

ГИЛЕВА ОЛЬГА ГЕОРГИЕВНА

**СОДЕРЖАНИЕ НЕКОЛЛАГЕНОВЫХ БЕЛКОВ
МЕЖКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ И
ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ**

1.5.4. Биохимия (биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа-2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Бутолин Евгений Германович Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Данилова Ирина Георгиевна Заведующая лабораторией морфологии и биохимии, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук
Доктор биологических наук

Камилов Феликс Хусаинович Профессор кафедры биологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Защита диссертации состоится «12» апреля 2023 г. в «10.00» часов на заседании Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71, конференц-зал ИБГ УФИЦ РАН (ком. № 406).

С диссертацией можно ознакомиться на сайтах ВАК РФ и УФИЦ РАН <http://ufaras.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
24.1.218.01
доктор биологических наук, доцент

Гульназ Фаритовна Корытина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Изучение обмена и содержания белков внеклеточного матрикса соединительной ткани на сегодняшний день вызывает все больший интерес у исследователей (Могильницкая, 2015; Matlin et al., 2017; Dalton et al., 2021; Patten et al., 2021). Благодаря широкому распространению в организме, соединительная ткань участвует практически во всех метаболических процессах в клеточных и тканевых структурах различной локализации и является своего рода отражением дисбаланса в них.

В ранних работах проведены исследования по изучению особенностей обмена коллагена в норме и при различных патологиях (Слуцкий, 1969; Серов и др., 1981; Шараев и др., 2005; Кононова и др., 2012; Gulevsky et al., 2020). На данный момент особый интерес представляют неколлагеновые адгезивные белки межклеточного матрикса, такие как фибронектин и ламинин, участвующие в межклеточных взаимодействиях, клеточной миграции и процессах репарации. В силу уникальности структуры и выполняемых функций весьма актуальным является изучение содержания данных гликопротеинов при обменных нарушениях различной этиологии, в том числе обусловленных развитием метаболического синдрома (МС) на фоне высокоуглеводного и высокожирового питания, а также под влиянием стрессорных факторов.

Основными критериями диагностики МС, как фактора риска развития сахарного диабета, атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, наряду с избыточной массой тела являются нарушения в углеводном, липидном обмене с сопутствующей гипергликемией, гиперинсулинемией, дислипидемией (Вербовой и др., 2021; Кытикова и др., 2021). Связующим звеном указанных изменений считается инсулинорезистентность, влияющая посредством характерных механизмов на состояние сосудистой стенки и формирование дислипидемии (Вербовой и др., 2021).

Потребление высокоуглеводных и высокожировых рационов питания может привести к формированию основных признаков МС. Особенно значимо повышенное содержание в продуктах питания фруктозы, которая в силу ее особого метаболизма способствует как стимуляции липогенеза в печени и увеличению циркуляции в крови свободных жирных кислот и триглицеридов, так и развитию гипергликемии (Апратин и др., 2018). Рационы, богатые жирами, могут явиться причинами нарушений в липидном и углеводном метаболизме за счет повышенного поступления экзогенного животного жира, процессов его ассимиляции и накопления избыточной жировой ткани с последующим развитием воспалительных процессов в ней. Следствием протекающих процессов является снижение чувствительности клеток отдельных тканей и органов к инсулину, развитие дислипидемии, гипергликемии, эндотелиальной дисфункции (Апратин и др., 2018). Метаболические сдвиги в данных условиях приводят к развитию нарушений практически во всех органах и тканях (Решетняк и др., 2011).

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в изучении и диагностике МС, многие аспекты его влияния на ткани и органы остаются недостаточно освещенными, в том числе вопрос об изменении содержания отдельных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани при данном симптомокомплексе.

Высококалорийное питание в процессе жизнедеятельности неразрывно связано со стрессовыми явлениями. В последнее время изучению стресса придается все более значимое внимание, что определяется ускоренным темпом жизни, информационными перегрузками, конфликтными ситуациями, особенностями образа жизни (Жигулина, 2014). Известно, что стрессовая реакция в биохимическом аспекте сопровождается изменениями в углеводном и липидном метаболизме, обмене коллагеновых белков соединительной ткани, но в текущий период времени в литературе недостаточно сведений о влиянии стресса на регуляторные неколлагеновые белки межклеточного матрикса.

В настоящее время появилось множество сообщений о применении препарата сулодексид из группы гликозаминогликанов в лечении ряда патологий, в том числе ассоциированных с сахарным диабетом и формирующейся дисфункцией эндотелия (Мелькумянц и др., 2021; Bignamini et al., 2021; Булка и др., 2022). В основе работ лежит предположение о его позитивном воздействии на сосудистый эндотелий в результате коррекции выработки вазоактивных факторов и инициации фибринолитической активности на фоне нарушений в липидном и углеводном обмене. В связи с этим, представляет интерес изучение влияния данного препарата на содержание биополимеров межклеточного матрикса в условиях МС.

Степень разработанности темы исследования. В последние годы проблеме метаболического синдрома уделяли внимание такие авторы как Апрятин С.А., Мжельская К.В. и другие (Апрятин и др., 2018). Их работы были направлены на изучение влияния высокоуглеводного и высокожирового питания на углеводный и липидный метаболизм, лежащие в основе формирования метаболического синдрома. Существенный вклад в исследование проблемы развития основных признаков метаболического синдрома и других патологий, вызванных МС, внесли работы Медведева И.Н. (Медведев и др., 2016). Наряду с этим, исследования Мисниковой И.В. были направлены на изучение изменений в углеводном обмене в рамках данной патологии (Мисникова и др., 2016). Определенное влияние на освещение вопроса эндотелиальной дисфункции на фоне метаболического синдрома оказали работы Игнатенко Г.А. и Мустафаевой А.Г. (Мустафаева и др., 2018; Игнатенко и др., 2020). Помимо этих, работы других авторов в значительной мере способствовали формированию целостного представления о метаболическом синдроме, его влиянии на различные ткани и органы, однако в этих трудах ученых не в полной мере оценивалось состояние соединительной ткани и ее биополимеров.

Рассмотрению современных представлений о проявлениях механизмов стресса, морфофункциональным изменениям в надпочечниках в условиях иммобилизации, развитию окислительных реакций в условиях иммобилизационного стресса были посвящены исследования ряда авторов (Кузьменко и др., 2013; Полина и др., 2020; Волкова и др., 2021). В более ранний период времени вопросам стрессовой реакции, процессам адаптации были посвящены работы Ганса Селье (Selye, 1936). Позднее, такие ученые как Судаков К.В., Тигранян Р.А. детально разобрали проблемы иммобилизационного стресса в экспериментальных условиях (Тигранян, 1988; Судаков и др., 1995). Однако в этих работах недостаточно освещены вопросы влияния различных стресс-факторов на внеклеточный матрикс соединительной ткани. Работы Шараева П.Н., Бутолина Е.Г. в значительной мере способствовали изучению коллагеновых белков соединительной ткани при различного рода стресс-воздействиях (Бутолин, 1993; Шараев и др., 2005). В большей части эти исследования охватывали обмен коллагеновых белков межклеточного матрикса, но недостаточно затрагивали изменения в содержании неколлагеновых адгезивных белков.

