

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2024-87-8-7-15

ГЕПАТО- И НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ, МЕТИОНИНА И РИБОФЛАВИНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕАЛКОГОЛЬНОМ СТЕАТОГЕПАТИТЕ

В. А. Приходько¹, Т. М. Матузок¹, Е. И. Елецкая¹, Е. Д. Семивеличенко¹, В. Е. Карев²,
А. В. Караваева¹, С. О. Ереско^{3,4}, Н. О. Селизарова¹, Д. Ю. Ивкин¹, С. В. Оковитый¹

Неалкогольная жировая болезнь печени — чрезвычайно распространенное мультисистемное метаболическое заболевание, для лечения которого до сих пор не разработаны лекарственные средства с достаточной эффективностью и безопасностью. Целью настоящей работы стала оценка гепато- и нейропротекторного потенциала фиксированной комбинации фармакологических веществ: янтарной кислоты (88,3 мг/кг/сут), метионина (70,64 мг/кг/сут) и рибофлавина (1,06 мг/кг/сут) в сравнении с адеметионином (211 мг/кг/сут) при курсовом (3 мес) введении внутрь мышам-самцам с экспериментальным неалкогольным стеатогепатитом. Экспериментальный неалкогольный стеатогепатит у мышей сопровождался снижением выживаемости (относительный риск летального исхода 10,05, $p < 0,01$), характерными изменениями морфологии печени (стеатоз, баллонная дистрофия гепатоцитов, патологическая клеточная инфильтрация) и биохимических показателей крови (увеличение активности аланинаминотрансферазы, $p < 0,01$), индукцией маркеров фиброгенеза и стеатоза (гиалуронансинтазы-2 (HAS2), стеароил-коэнзим А-десатуразы (SCD1), $p < 0,05$). Также наблюдали снижение общей двигательной и исследовательской активности (уменьшение скорости движения и числа заглядываний в отверстия, $p < 0,05$; уменьшение числа стоек, $p < 0,01$), рабочей памяти (снижение частоты спонтанного чередования, $p < 0,05$) и физической работоспособности мышей (уменьшение времени вынужденного плавания, $p < 0,01$). Как комбинация фармакологических веществ, так и препарат сравнения адеметионин обладали антицитолитическим эффектом (снижали активность трансаминаз, $p < 0,05$) и оказывали положительное влияние на экспрессию тканевых маркеров поражения печени (повышали экспрессию аполипопротеина A1, матриксной металлопротеиназы-9, $p < 0,05$; снижали экспрессию HAS2, SCD1, $p < 0,05$). Применение комбинации фармакологических веществ сопровождалось нормализацией состояния краткосрочной памяти (увеличивало частоту спонтанного чередования, $p < 0,01$) и позволяло восстановить уровень исследовательской активности мышей (повышало число заглядываний в отверстия, $p < 0,05$), не оказывая существенного влияния на уровень их тревожности. Ни один из исследованных вариантов фармакологического воздействия не оказывал влияния на физическую работоспособность и показатели функции нейромоторного аппарата. Таким образом, комбинация фармакологических веществ при курсовом введении обладает способностью восстанавливать морфологию и функции печени, а также оказывать влияние на сопутствующие неврологические нарушения без влияния на тревожно-подобное поведение мышей, в отличие от адеметионина. Механизмы действия и отдельные аспекты гепато- и нейротропной активности комбинации требуют дальнейшего уточнения.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени; неалкогольный стеатогепатит; янтарная кислота; метионин; рибофлавин; адеметионин; гепатопротекция; нейропротекция; мыши.

¹ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава России, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14А.

² ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 9.

³ ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12.

⁴ ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Россия, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, 49А.

e-mail: e_talikova@polysan.ru

ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) — хроническое заболевание метаболического генеза, при котором происходит избыточное накопление липидов в $>5\%$ гепатоцитов, не связанное с воздействием алкоголя или других токсических веществ [1]. НАЖБП, протекающая в виде стеатоза и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), тесно ассоциирована с центральными и периферическими нейрональными нарушениями, проявлениями астено-вегетативного

синдрома в сочетании с когнитивными и психовегетативными расстройствами, нарушениями сна [7]. Кроме этого, в число потенциальных системных осложнений НАЖБП входит периферическая полинейропатия, лежащая в основе развития сенсомоторных нарушений и снижения физической работоспособности [11].

Лекарственное лечение НАЖБП/НАСГ предполагает применение лекарственных средств (ЛС) с прямым гепатопротекторным действием, а также некоторых антидиабетических ЛС [3]. Среди таких ЛС традиционно рассматриваются фармакологические вещества (ФВ) на основе янтарной кислоты, применение которых обосновано развитием митохондриальной дисфункции в гепатоцитах при НАЖБП. С точки зрения взаимного усиления действия отдельных ФВ перспективно применение их комбинаций, которые могут обеспечивать как усиление того или иного фармакологического эффекта, так и расширение спектра гепато- и нейротропного действия [5]. В связи с этим целью настоящего исследования стала оценка влияния комбинированного и монокомпонентного гепатотропных ЛС на морфологию печени, биохимические и молекулярные маркеры ее повреждения, а также поведенческо-неврологические показатели у мышей с моделью НАСГ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств после одобрения биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ (протокол № Мисе-01/Ст-23). Эксперименты были выполнены на 120 молодых взрослых (2 мес) мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 18 – 22 г, полученных из филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область) одной партией и прошедших карантин в течение 14 дней. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Непосредственно перед началом эксперимента мыши были рандомизированы методом случайных чисел на 4 группы (табл. 1).

Для воспроизведения НАСГ использовали алиментарно-токсическую модель [23] в модификации [21]. Мыши всех групп, кроме интактной, на протяжении 3 мес эксперимента получали “западный” высококалорийный корм (ВКМ) состава: 42,9 % стандартного корма + 16,1 % топленого говяжьего жира + 41,0 %

D-фруктозы, а также тетрахлорметан в дозе 0,16 мг/кг 2 раза в неделю внутрибрюшинно в виде масляного раствора [21].

