Journal of Hepatology: The International Liver Congress Abstract Book. — 2021. — V. 75. — S. 2. — P. S590-S591.
4. Гепатопротекторы : руководство для врачей / С. В. Оковитый, В. А. Приходько, Н. Н. Безбородкина, Б. Н. Кудрявцев. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. — 240 с. : ил. doi: 10.33029/9704-6689-6-LIV-1-240
5. Приходько, В. А., Оковитый, С. В., Сысоев, Ю. И. Влияние орнитина аспартата и эмпаглифлозина на проявления когнитивно-мнестического дефицита при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите // Материалы XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая Фармация — потенциал будущего». — Санкт-Петербург, 2022. — С. 300-303.

6. Приходько, В. А. Влияние эмпаглифлозина и орнитина аспартата на нарушения нервномышечной передачи, ассоциированные с неалкогольным стеатогепатитом // Материалы XVIII Международной (XXVII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции. — 2023. — С. 132.
7. Приходько, В. А., Оковитый, С. В. Актопротекторный эффект эмпаглифлозина при экспериментальном неалкогольном стеатогепатите // Материалы XXVII Международного конгресса "Гепатология сегодня". — Москва, 2023. — С. 22.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НАЖБП — неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ — неалкогольный стеатогепатит; LOLA — орнитина аспартат; ЕМРА — эмпаглифлозин; ОП — «Открытое поле»; ПКЛ — «Приподнятый крестообразный лабиринт»; ЧБК — «Черно-белая камера»; ТЛ-СЧ — «Спонтанное чередование в Т-лабиринте»; РНО — «Распознавание нового объекта»; ЛБ — «Лабиринт Барнс»; ВП — «Вынужденное плавание»; ТПП — «Трехнагрузочная плавательная проба»; ЭНМГ — электронейромиография; ЖДГ — жировая дистрофия гепатоцитов; БДГ — баллонная дистрофия гепатоцитов; ППСФ — перипортальный сегментарный фиброз; ФЦВ — фиброз центральных вен; ВДПСФ — внутريدольковый перисинусоидальный фиброз; ФС — фиброзные септы; ИП — индекс пробы.