Наряду с этим, ранние работы Слуцкого Л.И., Елисеева В.Г. посвящены состоянию биохимии соединительной ткани (Елисеев, 1961; Слуцкий, 1969). В них содержатся основные сведения о химии компонентов соединительной ткани – коллагена, эластина и гликопротеинов, путях их биосинтеза и деградации. Исследование отдельных представителей неколлагеновых белков нашло отражение лишь в современных работах Могильницкой Л.А. в оценке содержания фибронектина в крови больных сахарным диабетом 1 типа (Могильницкая, 2015). Помимо этого, Лыков А.П., Долгих А.В., Васильев С.А. рассмотрели как генетически детерминированные особенности структуры фибронектина, так и влияние его на миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии и содержание в крови пациентов с инфарктом миокарда (Лыков и др., 2014; Долгих и др., 2018; Васильев и др., 2022). Наряду с этим, исследовательские работы Батюшина М.М. были направлены на изучение ламинина в структуре гломерулярной мембраны, Юзефовича Н.А. – на особенности экспрессии ламинина в средней оболочке стенки аорты (Батюшин и др., 2016; Юзефович, 2017).

Кроме того, работы многих авторов были основаны на оценке коррекции приобретенных нарушений в общем метаболизме. В основном рассматривались препараты естественного происхождения, такие как сулодексид. Так, ряд ученых определили эффективность его применения при сахарном диабете 2 типа (Панюшкина и др., 2014; Vignamini et al., 2021). Перминова О.В. оценила благотворное влияние сулодексида на содержание углеводсодержащих биополимеров миокарда (Перминова, 2006). Другие авторы пришли к выводу, что сулодексид обладает выраженным эндотелиопротективным действием (Li et al., 2017; Елагина и др., 2020;

Мелькумянц и др., 2021). Вместе с тем, информация о влиянии сулодексида на компоненты межклеточного матрикса соединительной ткани в литературных источниках недостаточна.

Таким образом, проведенные ранее исследования выявили особенности обменных процессов при метаболическом синдроме, иммобилизационном стрессе, другие работы охарактеризовали метаболизм соединительной ткани. Исходя из этого, актуальным является интерес в изучении неколлагеновых белков межклеточного матрикса при экспериментальном метаболическом синдроме, иммобилизационном стрессе, их сочетании и на фоне коррекции препаратом сулодексид.

Цель исследования: изучить изменения в содержании основных неколлагеновых белков межклеточного матрикса – фибронектина и ламинина – при экспериментальном метаболическом синдроме, иммобилизационном стрессе, их сочетаниях, а также на фоне введения сулодексида.

Задачи исследования:

1. Провести верификацию экспериментальных моделей метаболического синдрома, основанных на фруктозообогащенной и высокожировой диетах.
2. Изучить влияние фруктозообогащенной и высокожировой диет, иммобилизационного стресса и их сочетания на основные показатели липидного и углеводного обмена.
3. Проанализировать влияние фруктозообогащенной и высокожировой диет, иммобилизационного стресса и их сочетания на содержание фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс.
4. Оценить эффект введения сулодексида на содержание фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс при экспериментальном метаболическом синдроме, вызванном фруктозообогащенной и высокожировой диетами.

Научная новизна исследования. Впервые изучены особенности обмена основных неколлагеновых гликопротеинов межклеточного матрикса соединительной ткани – фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс при экспериментальном метаболическом синдроме, иммобилизационном стрессе и их сочетании. Показано увеличение уровня фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс при экспериментальном метаболическом синдроме, вызванном фруктозообогащенной и высокожировой диетами, и его сочетании с иммобилизационным стрессом. Вместе с тем, при «изолированной» иммобилизации рост изучаемых гликопротеинов в крови животных не наблюдался за исключением ткани печени крыс, где содержание фибронектина достигло статистически значимых от контроля отличий на 35-й день опыта.

Подтверждено, что в условиях фруктозообогащенной и высокожировой диет наблюдается увеличение содержания показателей липидного и углеводного обмена в крови крыс с

формированием инсулинорезистентности, в то время как при иммобилизационном стрессе и его сочетании с изучаемыми диетами была характерна лишь дислипидемия.

Впервые выявлены изменения в содержании исследуемых биополимеров межклеточного матрикса в условиях фруктозообогащенной и высокожировой диет на фоне введения препарата сулодексид. Показано, что сулодексид нормализует измененные показатели липидного и углеводного обмена как при фруктозообогащенной, так и высокожировой диетах. Одновременно, сулодексид снижает содержание фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты исследования носят фундаментальный характер. Они дополняют представления о биополимерах межклеточного матрикса соединительной ткани и их содержании при экспериментальном метаболическом синдроме, вызванном фруктозообогащенной и высокожировой диетами, иммобилизационном стрессе, их сочетании и на фоне коррекции сулодексидом.

Полученные результаты позволяют расширить методы диагностики компонентов межклеточного матрикса в условиях высококалорийного питания, метаболического синдрома, воздействия стресс-факторов, актуальных на сегодняшний день, и связанных с ними нарушений структурной и функциональной целостности гепатоцитов. Фибронектин и ламинин могут явиться одними из маркеров таких изменений и помочь в разработке новых способов ранней диагностики стеатоза, стеатогепатита и фиброза печени.

Методология и методы исследования. В ходе проведенного экспериментального исследования была использована общенаучная методология, основанная на методах эмпирического анализа, общелогических и специфических методах. В данной работе были поставлены экспериментальные серии на крысах, при этом наблюдались метаболические изменения в изучаемых показателях. Анализировалось влияние экспериментальных моделей метаболического синдрома, двухчасовой иммобилизации и их сочетания на обменные процессы у крыс; изучалось влияние препарата сулодексид на измененные показатели метаболизма у экспериментальных животных.

В работе использованы биохимические методы исследования для оценки биохимических показателей в крови и ткани печени крыс; методы иммуноферментного анализа для определения содержания неколлагеновых гликопротеинов и гормонов. Проводилась статистическая обработка результатов исследования с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для двух независимых групп и Краскела-Уоллиса для сравнения трех или более выборок, коэффициента корреляции Спирмена. Постановка всех экспериментальных серий выполнена в соответствии с требованиями нормативных и законодательных актов об этических принципах работы с лабораторными животными.

Положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальный метаболический синдром на основе фруктозообогащенной и высокожировой диет сопровождается дислипидемией, гипергликемией, гиперинсулинемией, инсулинорезистентностью. «Изолированный» иммобилизационный стресс и стресс в сочетании с метаболическим синдромом приводят к дислипидемии, но не влияют на развитие гипергликемии.
2. Фруктозообогащенная и высокожировая диеты, в том числе в сочетании с иммобилизационным стрессом вызывают повышение содержания фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс. «Изолированный» иммобилизационный стресс влияет только на рост фибронектина в ткани печени крыс.
3. Введение сулодексида способствует нормализации показателей липидного и углеводного обмена и уровня фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс, повышенных на фоне фруктозообогащенного и высокожирового питания.