В течение всего периода моделирования НАСГ (3 мес) мыши группы фармакологической поддержки получали ежедневно внутрижелудочно комбинацию ФВ, содержащую 88,3 мг/кг янтарной кислоты, 70,64 мг/кг метионина и 1,06 мг/кг рибофлавина, – СМР (“Ремакса Pro Active”, ООО “ВТФ”, Россия) с добавлением 1 % крахмальной слизи. Используемая доза по сумме компонентов эквивалентна суточной дозе для человека (906 мг/сут). Мыши группы АМ получали препарат сравнения адеметионин (АМ) (“Гептрал”, AbbVie S.r. L., Италия) в дозе 211 мг/кг 1 раз в сутки внутрижелудочно с добавлением 1 % крахмальной слизи. Используемая доза эквивалентна суточной дозе для человека (1200 мг/д). Все дозы были определены с использованием коэффициента межвидового переноса.

Через 3 мес от начала исследования НАСГ верифицировали путем гистологического анализа. После эктаназии мышей в атмосфере углекислого газа (бокс Bioscape/Zoonlab GmbH, Германия) отделяли 1/5 часть печени и замораживали при –80 °С для последующего анализа методом количественной ПЦР в режиме реального времени (РТ-кПЦР). 4/5 части печени и желчный пузырь помещали в 10 % забуференный формалин и фиксировали в течение 24 ч, после чего вырезали образцы и подвергали их стандартной гистологической проводке в гистопроцессоре Thermo Scientific Excelsior AS (Thermo Shandon Ltd., Великобритания). Срезы толщиной 3 – 3,5 мкм помещали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином или пикрофуксином по Ван Гизону. Проводили оценку в баллах активности гепатита по шкале METAVIR-A, стеатоза, БДГ, холестаза, некроза и фиброза по шкале METAVIR-F.

По окончании 3 мес индукции НАСГ по 10 животных из каждой группы тестировали в поведенческих тестах “Открытое поле” (ОП), “Приподнятый крестообразный лабиринт” (ПКЛ), “Черно-белая камера” (ЧБК), “Спонтанное чередование в Т-лабиринте” (СЧТЛ) и “Распознавание нового объекта” (РНО) по конвенциональным протоколам [25] с использованием соответствующих установок (ООО “НПК Открытая наука”, РФ) и программ VideoMot2 3.0.1 (TSE Systems GmbH, Германия) и RealTimer 1.30 (ООО “НПК Открытая наука”, РФ). Для оценки смешанной аэроб-

Таблица 1. Распределение животных по экспериментальным группам

№	Группа	n	Корм	CCl ₄	СМР	АМ
1	Интактные	30	Стандартный	–	–	–
2	Контроль	30	ВКК	0,16 мг/кг	–	–
3	СМР	30	ВКК	0,16 мг/кг	160 мг/кг	–
4	АМ	30	ВКК	0,16 мг/кг	–	211 мг/кг

Примечание: СМР – сукцинат + метионин + рибофлавин; АМ – адеметионин; ВКК – высококалорийный корм; CCl₄ – тетрахлорметан.

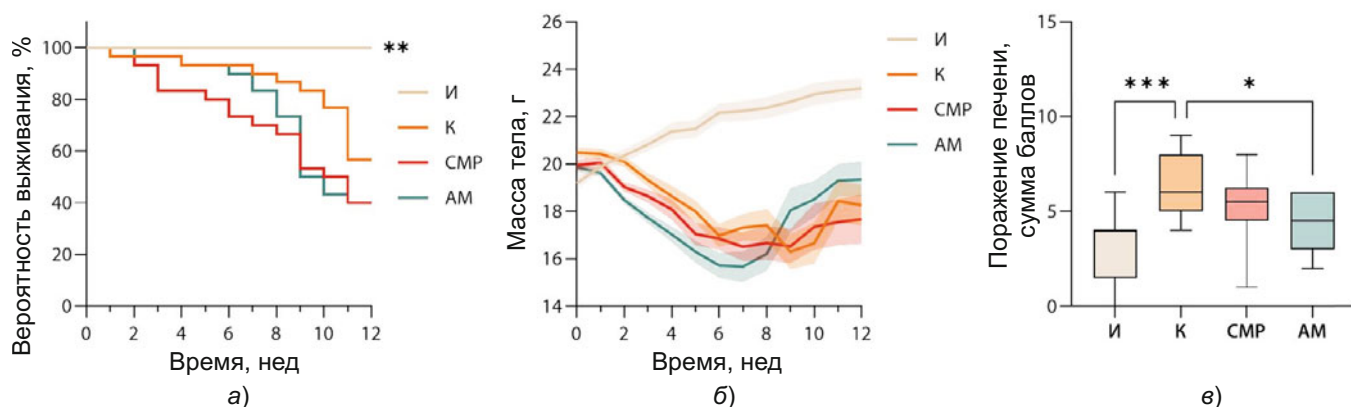


Рис. 1. Влияние экспериментального неалкогольного стеатогепатита и исследуемых препаратов на выживаемость (а), массу тела (б) и степень поражения печени (в) у животных.

Подписи к рисунку: И – Интакт, К – Контроль, CMP – сукцинат + метионин + рибофлавин, AM – адеметионин; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ против контроля. Числовые данные на панели б представлены в виде “среднее арифметическое; стандартная ошибка среднего”, на панели в – “среднее арифметическое; стандартная ошибка среднего”.

но-анаэробной физической работоспособности животных выполняли тест “Трехнагрузочная плавательная проба” (ТПП) с предварительным закреплением на теле мыши груза массой 7,5 % от массы тела. Фиксировали время плавания животных (с) в 3 точках: исходно, через 5 мин после выполнения 1 нагрузки и через 45 мин после выполнения 2 нагрузки [2].

Исследование ответов икроножной мышцы на электростимуляцию седалищного нерва проводили методом стимуляционной электронейромиографии (ЭНМГ) с помощью аппарата Нейро-МВП-4 и программы Нейро-МВП.NET 3.7.3.7 (ООО “Нейрософт”, РФ) в условиях наркоза хлоралгидратом (MilliporeSigma, США; 400 мг/кг, внутривенно) в соответствии с опубликованным ранее протоколом [21]. Скорость проведения импульса (СПИ) по *n. ischiadicus* измеряли по методике [22] с использованием вилочкового биполярного стимулирующего электрода (ООО “Нейрософт”, РФ), применяя супрамаксимальную силу тока 10 мА. СПИ (м/с) рассчитывали как отношение расстояния между точками стимуляции к разности латентностей ответов, вызванных стимуляцией в двух точках [22].

Через 1 сут после окончания поведенческого тестирования у 10 животных из каждой группы определяли сывороточные концентрации аланинаминотрансферазы (АЛТ) (международных единиц (МЕ)/л), аспартатаминотрансферазы (АСТ) (МЕ/л), γ -глутамилтрансферазы (ГГТ) (МЕ/л), общего билирубина (мкмоль/л), общего белка (г/л), глюкозы (ммоль/л), общего холестерина (ОХС) (ммоль/л) и триацилглицеридов (ТАГ) (ммоль/л) с использованием биохимического автоматического анализатора XL-100 (“ЭРБА Лахема с.р.о.”, Чешская Республика).

Суммарную РНК из ткани печени выделяли при помощи реагента ExtractRNA (ЗАО “Евроген”, Россия) и

количественно оценивали на спектрофлуориметре BioSpec-Nano (Shimadzu Biotech, Япония). Синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) осуществляли с помощью набора MMLV RT[®] (ЗАО “Евроген”, Россия). РТ-кПЦР проводили с использованием амплификатора Mx3005P (Stratagene, США) с помощью набора qPCRmix-HS (ЗАО “Евроген”, Россия) при температурном режиме: 1 цикл — 5 мин, 95 °C, далее 40 циклов: 10 с, 95 °C 20 с, 58 °C — 20 с, 72 °C. Уровень экспрессии рассчитывали при помощи метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$, в качестве референтного гена использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*Gapdh*). Нуклеотидные последовательности использованных праймеров приведены в табл. 2.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Prism 10.1.0 (GraphPad Software Inc., США). Анализ выживаемости животных проводили по методу Каплана–Мейера с использованием теста Гехана–Бреслоу–Уилкоксона; относительные риски (ОР) летального исхода рассчитывали по методу Мантела–Хенсела. Нормальность распределения количественных признаков проверяли с помощью W-критерия Шапиро–Уилка. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного ANOVA с *post hoc* тестом по Даннетту (против контрольной группы), при распределении, отличном от нормального, — с помощью непараметрического критерия Краскела–Уоллиса с *post hoc* тестом по Данну. Порог статистической значимости устанавливали на уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мыши группы “Контроль” (модель НАСГ без фармакологического воздействия) имели значительно большие общую смертность и ОР летального исхода

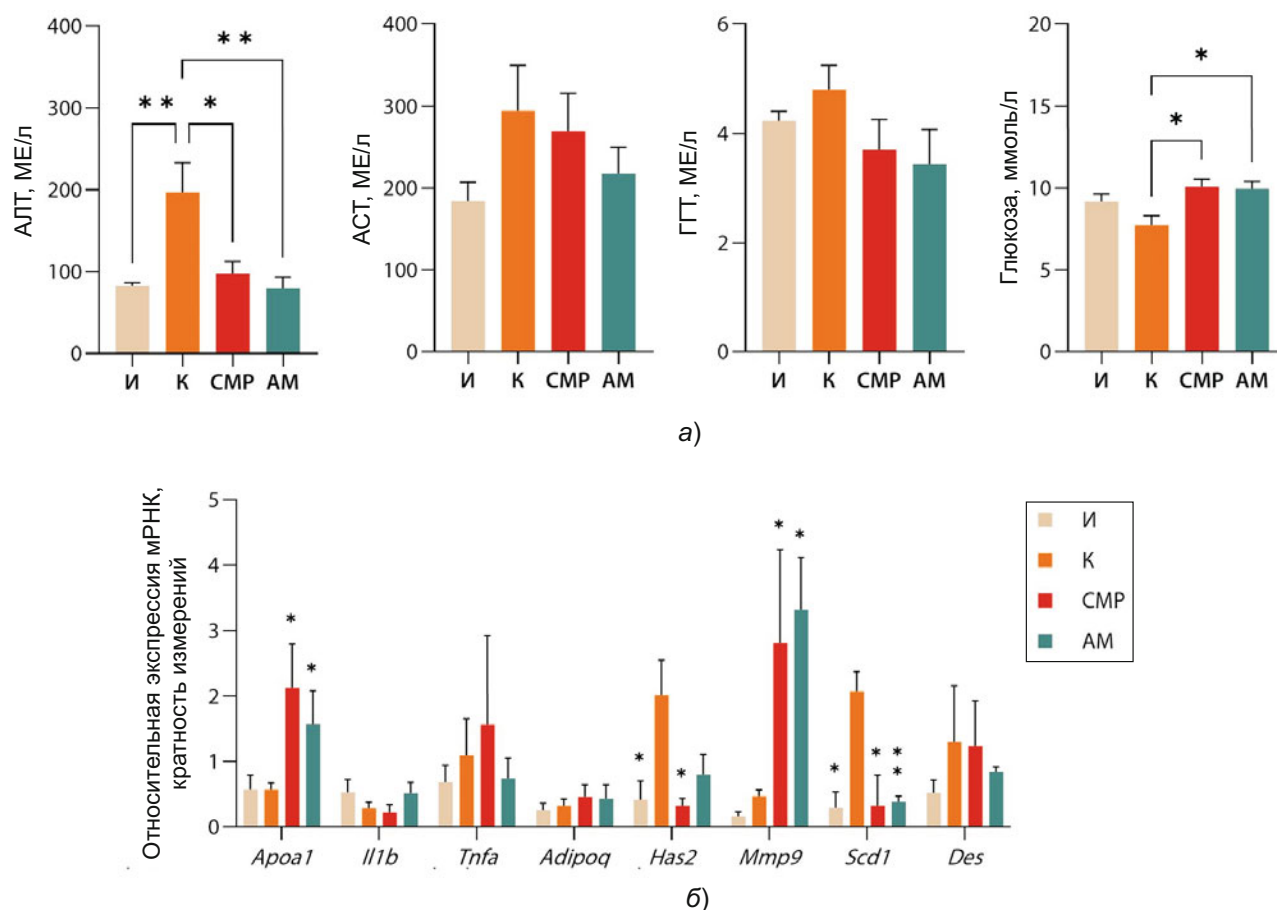


Рис. 2. Влияние экспериментального неалкогольного стеатогепатита и исследуемых препаратов на биохимические показатели крови (а) и относительную экспрессию маркерных белков (б) у животных.