Степень достоверности и апробация работы. Теоретические установки экспериментального исследования основаны на анализе существенного объема научной литературы по изучаемой тематике работы. Для исследования были выбраны соответствующие современные методы исследования, достаточное для поставленных задач количество экспериментальных животных. В расчете достоверности отличий полученных результатов использовались адекватные непараметрические методы статистики. Наблюдаемая воспроизводимость полученных данных в исследовании и сопоставимые с другими авторами результаты указывают на правильность сформулированных выводов. Положения, выносимые на защиту, заключительные выводы соответствуют поставленной цели и задачам.

Материалы научной работы были доложены на LXXX научно–практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2019» (Россия, Санкт-Петербург, апрель 2019); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы» (Россия, Тюмень, октябрь 2019); VI международном круглом столе «Питание и метаболический синдром» (Россия, Екатеринбург, ноябрь 2022); совместном научном заседании кафедр клинической биохимии и лабораторной диагностики, нормальной физиологии, патофизиологии, биохимии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (Ижевск, 2022).

Внедрение результатов работы в практику. Результаты исследовательской работы внедрены в учебную практику кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный

университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» Министерства науки и высшего образования РФ, кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», а также используются в учебном процессе на кафедрах нормальной физиологии; гистологии, эмбриологии и цитологии; патологической физиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России.

Личный вклад автора. Диссертантом разработана схема исследования, написан обзор литературных источников, осуществлен сбор биоматериала, выполнены все лабораторные исследования, проведена статистическая обработка полученных результатов, оформление диссертационной работы. Публикации результатов работы в научной литературе, представление их в виде докладов на конференциях осуществлялись автором лично.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, из них 4 работы в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ, в том числе 3 работы индексируемых Scopus и Web of Science.

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Областью исследования представленной научной работы является теоретическое и практическое изучение неколлагеновых белков соединительной ткани, изменение их содержания при экспериментальном метаболическом синдроме, вызванном высокожировой и фруктозообогащенной диетами, иммобилизационном стрессе и его сочетании с указанными диетами, коррекция препаратом сулодексид сформированных обменных нарушений в липидном, углеводном обмене, содержании неколлагеновых белков межклеточного матрикса – фибронектина и ламинина. Концентрацию изучаемых аналитов в сыворотке крови и гомогенате ткани печени крыс оценивали с помощью биохимических и иммуноферментных методов исследования. Указанная область и способы исследования соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия (биологические науки).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 170 страницах печатного текста, содержит 31 таблицу и 38 рисунков. Список литературы включает 240 источников (157 на русском и 83 на иностранном языке).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследования. Работу с животными выполняли в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 №193н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Исследование одобрено локальным этическим

комитетом ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол заседания № 652 от 23.04.2019).

Все крысы рандомизированы на 7 опытных и 3 контрольные группы. Каждая группа включала по 24 особи, по 8 на каждый исследуемый временной отрезок (21-й, 35-й и 60-й день опыта). Контрольные и опытные группы животных были сопоставимы по возрасту.

Крыс содержали в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» в клетках при температуре плюс $20\pm 3^{\circ}\text{C}$, влажности 45-65%, режиме естественного освещения 12-часового светового дня. Все животные имели неограниченный доступ к пище и воде. Описание экспериментальных серий представлено в Таблице 1.

Таблица 1 – Описание экспериментальных серий в исследовании

| Номер серии эксперимента | Число особей, n | Описание экспериментальной серии |
|--|-----------------|---|
| Экспериментальное моделирование метаболического синдрома | | |
| Контроль 1 | 24 | Стандартные условия вивария (ГОСТ Р 50258-92) (74,4 ккал в сутки на 1 крысу) (Бирулина и др., 2020). |
| 1. | 24 | Фруктозообогащенная диета: 60% фруктозы, 20% белка, 9% клетчатки, 6% жира, 5% витаминно-минеральной смеси от суточного рациона (161,5 ккал в сутки на 1 крысу) (Ackerman et al., 2005; Kawasaki et al., 2009; Лещенко и др., 2015). |
| 2. | 24 | Высокожировая диета: 44% свиного сала и 9% растительного масла, 47% комбикорма от суточного рациона (231,4 ккал в сутки на 1 крысу) (Лещенко и др., 2015; Lizuka, 2017). |
| Коррекция препаратом сулодексид | | |
| Контроль 2 | 24 | Стандартные условия вивария (ГОСТ Р 50258-92) и ежедневная подкожная инъекция 0,25 М раствора хлористого натрия (Перминова, 2006; Бирулина и др., 2020). |
| 3. | 24 | Введение препарата сулодексид в дозировке 8,5 ЛЕ/кг (в перерасчете на массу тела животного) на фоне фруктозообогащенной диеты (Перминова, 2006; Лещенко и др., 2015). |
| 4. | 24 | Введение препарата сулодексид в дозировке 8,5 ЛЕ/кг (в перерасчете на массу тела животного) на фоне высокожировой диеты (Перминова, 2006; Lizuka, 2017). |
| Серии с иммобилизационным стрессом | | |
| Контроль 3 | 24 | Стандартные условия вивария (ГОСТ Р 50258-92) (74,4 ккал в сутки на 1 крысу) (Бирулина и др., 2020). |
| 5. | 24 | Иммобилизационный стресс путем фиксации на спине за четыре конечности в течение двух часов (Тигранян, 1988). |
| 6. | 24 | Иммобилизационный стресс в условиях фруктозообогащенной диеты (Тигранян, 1988; Ackerman et al., 2005; Kawasaki et al., 2009; Лещенко и др., 2015). |
| 7. | 24 | Иммобилизационный стресс в условиях высокожировой диеты (Тигранян, 1988; Лещенко и др., 2015; Lizuka, 2017). |

Для серий эксперимента с иммобилизационным стрессом проводили отбор крыс по показателю стресс-устойчивости по общепринятой методике «открытое поле» (Коплик, 2002). Рассчитывался «коэффициент устойчивости к стрессу» или КСР, равный отношению суммы

горизонтальной двигательной активности на периферии и в центре к сумме латентных периодов выхода в центр и первого движения (Коплик, 2002). Крысы с КСР $>1,5$ были отнесены к высокой, с КСР $<0,8$ – к низкой устойчивости к стрессу (Будкевич и др., 2011). Животных с промежуточным значением стресс-устойчивости КСР от значения 0,8 до 1,5 отбирали для текущего исследования.

Критериями включения в исследование явились: начальная масса тела 220-280г, гендерный признак – самцы. В сериях с иммобилизационным стрессом – уровень стресс-устойчивости – промежуточная.

Методы исследования. Динамику изменений исследуемых показателей углеводного, липидного обмена, а также содержание фибронектина и ламинина изучали на 21-й, 35-й и 60-й день с момента начала опыта (Лещенко и др., 2015). На 21-й день исследовали изменения в содержании аналитов в течение воздействия, на 35-й – по его окончанию. На 60-й день оценивали сформированность метаболических изменений в отдаленный период времени. На 21-й, 35-й и 60-й день животных выводили из эксперимента путем декапитации под кратковременным эфирным наркозом, кровь собирали из шейной вены в стеклянные пробирки. Сыворотку крови получали после центрифугирования пробирок с кровью при 3000 об/мин в течение 15 минут. Из ткани печени готовили гомогенат, центрифугировали и в дальнейшем работали с супернатантом.