Подписи к рисунку: И – Интакт, К – Контроль, СМР – суццинат + метионин + рибофлавин, АМ – адеметионин; МЕ – международная единица, АЛТ – аланинаминотрансфераза, АСТ – аспартатаминотрансфераза, ГГТ – γ -глутамилтрансфераза, мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота, *Apoa1* – аполипопротеин-А1, *Il1b* – интерлейкин-1 β , *Tnfa* – фактор некроза опухоли- α , *Adipoq* – адипонектин, *Has2* – гиалуронансинтаза-2, *Mmp9* – матриксная металлопротеиназа-9, *Scd1* – стеарил-коэнзим А-десатураза, *Des* – десмин; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ против контроля. Числовые данные представлены в виде “среднее арифметическое; стандартная ошибка среднего”.

на протяжении всего эксперимента по сравнению с интактными животными ($p < 0,01$; ОР = 10,05). Выживаемость и ОР летального исхода в группах СМР и АМ значимо не отличались от таковых в группе “Контроль” (СМР:ОР = 1,93; АМ:ОР = 1,91) (рис. 1, а). Динамика массы тела интактных мышей характеризовалась постоянным ростом по мере взросления. Во всех опытных группах наблюдалось постепенное снижение массы тела в период от начала по 6 неделю эксперимента с дальнейшей стабилизацией и ростом с 8 по 12 неделю. Не было выявлено различий в динамике массы тела между группами Контроль, СМР и АМ (рис. 1, б).

Морфологическая картина печени животных группы “Контроль” характеризовалась наличием распространенного стеатоза и БДГ, умеренно выраженного внутриклеточного холестаза и признаков воспаления, включая инфильтрацию паренхимы полиморфноядерными лейкоцитами. Наблюдаемые гистоморфологические изменения позволили верифицировать наличие целевой патологии у животных [1]. Суммарная балльная оценка степени поражения печени в группе “Кон-

троль” значимо превышала таковую у интактных животных ($p < 0,001$), а в группе АМ была значимо ниже, чем в контроле ($p < 0,05$). Применение СМР обеспечивало незначительное уменьшение общей выраженности поражения печени у мышей (рис. 1, в).

В группе “Контроль” наблюдали значимо более высокую активность АЛТ ($p < 0,01$), а также заметную тенденцию к повышению уровней АСТ и общего билирубина (рис. 2). Повышение активности печеночных трансаминаз является характерным лабораторным признаком поражений печени, указывающим на повреждение гепатоцитов. Также была обнаружена тенденция к увеличению уровня общего билирубина и ГГТ, свидетельствующая о внутрипеченочном холестазе, подтвержденном гистологически (рис. 2, а). Введение СМР и АМ сопровождалось нормализацией активности АЛТ относительно животных группы “Контроль” ($p < 0,05$ и $0,01$ для двух групп, соответственно), что отражало антицитолитический эффект, показанный ранее для комбинированных ЛС, содержащих метионин [4]. Кроме этого, комбинация СМР вос-

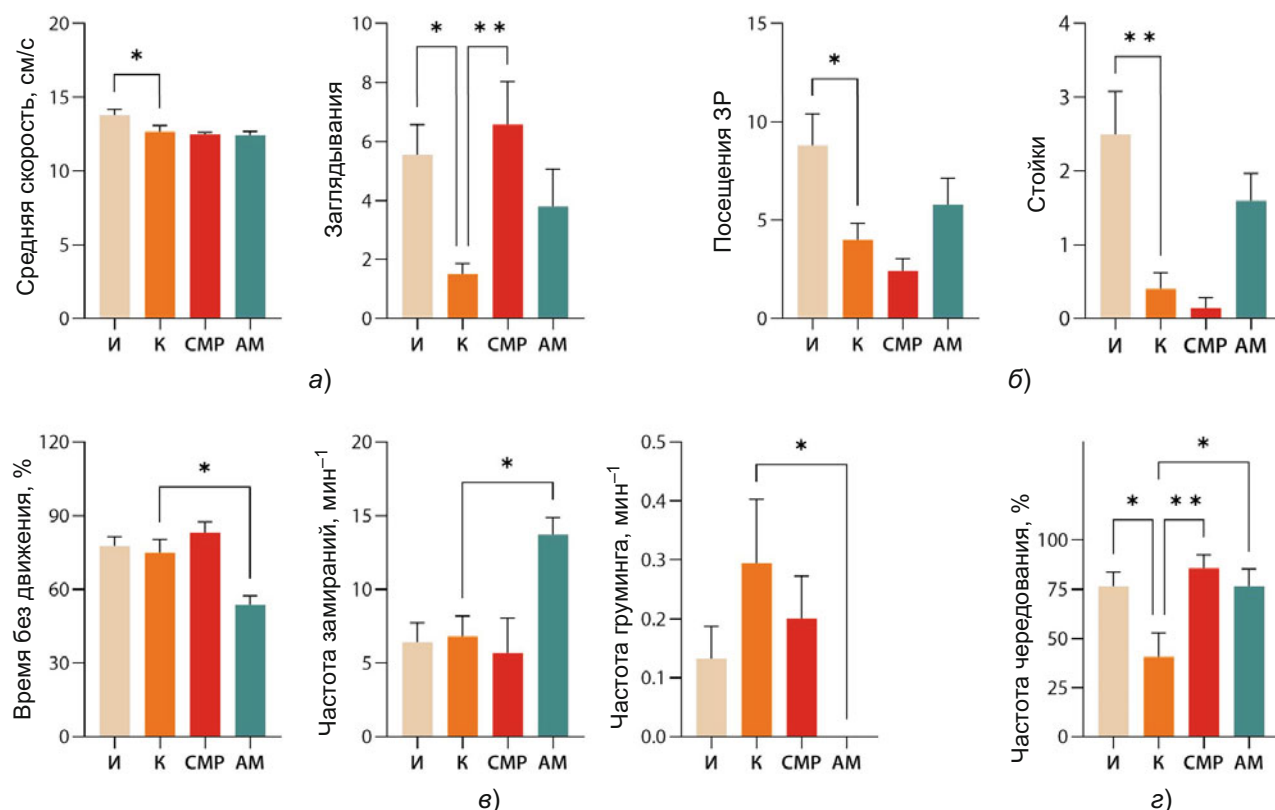


Рис. 3. Влияние экспериментального неалкогольного стеатогепатита и исследуемых препаратов на показатели активности животных в тестах “Открытое поле” (а), “Приподнятый крестообразный лабиринт” (б), “Черно-белая камера” (ЧБК) (в) и “Спонтанное чередование в Т-лабиринте” (г).

Подписи к рисунку: И – Интакт, К – Контроль, СМР – сукцинат + метионин + рибофлавин, АМ – адеметионин; ЗР – закрытые рукава; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Числовые данные представлены в виде “среднее арифметическое; стандартная ошибка среднего”.

становливалась сывороточные концентрации глюкозы ($p < 0,05$ для обеих групп), сниженные у контрольных животных, вероятно, в связи с уменьшением содержания гликогена в печени и уменьшением интенсивности гликогенолиза. Изменения показателей общего билирубина, общего белка, общего холестерина остались на уровне тенденций (рис. 2, а).

НАСГ у мышей контрольной группы был значимо ассоциирован с увеличением относительной экспрессии генов HAS2 и SCD1 ($p < 0,05$ для обоих) (рис. 2, б). HAS2 — фермент, катализирующий ключевую стадию синтеза гиалуроновой кислоты, активность которого повышается в процессе активации ЗКП и фиброгенеза. Накопление гиалуроновой кислоты в ткани печени и в сыворотке крови является маркером прогрессирования заболевания до цирроза. SCD1 катализирует скорость-лимитирующую стадию образования мононенасыщенных жирных кислот, а также играет роль важного регулятора процессов аутофагии и аутофагия-индуцированного апоптоза. Повышение экспрессии SCD1 характерно для больных ожирением, сахарным диабетом 2 типа и метаболическим синдромом [27].

В группе СМР наблюдалось статистически значимое увеличение уровня мРНК АроА1 и MMP9 с одно-

временным уменьшением экспрессии HAS2 и SCD1 ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 2, б). Применение АМ сопровождалось статистически значимым увеличением уровня мРНК АроА1 и MMP9 ($p < 0,05$ для обоих), а также уменьшением относительной экспрессии SCD1 ($p < 0,05$ для обоих) (рис. 4). Предупреждение повышения уровня мРНК HAS2 и SCD1 у крыс в группе с фармакологической поддержкой отражает уменьшение выраженности поражения печени на фоне введения препаратов и, вероятно, может указывать на влияние комбинации СМР как на фиброгенез, так и на процессы аутофагии и апоптоза гепатоцитов.

АроА1 является основным белком в составе липопротеинов высокой плотности. Повышение его экспрессии облегчает высвобождение липидов из гепатоцитов, а также уменьшает стресс эндоплазматического ретикулума, что способствует регрессии стеатоза. Индукция АроА1 может происходить из-за активации сигнальных путей всех подтипов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR $\alpha/\gamma/\delta$). Ранее D. Zhang, et al. в эксперименте на крысах установили, что рибофлавин, входящий в состав СМР, в комбинации с селеном обладает антистеатозным эффектом, опосредованным, в числе прочих, сдвигом соотношения АроА1/АроВ в пользу первого [28].

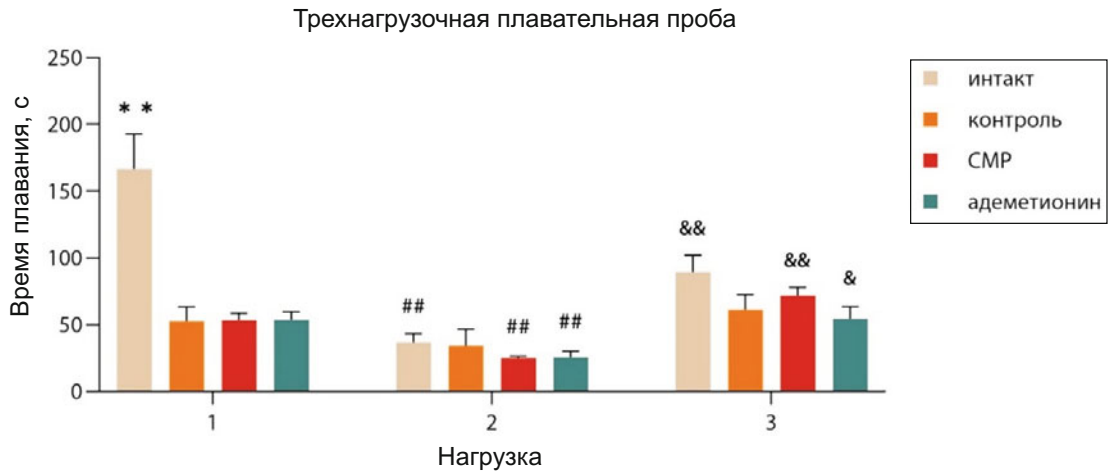


Рис. 4. Влияние экспериментального неалкогольного стеатогепатита и исследуемых препаратов на время вынужденного плавания животных в тесте “Трехнагрузочная плавательная проба”.

Подписи к рисунку: СМР – сукцинат + метионин + рибофлавин; ** $p < 0,01$ в сравнении с группой “Контроль”, ## $p < 0,01$ в сравнении с 1 нагрузкой, & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ в сравнении со 2 нагрузкой. Числовые данные представлены в виде “среднее арифметическое; стандартная ошибка среднего”.

ММР9 (желатиназа В) — индуцибельная металло-протеиназа, принимающая участие в деградации и ремоделировании структур внеклеточного матрикса. ММР9 является профиброгенной металлопротеиназой, а также стимулирует инфильтрацию паренхимы печени лейкоцитами; ее индукция считается маркером неблагоприятного прогноза НАСГ у человека. Тем не менее, некоторые данные указывают на возможную роль ММР9 клеток Купфера в разрешении неалкогольного фиброза печени у животных. Последние данные позволяют предположить, что этот фермент является двунаправленным регулятором фиброгенеза и в определенных условиях может обращать его вспять [26]. Гиперэкспрессия ММР9 в печени животных наблюда-

ется на начальных этапах разрешения фиброза и сопровождается разрушением коллагена I типа и гидроксипролина, что может быть опосредовано индукцией апоптоза ЗКП [13].