Биохимические анализы выполняли на автоматическом анализаторе «AU-480» («Beckman Coulter», США) реагентами производства «Beckman Coulter», США. В сыворотке крови крыс определяли содержание глюкозы, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ); в сыворотке крови и гомогенате ткани печени крыс – концентрацию холестерина общего (ХС), холестерина липопротеинов низкой плотности (далее - ЛНПН), холестерина липопротеинов высокой плотности (далее - ЛПВП), триглицеридов (ТГ).

Иммуноферментными методами исследования с помощью соответствующих реактивов в сыворотке крови определяли концентрацию инсулина и кортикостерона; в сыворотке крови и ткани печени крыс – содержание фибронектина и ламинина. Оптическую плотность проб в эксперименте измеряли с помощью лабораторного фотометра «Stat Fax 2100» («Awareness Technology», США). Значения оптической плотности пересчитывали в концентрацию исследуемых веществ в соответствии с инструкциями к наборам реагентов.

Индексы инсулинорезистентности НОМА и CARO, индекс атерогенности (ИА) рассчитывали по соответствующим формулам (Долгов, 2018).

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки результатов использовали пакет «Statistica 8.0». В связи с отсутствием нормального распределения по критерию Шапиро-Уилка достоверность отличий полученных результатов оценивали с помощью

непараметрического U-критерия Манна-Уитни для двух независимых групп и Краскела-Уоллиса для сравнения трех или более выборок. Взаимосвязь изучаемых показателей оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Данные исследования представляли в виде медианы (Me), вариабельность изменений – в виде первого Q25 и третьего Q75 квартилей. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез в исследовании принимали равным 0,05.

Дизайн исследования представлен на Рисунке 1.

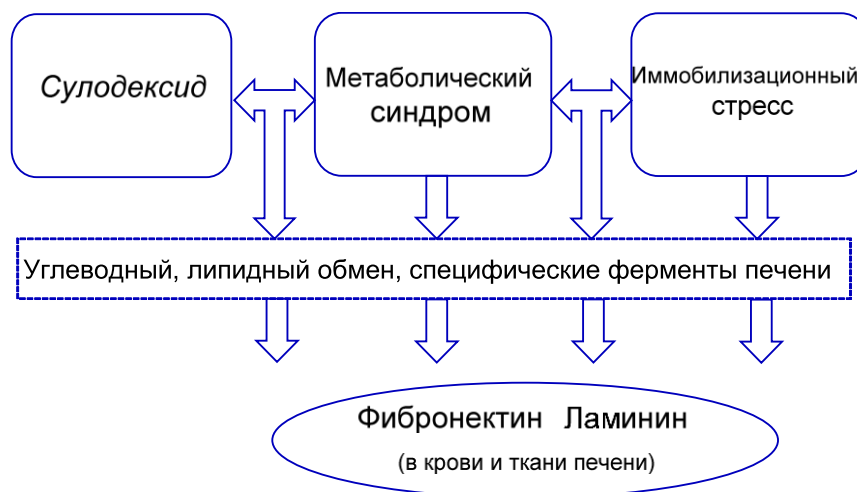


Рисунок 1- Дизайн исследования

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальном метаболическом синдроме на основе фруктозообогащенной и высокожировой диет, иммобилизационном стрессе и их сочетании наблюдались изменения в липидном, углеводном обмене в крови и ткани печени крыс.

Так, при моделировании МС с помощью фруктозообогащенной диеты содержание глюкозы в сыворотке крови крыс возрастало к 21-му дню до 7,74 [7,62; 7,88] ммоль/л (+19,4%, $p < 0,05$), при высокожировой диете – до 8,30 [7,33; 8,47] (+27,9%, $p < 0,05$) ммоль/л против 6,48 [6,31; 6,94] ммоль/л в контроле, причем при фруктозообогащенной диете уровень гликемии оставался повышенным на 35-й и 60-й день опыта, тогда как при высокожировом питании достигал максимального значения на 35-й день - 9,78 [9,47; 9,87] ммоль/л ($p < 0,05$). К окончанию опыта содержание глюкозы в крови существенно не отличалось от контроля ($p > 0,05$).

Концентрация инсулина при фруктозообогащенной диете в крови крыс увеличилась на 42,9% относительно контроля ($p < 0,05$) на 21-й день опыта и продолжала возрастать к его окончанию - на 124,5% ($p < 0,05$). При высокожировой диете наблюдалась тенденция к увеличению содержания инсулина с достоверно отличным значением от контроля на 60-й день – на 131,3% ($p < 0,05$). Кроме того, на 21-й день эксперимента с фруктозообогащенной диетой

сформировалась выраженная резистентность к инсулину, показателями которой явились индексы инсулинорезистентности HOMA и CARO со значениями 0,85 [0,79; 0,92] у.е. (+77,1% к контролю) и 3,16 [3,04; 3,36] у.е. (-21,8% от контроля) соответственно ($p < 0,05$). При высокожировой диете индекс HOMA приобрел несколько меньшее статистически значимое отличное от контроля значение на 21-й день эксперимента – 0,77 [0,66; 0,85] у.е., а индекс CARO – к 60-му дню – 2,3 [1,99; 2,85] у.е. ($p < 0,05$). Контрольные значения индексов HOMA на 21-й день и CARO на 60-й день опыта составили 0,48 [0,42; 0,52] у.е. и 4,24 [3,12; 5,98] у.е. соответственно. В норме индекс HOMA должен быть меньше, а индекс CARO больше контрольных значений.

Концентрация ХС и ЛПНП в крови при фруктозообогащенной диете достоверно повышалась с 21-го дня опыта и достигла максимума на 60-й день – на 106,1% и 277,2% больше значений интактных животных соответственно ($p < 0,05$). Аналогичный рост ХС и ЛПНП прослеживался в крови крыс и при высокожировой диете до 35-го дня опыта. Однако, на 60-й день одновременно с выраженным подъемом уровня ХС на 135,1% от контроля ($p < 0,05$), уровень ЛПНП снизился ($p > 0,05$). В содержании ТГ при фруктозообогащенной диете отмечалась тенденция к их увеличению с наибольшим значением на 35-й день опыта – на 80,3% больше контроля ($p < 0,05$). Напротив, при высокожировой диете уровень ТГ резко возрастал уже на 21-й день опыта (на 117,4% от контроля, $p < 0,05$) и увеличился на 180,3% в сравнении с контролем к 60-му дню эксперимента ($p < 0,05$). Концентрация ЛПВП при фруктозообогащенной диете достоверно возрастала с 0,45 [0,43; 0,47] ммоль/л в контроле до 0,67 [0,56; 0,69] ммоль/л на первом временном отрезке ($p < 0,05$), оставалась повышенной к 35-му дню, а на 60-й день практически не отличалась от значений интактных животных ($p > 0,05$). При высокожировой диете содержание ЛПВП достоверно увеличилось на всех временных интервалах, соответственно, на 25,6%, 59,3% и 48,9% ($p < 0,05$). Вероятно, рост ЛПВП носил как компенсаторный характер, так и определялся генетической предрасположенностью крыс к синтезу преимущественно данной транспортной формы липопротеинов (Лещенко, 2015). Как следствие указанных изменений в липидном обмене, отмечалось возрастание индекса атерогенности (ИА) в 2,07 раза на 21-й день опыта и в 2,35 раза к его окончанию в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

В ткани печени крыс в условиях фруктозообогащенной диеты наблюдалась тенденция роста содержания ХС, ЛПНП, ЛПВП и ТГ, однако достоверных изменений не регистрировалось в течение всего эксперимента. Отсутствие статистически значимого роста исследуемых показателей липидного обмена в печени могло быть связано с ускоренной элиминацией вновь образующихся липидных соединений в кровяное русло. В условиях высокожировой диеты отмечался значительный рост уровня ХС и ТГ в ткани печени преимущественно на 21-й и 35-й дни опыта – на 18,3%, 81,4% и 24,2%, 72,1% относительно контроля соответственно ($p < 0,05$).