В тесте ОП наблюдали статистически значимое уменьшение средней скорости передвижения мышей с НАСГ, что указывает на снижение общей двигательной активности, а также уменьшение числа заглядываний в отверстия арены, что отражает снижение исследовательской активности у животных группы “Контроль”, по сравнению с группой “Интакт” ($p < 0,05$ для обоих). В группе СМР число заглядываний значимо превышало таковое в группе “Контроль” ($p < 0,05$) и находилось на уровне группы “Интакт”,

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

№	Ген	Белок	Последовательности праймеров, 5'-3'
1	<i>Gapdh</i>	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	Fw: ACTCCACTCACGGCAAATTC Rv: TCTCCATGGTGGTGAAGACA
2	<i>Apoa1</i>	Полипопротеин-A1	Fw: GTGGCTCTGGTCTTCCTGAC Rv: ACGGTTGAACCCAGAGTGTCT
3	<i>Il1b</i>	Интерлейкин-1β	Fw: CTGCAGCTGGAGAGTGTGGAT Rv: CTCCACTTTGCTCTTGACTTCTATCTT
4	<i>Tnfa</i>	Фактор некроза опухоли-α	Fw: GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG Rv: TTGGTGGTTTGTGAGTGTGAG
5	<i>Adipoq</i>	Адипонектин	Fw: AAGGACAAGGCCGTTCTCT Rv: CGCACGATTTCCCTCTCAGCTG
6	<i>Has2</i>	Гиалуронансинтаза-2	Fw: TGAGCAGGAGCTGAACAAGA Rv: GCCAACAATATAAGCAGCTGTG
7	<i>Mmp9</i>	Матриксная металлопротеиназа-9	Fw: GGACCCGAAGCGGACATTG Rv: CGTCGTCGAAATGGGCATCT
8	<i>Scd1</i>	Стеарил-коэнзим А-десатураза	Fw: CCGGAGACCCCTTAGATCG Rv: TAGCCTGTAAAAGATTCTGCAAACC
9	<i>Des</i>	Десмин	Fw: AAGATGGCCTTGGATGTGGA Rv: GTTGATCCTGCTCTCCTCGC

Примечание: Fw — прямой праймер, Rv — обратный праймер.

что указывает на восстановление уровня исследовательской активности. Схожий эффект наблюдался и в группе АМ, однако его меньшая выраженность не позволила различию между группами “АМ” и “Контроль” стать значимым (рис. 3, а).

В тесте ПКЛ в группе “Контроль” наблюдали значимое уменьшение числа посещений ЗР лабиринта ($p < 0,05$) и числа стоек ($p < 0,01$), по сравнению с группой “Интакт”, что с учетом данных теста ОП, а также отсутствия изменений индекса тревожности, вероятно, подтверждает предположение о снижении общей двигательной активности мышей на фоне НАСГ. Применение комбинации СМР сопровождалось тенденцией к снижению частоты свисаний с рукавов лабиринта, актов груминга и стоек, а также полному исчезновению выглядываний. Подобные изменения могут указывать на небольшой анксиолитический/седативный эффект препарата и общее снижение активности животных. Сохранение предпочтения закрытого пространства на уровне интактных мышей позволяет исключить анксиогенное действие СРМ. Группа АМ обнаруживала тенденцию к повышению количества посещения рукавов обоих видов, а также частоты стоек, что, напротив, может быть связано с некоторым повышением уровня тревожности (рис. 3, б).

В тесте ЧБК не наблюдали значимых изменений поведения мышей группы “Контроль”, по сравнению с группой “Интакт”, а также группы СРМ — по сравнению с контролем (рис. 3, в), что говорит об отсутствии формирования тревожного фенотипа и/или его сохранения к контрольной точке исследования (3 мес) на фоне продолжающейся адаптации животных к метаболической нагрузке. Таким образом, характерными поведенческими изменениями, ассоциированными с НАСГ, стали снижение общей двигательной и исследовательской активности мышей, что совпадает с ранее полученными данными для моделей этой патологии [21].

В группе АМ наблюдали уменьшение времени, проводимого в неподвижном движении состоянии, увеличение частоты замираний и полное отсутствие актов груминга в видимой зоне лабиринта по сравнению с группой “Контроль” ($p < 0,05$ для всех) (рис. 3, г). Кроме этого, в этой группе отмечалась тенденция к сокращению времени посещения белой камеры и латентности перехода в черную камеру, увеличению частоты стоек и числа переходов между камерами по сравнению с группой “Контроль”, что с большой долей вероятности отражало формирование тревожного фенотипа (рис. 3, в). Парадоксальное повышение тревожности и ее появление у изначально нетревожных пациентов в первые недели и даже месяцы лечения характерно для антидепрессантов — селективных ингибиторов обратного захвата моноаминов [15]. Хотя его природа не до конца ясна, этот эффект связывают с повышением уровня серотонина и других моноаминов [15], что является характерным для АМ [16].

В тесте СЧТЛ наблюдали статистически значимое ($p < 0,05$) снижение частоты чередования рукавов лабиринта в группе “Контроль”, по сравнению с группой “Интакт” (рис. 3, з), что указывает на ухудшение рабочей пространственной памяти на фоне болезни печени. Аналогичное наблюдение было сделано ранее для мышей с НАСГ и фиброзом печени. При этом был отмечен нарастающий характер снижения пространственной памяти на фоне лишь транзиторного ухудшения памяти распознающей, что может быть связано с поражением гиппокампа и ассоциированных структур головного мозга при прогрессировании патологии печени [21].

В группах СМР ($p < 0,01$) и АМ ($p < 0,05$) частота чередования значимо превышала таковую в группе “Контроль” и находилась на уровне группы “Интакт” (рис. 3, з). G. Muccioli, et al. было продемонстрировано, что повышение текучести нейрональных мембран под влиянием АМ сопровождается увеличением числа м-холинорецепторов в гиппокампе и полосатом теле крыс, что наблюдалось как *in vitro*, так и *in vivo* [19]. Антиамнестическое и прокогнитивное действие было также показано ранее для дихолина сукцината [9]. Метилэтилпиридинола сукцинат и меглмина натрия сукцинат демонстрировали моноаминоксидаза-модулирующую, антидепрессивную и антинейродегенеративную активность в экспериментах на животных [24]. Производное янтарной кислоты *p*-гидроксифенилсукцинамид у крыс со скополаминовой амнезией оказывало антиамнестический эффект, опосредованный аллостерической модуляцией центральных m_1 -холинорецепторов [10].