Вероятно, данная диета в большей степени способствовала накоплению ХС и ТГ в печени, нежели фруктозообогащенная (Мисникова, 2016).

При двухчасовой иммобилизации крыс с промежуточным показателем стресс-устойчивости, а также при ее сочетании с фруктозообогащенной и высокожировой диетами отмечался рост концентрации кортикостерона в крови опытных крыс по сравнению с контрольной группой с наибольшим значением на 35-й день опыта: на 18,8%, 11,5% и 9,9% соответственно ($p < 0,05$).

Наряду с этим, для «изолированного» иммобилизационного стресса было характерно незначительное снижение содержания глюкозы и инсулина в крови крыс на 21-й день эксперимента с последующей тенденцией к росту на 35-й и 60-й дни ($p > 0,05$).

Потребление фруктозообогащенной диеты одновременно с иммобилизацией приводило к положительной динамике роста содержания глюкозы и инсулина на 21-й и 35-й день и последующим снижением на 60-й день эксперимента ($p > 0,05$). В отличие от фруктозообогащенной, высокожировая диета в сочетании с иммобилизацией способствовала выраженному подъему уровня инсулина на 53,1% в сравнении с контролем на 35-й день опыта ($p < 0,05$). Данные изменения отражались в показателе инсулинорезистентности НОМА при сочетании высокожировой диеты и стресса на 35-й день опыта - 0,91 [0,67; 1,26] у.е. против 0,5 [0,42; 0,55] у.е. в контроле ($p < 0,05$).

Помимо этого, на фоне иммобилизационного стресса в крови крыс наблюдался рост содержания ХС на 64,8% и 21% и ЛПНП – на 164,3% и 94,4% относительно контроля на 21-й и 35-й день эксперимента соответственно ($p < 0,05$). Сочетание иммобилизации с фруктозообогащенной диетой способствовало достоверному увеличению ХС на 35-й день (+30,5%; $p < 0,05$), а ЛПНП – на 60-й день (+218,7%; $p < 0,05$) опыта. Потребление крысами высокожировой диеты одновременно с иммобилизацией приводило к возрастанию ХС и ЛПНП уже на 21-й день эксперимента – на 78,1% и 275% соответственно в сравнении с контролем ($p < 0,05$). Вероятно, наряду с усилением процессов катаболизма при стрессе наблюдаемое увеличение показателей липидного спектра обусловлено поступлением фруктозы и экзогенных липидов в условиях проводимого эксперимента как дополнительных энергетических эквивалентов (Гостюхина и др., 2022).

В условиях высокожировой диеты и иммобилизации показатели углеводного обмена имели положительную направленность в изменении содержания с существенным увеличением инсулина на 35-й день опыта (+53,1% от контроля, $p < 0,05$). Инсулинорезистентность сформировалась при сочетании высокожировой диеты и иммобилизации на 35-й день опыта.

Преобладание катаболических реакций при иммобилизационном стрессе и усиление потребления энергетических субстратов, необходимых в процессе адаптации к стрессовой

реакции, отражалось в снижении концентрации ТГ на 40,9% и 26,8% от значений контрольной группы животных ($p < 0,05$) и незначительном уменьшении содержания глюкозы на 21-й и 35-й день опыта соответственно. Одновременное потребление животными опытных групп как высокожировой, так и фруктозообогащенной диеты в условиях иммобилизации характеризовало тенденцию к росту ТГ к 35-му дню эксперимента ($p > 0,05$).

Формирующаяся инсулинорезистентность, гиперинсулинемия и ассоциированные с ними изменения в липидном и углеводном обмене, окислительный стресс на фоне фруктозообогащенной и высокожировой диет, а также иммобилизационного стресса являются начальным звеном деструктивных процессов в клеточных структурах, причем на ранних стадиях преобладающих в гепатоцитах (Селиванова др., 2021). В нашем эксперименте об этом свидетельствует общая тенденция к увеличению активности ферментов печени – специфических маркеров цитолиза гепатоцитов – АЛТ, АСТ, ЩФ и ЛДГ. В условиях проводимых экспериментальных серий наблюдалось увеличение активности изучаемых ферментов в сыворотке крови преимущественно на 35-й день опыта при фруктозообогащенной (+32,4%; +31,7%; +42,9%; +120,5%), высокожировой (+82,7%; +41,6%; +129,2%; +96,9%) диетах и иммобилизационном стрессе (+36,9%; +36,8%; +41,5%; +16,5%) соответственно ($p < 0,05$). При сочетании иммобилизации с фруктозообогащенной диетой была характерна незначительная динамика их возрастания с наибольшим значением лишь для ЩФ на 35-й день опыта (+35,2%, $p < 0,05$). Потребление высокожирового питания при иммобилизационном стрессе приводило к достоверному возрастанию активностей АЛТ и ЩФ на 35-й день опыта: +25,1% и +22,3% соответственно ($p < 0,05$), тогда как активность ЛДГ увеличилась уже на 21-й день эксперимента (+17,7%, $p < 0,05$).

Известно, что увеличению содержания **фибронектина и ламинина** в сыворотке крови способствуют деструктивные и воспалительные процессы, приводящие к повреждениям в сосудистой стенке и в структуре клеток, в частности, гепатоцитах (Cojan-Minzat et al., 2021; Ling et al., 2021).

Ранее в работах Солдатовой О.А. было подтверждено влияние фруктозной модели МС на дисфункцию эндотелия за счет изменений в липидном метаболизме и активации перекисного окисления липидов (Солдатова, 2015). Наряду с этим, на фоне указанных нарушений с модификацией клеточных мембран и рецепторов затрагивается и структурная целостность гепатоцитов с увеличением риска развития стеатогепатоза и фиброза печени (Сучкова, 2017).

В нашем исследовании на фоне фруктозообогащенной и высокожировой диет наблюдалось статистически значимое увеличение содержания фибронектина в крови крыс на протяжении всего эксперимента (Таблица 2).

Таблица 2 - Рост уровня фибронектина и ламинина в крови крыс относительно контроля, %

| Условие эксперимента | 21-й день опыта | | 35-й день опыта | | 60-й день опыта | |
|----------------------------|-----------------|---------|------------------|-------------------|-----------------|---------|
| | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин |
| Фруктозо-обогащенная диета | 36* | 38* | 39* ^a | 83* ^b | 40* | 113* |
| Высоко-жировая диета | 29* | 63* | 18 ^a | 150* ^b | 27* | 139* |

Примечание: *- $p < 0,05$ статистическая значимость различий относительно контроля; ^{a,b} – $p < 0,05$ относительно соответствующей группы

Увеличение уровня фибронектина при фруктозообогащенной диете может быть связано с повышенным содержанием глюкозы в крови, обусловленным в том числе образованием глюкозы из фруктозы в реакции изомеризации. Это согласуется с ранее проведенными исследованиями, обозначившими прямую зависимость между содержанием фибронектина и глюкозы в сыворотке крови (Могильницкая, 2015).

В условиях высокожировой диеты отмечалось более существенное возрастание уровня ламинина в крови, чем при фруктозообогащенной, преимущественно на 35-й день эксперимента (+149,9%, $p < 0,05$) (Таблица 2). Такое увеличение ламинина, вероятно, определялось высоким уровнем ТГ в крови экспериментальных животных. Об этом свидетельствует прямая корреляционная зависимость между содержанием ТГ и уровнем ламинина в крови на 21-й день опыта ($r=0,976$, $p < 0,01$). ТГ в свою очередь, обладая эффектом «липотоксичности», влекут за собой изменения в межклеточных взаимодействиях, затрагивая структурные и функциональные характеристики как клеточных структур, в частности гепатоцитов, так и компоненты базальной мембраны. Возможно, такое влияние и деструктивное воздействие отражалось в усилении образования и элиминации основных биополимеров базальной мембраны, в частности, ламинина, с увеличением его синтеза и высвобождением в кровяное русло. Это подтверждает наблюдаемая прямая корреляционная взаимосвязь между активностью АЛТ и уровнем ламинина в условиях высокожировой диеты ($r=0,810$, $p < 0,05$).

Одновременно в целом отмечалась тенденция к росту уровня фибронектина и ламинина в ткани печени в условиях изучаемых диет. При этом динамика роста была более выражена для ламинина – при высокожировой, а фибронектина – при фруктозообогащенной диете (Таблица 3).

Таблица 3 - Рост уровня фибронектина и ламинина в ткани печени относительно контроля, %

| Условие эксперимента | 21-й день опыта | | 35-й день опыта | | 60-й день опыта | |
|----------------------------|-----------------|---------|-----------------|---------|-----------------|---------|
| | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин |
| Фруктозо-обогащенная диета | 11* | 9* | 27* | 8 | 21* | 15 |
| Высоко-жировая диета | 14* | 2 | 22* | 25* | 12 | 39* |

Примечание: *- $p < 0,05$ статистическая значимость различий относительно контроля

Наблюдаемое увеличение содержания изучаемых неколлагеновых белков межклеточного матрикса в ткани печени, вероятно, обусловлено преимущественно усилением их синтеза вследствие негативного влияния диет с высоким содержанием фруктозы и жиров как на межклеточный матрикс соединительной ткани, так и на структурную и функциональную целостность гепатоцитов.

В серии экспериментов с иммобилизационным стрессом достоверных изменений в содержании фибронектина в крови крыс не отмечалось (Таблица 4).

Таблица 4 – Рост уровня фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс относительно контроля, %

| Условие эксперимента | 21-й день опыта | | 35-й день опыта | | 60-й день опыта | |
|---|------------------------|---------------------|------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин |
| Иммобилизация | $\frac{13}{5}$ | $\frac{6}{8}$ | $\frac{13}{14^*}$ | $\frac{15}{3}$ | $\frac{7}{0,4}$ | $\frac{5}{6}$ |
| Иммобилизация и фруктозообогащенная диета | $\frac{62^{*b}}{17^*}$ | $\frac{68^*}{12^*}$ | $\frac{56^{*c}}{15^*}$ | $\frac{124^*}{23^*}$ | $\frac{74^*}{24^*}$ | $\frac{145^*}{29^*}$ |
| Иммобилизация и высокожировая диета | $\frac{41^{*b}}{16^*}$ | $\frac{54^*}{46^*}$ | $\frac{18^c}{19^*}$ | $\frac{99^*}{48^*}$ | $\frac{56^*}{13^*}$ | $\frac{139^*}{47^*}$ |

Примечание: * - $p < 0,05$ статистическая значимость различий относительно контроля, ^{b,c} – $p < 0,05$ относительно соответствующей группы; в числителе - в крови, в знаменателе - в ткани печени

При этом прослеживалась обратная корреляционная зависимость между содержанием фибронектина и кортикостерона ($r = -0,731$, $p < 0,05$). Вместе с тем, сочетанное воздействие иммобилизации и высококалорийных диет привело к значительному повышению уровня фибронектина и ламинина как в крови, так и в ткани печени опытных крыс ($p < 0,05$) (Таблица 4). Рост фибронектина в крови животных был более выражен при сочетании иммобилизации с фруктозообогащенной диетой, тогда как при высокожировой диете в условиях иммобилизационного стресса отмечался в меньшей степени. Увеличение содержания ламинина в сыворотке крови и ткани печени крыс наблюдалось как при фруктозообогащенной, так и при высокожировой диете в сочетании с иммобилизацией.

В ткани печени крыс при «изолированной» иммобилизации отмечалась схожая динамика возрастания уровня фибронектина, но, в отличие от сыворотки крови, его содержание достоверно отличалось от контрольных значений на 35-й день опыта (+14%; $p < 0,05$). Это, вероятно, может свидетельствовать об усилении синтеза фибронектина как основного регуляторного белка межклеточного матрикса в ответ на стрессорные воздействия, приводящие к деструктивным изменениям в клеточных структурах. В отличие от фибронектина, содержание ламинина в ткани печени при иммобилизации достоверно не отличалось от контроля в ходе всего эксперимента.

Сулодексид является смесью гликозаминогликанов, представленной на 80% низкомолекулярным гепарином и на 20% дерматансульфатом, восстанавливает целостность клеточных структур и, обладая липолитической активностью, способствует снижению содержания компонентов липидного профиля (Батюшин, 2015; Елагина и др., 2020; Мелькумянц и др., 2021).

В ходе наших экспериментов отмечалась положительная динамика в восстановлении содержания исследуемых показателей липидного и углеводного обмена, повышенных на фоне высококалорийных диет, при введении сулодексида. Большинство из них и в сыворотке крови, и в ткани печени крыс практически не отличалось от контрольных значений к окончанию исследования ($p > 0,05$).

По данным литературы, сулодексид благотворно влияет на углеводный обмен у больных сахарным диабетом 2 типа (Панюшкина и др., 2014). В нашем исследовании в условиях фруктозообогащенной диеты концентрация глюкозы снижалась с 7,93 [7,68;8,02] ммоль/л (группа без препарата) до 6,66 [6,45;7,04] ммоль/л на 60-й день после введения сулодексида ($p < 0,05$). На фоне высокожировой диеты снижение содержания глюкозы наблюдалось уже на 21-й день эксперимента с 8,29 [7,33;8,47] ммоль/л до 7,52 [7,26;8,52] ммоль/л ($p < 0,05$).