Метионин в составе СМР преимущественно трансформируется печеночной метионаденозилтрансферазой в *S*-аденозил-L-метионин (адеметионин) [17], что позволяет предполагать у него эффекты, сходные с АМ. Тем не менее, по сравнению с АМ, использование комбинации СМР в эксперименте не сопровождалось повышением тревожности. Для янтарной кислоты и метилэтилпиридинола сукцината у грызунов показано наличие анксиолитического и седативного эффектов, которые могут быть опосредованы влиянием на ГАМК-ергическую передачу [18, 24]. Таким образом, добавление янтарной кислоты к метионину может уменьшать анксиогенный потенциал последнего. В тесте РНО не наблюдали изменений времени изучения объектов, доли времени, затрачиваемого животными на изучение нового объекта, или индекса дискриминации ни в одной из экспериментальных групп, что также согласуется с полученными ранее данными [21].

В тесте ТПП наблюдали выраженное снижение базовой физической работоспособности животных, что проявлялось значимым ($p < 0,01$) уменьшением времени плавания в группе “Контроль”, по сравнению с группой “Интакт” (рис. 4). Снижение базовой аэробно-анаэробной физической работоспособности является характерным как для грызунов [21], так и пациен-

тов с хроническими заболеваниями печени [20]. По оценкам исследователей, до 58 % пациентов с НАЖБП сталкиваются с проявлениями астеновегетативного синдрома, включая хроническую усталость и повышенную утомляемость [3, 8].

При проведении стимуляционной ЭНМГ не наблюдали значимых различий между экспериментальными группами по параметрам М-ответов, а также СПИ. Тем не менее, в группе Контроль отмечали умеренную тенденцию к снижению максимальных амплитуды и площади М-ответов, пороговых сил тока для *m. gastrocnemius*, а также к снижению СПИ по *n. musculocutaneus*. Эти изменения, вероятно, могут быть следствием начальных проявлений развивающейся нейромоторной дисфункции с явлениями периферической нейропатии. Результаты проведенного Gu, et al. срезового исследования свидетельствуют о наличии прямой корреляции между НАЖБП и развитием периферической полинейропатии у пациентов в возрасте от 40 до 85 лет [12].

Проведенными исследованиями установлено, что комбинация сукцинат + метионин + рибофлавин обладает гепатопротекторной и нейротропной активностью у мышей с экспериментальной моделью НАЖБП на стадии стеатогепатита. Комбинация сукцинат + метионин + рибофлавин при курсовом введении обладала значимым антицитолитическим эффектом, положительно регулировала экспрессию маркеров метаболической дисфункции, стеатоза и фиброза, а также восстанавливала уровень исследовательской активности и состояние рабочей памяти, сниженные на фоне патологии печени.

Таким образом, применение комбинации СМР представляется целесообразным для коррекции центральных когнитивно-мнестических нарушений, ассоциированных с НАЖБП, и, по-видимому, лишено риска увеличения тревожности как побочного эффекта, свойственного адеметионину. Потенциал комбинации для лечения хронических патологий печени и их психоневрологических осложнений заслуживает дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Комбинация СМР (88,3 мг/кг/сут янтарной кислоты + 70,64 мг/кг/сут метионина + 1,06 мг/кг/сут рибофлавина) и референтный препарат АМ (211 мг/кг/сут при пероральном введении на протяжении 3 мес в профилактическом режиме не оказывают влияния на выживаемость животных с моделью НАСГ.

2. СМР и АМ снижают активность АЛТ ($p < 0,05$, $0,01$), нормализуют уровни глюкозы плазмы крови ($p < 0,05$), повышают экспрессию ApoA1 и MMP9 ($p < 0,05$), снижают экспрессию SCD1 ($p < 0,05$, $0,01$), улучшают состояние рабочей пространственной памяти мышей ($p < 0,05$, $0,01$).

3. В отличие от АМ, комбинация СМР дополнительно снижает экспрессию HAS2 ($p < 0,05$) и увеличивает