В эксперименте, основанном на фруктозообогащенной диете, при одновременном введении сулодексида отмечалась нормализация липидного спектра в сыворотке крови крыс, причем снижение уровня ТГ наблюдалось на 21-й день введения препарата (Рисунок 2).

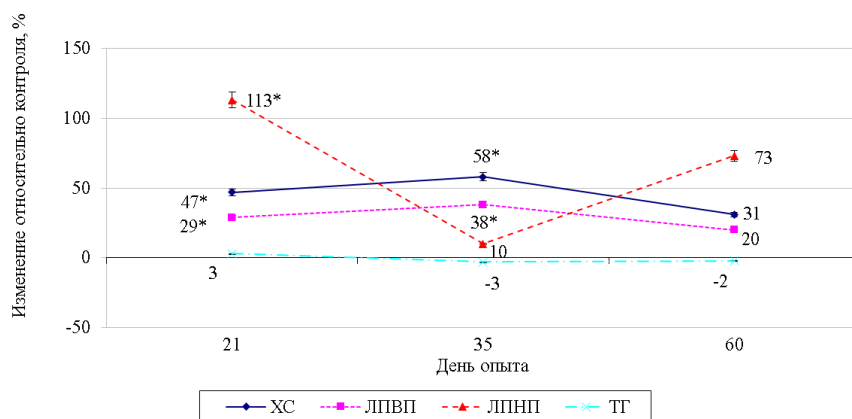


Рисунок 2 – Изменение содержания компонентов липидного спектра в крови крыс в условиях фруктозообогащенной диеты на фоне введения сулодексида

Примечание: * - $p < 0,05$ статистическая значимость различий по отношению к контролю

В гомогенате ткани печени крыс, находившихся на фруктозообогащенной диете, при введении сулодексида наибольшее снижение концентрации ТГ наблюдалось на 35-й день эксперимента - 62,6% относительно группы крыс, находившейся только на диете. Содержание ХС, незначительно возрастая к 35-му дню опыта, в последующем имело тенденцию к снижению.

Уровень ЛПНП, возрастающий первоначально на 165,5% на 21-й день ($p < 0,05$), затем постепенно уменьшался на 35-й и 60-й день эксперимента.

В условиях высокожировой диеты на фоне введения сулодексида уровень большинства показателей липидного спектра, за исключением ТГ, снижался к 60-му дню опыта, недостоверно отличаясь от контрольных величин (Рисунок 3).

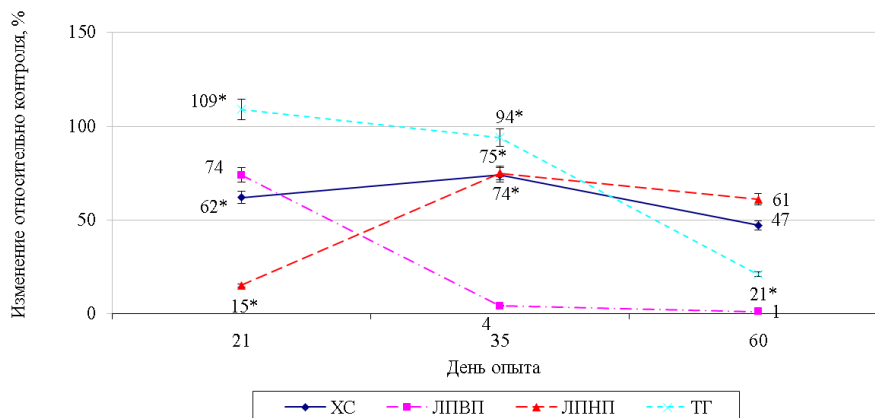


Рисунок 3 – Изменение содержания компонентов липидного спектра в крови крыс в условиях высокожировой диеты на фоне введения сулодексида

Примечание: * - $p < 0,05$ статистическая значимость различий по отношению к контролю

В ткани печени крыс все изучаемые показатели липидного спектра при высокожировой диете и введении сулодексида имели тенденцию к нормализации. Так, содержание ТГ уже на 21-й день опыта снизилось на 75,9% по сравнению с группой, находившейся только на диете, ($p < 0,05$). Концентрация ЛПНП, повышаясь на 21-й день на 226,4% ($p < 0,05$), затем имела тенденцию к нормализации. Уровень ХС достоверно снижался на 35-й день эксперимента на 54,2% относительно группы без введения препарата.

Уровень неколлагеновых белков межклеточного матрикса – **фибронектина и ламинина** – увеличенный на фоне приема изучаемых диет, при введении сулодексида к окончанию эксперимента возвращался к значениям интактных животных (Таблица 5).

Таблица 5 – Рост уровня фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс относительно контроля, %

| Условие эксперимента | 21-й день опыта | | 35-й день опыта | | 60-й день опыта | |
|--|------------------|--------------------|------------------|---------------------|-----------------|----------------|
| | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин | Фибронектин | Ламинин |
| Фруктозообогатенная диета и сулодексид | $\frac{26^*}{6}$ | $\frac{12}{5}$ | $\frac{24^*}{8}$ | $\frac{23}{9}$ | $\frac{3}{2}$ | $\frac{15}{3}$ |
| Высокожировая диета и сулодексид | $\frac{22^*}{8}$ | $\frac{72^*}{7^*}$ | $\frac{8}{3}$ | $\frac{69^*}{14^*}$ | $\frac{1}{2}$ | $\frac{33}{5}$ |

Примечание: * - $p < 0,05$ статистическая значимость различий относительно контроля; в числителе - в крови, в знаменателе - в ткани печени

Содержание фибронектина в крови крыс при введении сулодексида на фоне как высокожировой диеты, так и фруктозообогатенной, повышенное на 21-й день опыта, к концу эксперимента не отличалось от показателей контрольной группы. Помимо этого, в условиях фруктозообогатенной диеты при введении сулодексида отмечалась тенденция к снижению уровня фибронектина в крови крыс на 21-й и 35-й день эксперимента соответственно в сравнении с группой крыс, находившейся только на диете ($p > 0,05$). К 60-му дню опыта уровень фибронектина в крови крыс при введении сулодексида достоверно снизился на 29,9% ($p < 0,05$) относительно крыс, находившихся только на диете, практически достигая значений контрольной группы ($p > 0,05$).

На 21-й день эксперимента содержание фибронектина в крови крыс в условиях высокожировой диеты на фоне введения сулодексида незначительно снизилось, но при этом несущественно отличалось от группы, находившейся только на высокожировой диете. На 35-й день опыта и до его окончания уровень фибронектина достиг значений контрольной группы животных ($p > 0,05$).

Введение сулодексида крысам, находившимся на фруктозообогатенной диете, способствовало снижению уровня ламинина в крови уже на первом временном отрезке (Таблица 5). Вместе с тем, содержание ламинина в крови крыс в условиях фруктозообогатенной диеты при введении сулодексида достоверно снизилось на 24%, 55,3% и 92,8% на 21-й, 35-й и 60-й день опыта соответственно ($p < 0,05$) в сравнении с животными, находившимися только на диете, практически соответствуя при этом значениям интактной группы ($p > 0,05$).