частоту проявлений исследовательской активности (заглядываний в “норки”) ($p < 0,01$) без нежелательного анксиогенного эффекта (уменьшения времени без движения, увеличения частоты замираний) ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская, М. С. Жаркова и др., *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.*, **32**(4), 104 – 140 (2022); doi: 10.22416 / 1382-4376-2022-32-4-104-140
2. Н. Н. Каркищенко, В. Н. Каркищенко, Е. Б. Шустов и др., *Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность. Методические рекомендации*, Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва (2017).
3. Л. Б. Лазебник, Е. В. Голованова, С. В. Туркина и др., *Эксперим. и клин. гастроэнтерол.*, **1**(1), 4 – 52 (2021); doi: 10.31146 / 1682-8658-ecg-185-1-4-52
4. С. В. Оковитый, *Лечащий врач*, **8**, 38 – 43 (2020); doi: 10.26295 / OS.2020.65.19.005
5. С. В. Оковитый, К. Л. Райхельсон, В. А. Приходько, *Эксперим. и клин. гастроэнтерол.*, **203**(7), 5 – 20 (2022); doi: 10.31146 / 1682-8658-ecg-203-7-5-20
6. А. И. Павлов, А. Ф. Иволгин, С. В. Катенко и др., *Терапевт. архив*, **93**(8), 890 – 896 (2021); doi: 10.26442 / 00403660.2021.08.200974
7. В. А. Приходько, С. В. Оковитый, *Терапия*, **8**(7(59)), 64 – 77 (2022); doi: 10.18565 / therapy.2022.7.64 – 77
8. К. Л. Райхельсон, Э. А. Кондрашина, *Терапевт. архив*, **91**(2), 134 – 142 (2019); doi: 10.26442 / 00403660.2019.02.000130
9. B. H. Cline, H. W. Steinbusch, D. Malin, et al., *BMC Neurosci.*, **18**(13), 110 (2012); doi: 10.1186 / 1471-2202-13-110
10. J. Espinosa-Raya, M. Espinoza-Fonseca, O. Picazo, J. Trujillo-Ferrara, *Med. Chem.*, **3**(1), 7 – 11 (2007); doi: 10.2174 / 157340607779317526
11. A. Gonzalez, C. Huerta-Salgado, J. Orozco-Aguilar, et al., *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2020**, 1617805 (2020); doi: 10.1155 / 2020 / 1617805
12. X. Gu, D. Tang, Y. Xuan, et al., *Sci Rep.*, **13**(1), 5304 (2023); doi: 10.1038 / s41598-023-32115-4
13. S. Hemmann, J. Graf, M. Roderfeld, E. Roeb, *J. Hepatol.*, **46**(5), 955 – 975 (2007); doi: 10.1016 / j.jhep.2007.02.003
14. K. Kjærgaard, A. C. D. Mikkelsen, C. W. Wernberg, et al., *J. Clin. Med.*, **10**(4), 673 (2021); doi: 10.3390 / jcm10040673
15. Z. Li, P. N. Pfeiffer, K. J. Hoggatt, et al., *Clin. Ther.*, **33**(12), 1985 – 1992 (2011); doi: 10.1016 / j.clinthera.2011.11.010
16. M. E. Losada, M. C. Rubio, *Eur. J. Pharmacol.*, **163**(2 – 3), 353 – 356 (1989); doi: 10.1016 / 0014-2999(89)90205-7
17. J. M. Mato, M. L. Martínez-Chantar, S. C. Lu, *Ann. Hepatol.*, **12**(2), 183 – 189 (2013); doi: 10.1016 / S1665-2681(19)31355-9
18. M. N. Mia, S. Z. Smrity, M. H. Bappi, et al., *Food Biosci.*, **55**, 103044 (2023); doi: 10.1016 / j.fbio.2023.103044
19. G. Muccioli, A. Scordamaglia, S. Bertacco, R. Di Carlo, *Eur. J. Pharmacol.*, **227**(3), 293 – 299 (1992); doi: 10.1016 / 0922-4106(92)90007-i
20. J. L. Newton, D. E. Jones, E. Henderson, et al., *Gut*, **57**(6), 807 – 813 (2008); doi: 10.1136 / gut.2007.139303
21. V. A. Prikhodko, T. M. Matuzok, V. E. Karev, et al., *Livers*, **4**(1), 63 – 83 (2024); doi: 10.3390 / livers4010006
22. A. Schulz, C. Walther, H. Morrison, R. Bauer, *J. Vis. Exp.*, **86**, 51181 (2014); doi: 10.3791 / 51181
23. T. Tsuchida, Y. A. Lee, N. Fujiwara, et al., *J. Hepatol.*, **69**(2), 386 – 395 (2018); doi: 10.1016 / j.jhep.2018.03.011

24. I. A. Volchegorskii, A. I. Sintskii, I. Yu. Miroshnichenko, L. M. Rassokhina, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **56**, 11 – 21 (2020); doi: 10.1134 / S0022093020010020
25. D. Wahlsten, *Mouse Behavioral Testing. How to Use Mice in Behavioral Neuroscience*, 1st ed., Amsterdam (2010).
26. Y. Wang, L. Jiao, C. Qiang, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **171**, 116116 (2024); doi: 10.1016 / j.biopha.2023.116116
27. Y. M. Yang, M. Nouredin, C. Liu, et al., *Sci. Transl. Med.*, **11**(496), eaat9284 (2019); doi: 10.1126 / scitranslmed.aat9284
28. D. Zhang, D. Zhou, X. Wang, et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **126**(1), 2300020 (2023); doi: 10.1002 / ejlt.202300020

Поступила 28.05.24

HEPATO- AND NEUROTROPIC ACTIVITY OF A COMBINATION OF SUCCINIC ACID, METHIONINE, AND RIBOFLAVIN IN EXPERIMENTAL NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

V. A. Prikhodko¹, T. M. Matuzok¹, E. I. Eletskaia¹, E. D. Semivelichenko¹,
V. E. Karev², A. V. Karavaeva¹, S. O. Eresko^{3,4}, D. Yu. Ivkin¹, N. O. Selizarova¹, and S. V. Okovityi¹

¹ Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, 197376 Russia

² Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, Saint Petersburg, 197022 Russia

³ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, 197022 Russia

⁴ ITMO University, Saint Petersburg, 197101 Russia

e-mail: e_talikova@polysan.ru

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an increasingly prevalent multi-system metabolic disease that still lacks adequately effective and safe treatments. The study was carried out to evaluate the hepato- and neuroprotective potential of a fixed-dose combination of succinic acid (88.3 mg/kg/d), methionine (70.64 mg/kg/d), and riboflavin (1.06 mg/kg/d) (SMR) in comparison with ademetonine (211 mg/kg/d) (AM) during course (3 months) oral administration in male mice with experimental non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Experimental diet- and toxin-induced NASH in mice was characterized with reduced survival (mortality odds ratio of 10.05, $p < 0.01$, distinctive morphological liver alterations (steatosis, hepatocyte ballooning, pathological cellular infiltrate) and blood biochemical abnormalities (increased alanine aminotransferase activity, $p < 0.01$), hyperexpression of several markers of fibrogenesis and steatosis (hyaluronan synthase-2 (HAS2), stearyl-coenzyme A desaturase (SCD1), $p < 0.05$). A decrease in the general locomotion and exploration (decreased speed of movement and hole poking frequency, $p < 0.05$; decreased rearing frequency, $p < 0.01$), working memory (decreased spontaneous alternation frequency, $p < 0.05$) and physical performance of mice (reduced forced swimming duration, $p < 0.01$) were observed along with NASH. The SMR combination as well as the reference drug AM demonstrated an anticytolytic effect (decreased transaminase activity, $p < 0.05$) and ameliorated the expression profiles of liver damage biomarkers (increased apolipoprotein A1, matrix metalloproteinase-9 expression, $p < 0.05$; decreased HAS2, SCD1 expression, $p < 0.05$). SMR administration improved working memory (increased spontaneous alternation frequency, $p < 0.01$) and restored normal exploration in mice (increased hole poking frequency, $p < 0.05$), with no significant impact on anxiety levels. None of the drugs affected the physical performance and the parameters of the neuromuscular function. Thus, a course administration of SMR proved the efficacy in restoring the liver morphology and function, as well as the concomitant neurological abnormalities without affecting the anxiety-like behavior in mice. The mechanisms of action and specific aspects of the hepato- and neurotropic activity of the combination require further clarification.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease; non-alcoholic steatohepatitis; succinic acid; methionine; riboflavin; hepatoprotection; neuroprotection; mice.