В условиях высокожировой диеты введение сулодексида не способствовало выраженному снижению уровня ламинина в крови крыс на 21-й и 35-й день опыта. Лишь к 60-му дню уровень ламинина существенно не отличался от контрольного ($p > 0,05$) (Таблица 5).

В гомогенате ткани печени крыс достоверные от контроля изменения при введении сулодексида на фоне потребления высококалорийных диет отмечались в содержании ламинина при высокожировой диете, когда уровень изучаемого белка был повышен на 21-й и 35-й день опыта, тогда как уровень фибронектина статистически не отличался от контроля. Введение сулодексида на фоне фруктозообогатенной диеты во все временные интервалы и на фоне высокожировой диеты на 60-й день опыта вызывало снижение содержания ламинина в ткани печени до значений контрольной группы крыс (Таблица 5).

Вероятно, нормализуя содержание компонентов липидного обмена, повышенное на фоне фруктозообогатенной и высокожировой диет, и обладая ангиопротективными свойствами, сулодексид частично или полностью участвовал в восстановлении структуры межклеточного матрикса и способствовал возвращению уровня фибронектина и ламинина к значениям интактных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя результаты наших исследований, можно отметить особенности в обменных процессах при экспериментальном моделировании МС на основе фруктозообогащенной и высокожировой диет. Так, повышенное потребление фруктозы и жиров приводит к возрастанию основных показателей углеводного и липидного обмена как в крови, так и в ткани печени крыс. Формируется инсулинорезистентность, еще более усугубляя гипергликемию. Данные нарушения, вероятно, становятся инициаторами активации реакций свободнорадикального окисления и последующего перекисного окисления липидов, белков. При этом затрагивается структурная и функциональная целостность клеточных элементов, в частности, гепатоцитов с высвобождением печень-специфических ферментов, рост активности которых отмечался в ходе нашего исследования.

Наряду с клеточными структурами, деструктивному воздействию подвергался и межклеточный матрикс соединительной ткани, характеризовавшийся возрастанием уровня основных неколлагеновых белков - фибронектина и ламинина. Причем, увеличение их содержания наблюдалось как в ткани печени, что может свидетельствовать об усилении их синтеза, так и в сыворотке крови как результат синтеза и элиминации изучаемых белков из поврежденных клеток и межклеточного матрикса в данных условиях эксперимента.

Сулодексид, обладая способностью к восстановлению эндотелия сосудов, а также липолитической активностью, нормализовал содержание показателей углеводного и липидного профиля и уровень фибронектина и ламинина в сыворотке крови и ткани печени крыс.

Иммобилизационный стресс и его сочетание с фруктозообогащенной и высокожировой диетами разнонаправленно повлияли на углеводный и липидный метаболизм. Вместе с тем, «изолированная» иммобилизация не приводила к изменениям в содержании фибронектина и ламинина в крови крыс, затрагивая лишь ткань печени, повышая уровень фибронектина в ней. В то же время, при сочетании иммобилизации с высококалорийными диетами содержание фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс возрастало.

Таким образом, изучение основных регуляторных белков межклеточного матрикса соединительной ткани, таких как фибронектин и ламинин, является существенным в оценке функционирования отдельных клеточных структур при развивающихся деструктивных процессах на фоне несбалансированного питания и стрессогенных факторов окружающей среды и может быть использовано для диагностики начальных стадий стеатоза, статогепатита и фиброза печени.

ВЫВОДЫ

1. Созданные модели экспериментального метаболического синдрома, основанные на фруктозообогатенной и высокожировой диетах, выявили основные характерные для него признаки: повышение массы тела крыс, гипергликемию, гиперинсулинемию, инсулинорезистентность, дислипидемию. Гипергликемия и гиперинсулинемия сохранялись продолжительное время при фруктозообогатенной диете даже после ее отмены. Для высокожировой диеты характерно выраженное увеличение содержания триглицеридов в крови крыс в течение всего эксперимента. Инсулинорезистентность идентифицировалась на 21-й эксперимента как при фруктозообогатенной, так и высокожировой диете.
2. «Изолированный» иммобилизационный стресс и его сочетание с фруктозообогатенной диетой приводят к повышению уровня кортикостерона в крови крыс на 35-й день опыта и развитию дислипидемии, но не влияют на показатели углеводного обмена. Сочетание иммобилизации и высокожировой диеты наряду с дислипидемией способствует формированию инсулинорезистентности и гиперинсулинемии на 35-й день эксперимента.
3. Экспериментальный метаболический синдром на основе фруктозообогатенной диеты вызывает увеличение содержания фибронектина в крови крыс с ростом его в ткани печени в ходе всего эксперимента. Высокожировая диета аналогичным образом влияет на возрастание фибронектина как в крови, так и в ткани печени крыс, но в меньшей степени, чем фруктозообогатенная. Наряду с этим, уровень ламинина увеличивается как при фруктозообогатенной, так при высокожировой диете в крови и в ткани печени крыс; более выраженные изменения выявляются при высокожировой диете.
4. При «изолированном» иммобилизационном стрессе рост уровня фибронектина и ламинина в крови крыс не наблюдается, тогда как в ткани печени происходит увеличение содержания фибронектина на 35-й день опыта. Сочетание иммобилизации с фруктозообогатенной и высокожировой диетами способствует увеличению содержания фибронектина и ламинина как в крови, так и в ткани печени крыс.
5. Препарат сулодексид, представляющий собой естественную смесь гликозаминогликанов, в условиях высокожировой и фруктозообогатенной диет восстанавливает измененные показатели липидного и углеводного метаболизма и снижает содержание фибронектина и ламинина в крови и ткани печени крыс.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Определение содержания фибронектина и ламинина совместно с показателями липидного и углеводного обмена и маркерами цитолиза гепатоцитов может быть рекомендовано в клинической практике для оценки риска развития стеатоза, стеатогепатита, фиброза печени у больных с метаболическим синдромом и в состоянии длительного стресса. Рекомендовано

применение препарата сулодексид для коррекции изменений в обменных процессах, приводящих к формированию метаболического синдрома.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Целесообразно исследование содержания других неколлагеновых белков и биополимеров межклеточного матрикса при экспериментальном метаболическом синдроме, иммобилизационном стрессе, их сочетании и на фоне коррекции препаратом сулодексид. В перспективе возможно изучение адгезивных неколлагеновых белков при заболеваниях печени в клинической практике.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ВХОДЯЩИЕ В ПЕРЕЧЕНЬ ВАК МОН РФ

1. **Гилева О.Г.**, Бутолин Е.Г., Терещенко М.В., Оксюзян А.В. Влияние высокофруктозной диеты на уровень фибронектина в сыворотке крови крыс // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89, №2. – С. 46-51. (ВАК, Скопус)
2. **Гилева О.Г.** Биохимические маркеры повреждения печени при фруктозоиндуцированной диете у крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т.23, №9. – С. 53-58. (ВАК)
3. **Гилева О.Г.**, Бутолин Е.Г., Терещенко М.В. Содержание ламинина в сыворотке крови крыс в условиях высокожировой диеты при коррекции сулодексидом // Бюллетень сибирской медицины. – 2022. – Т. 21, №1. – С. 21-27. (ВАК, Скопус, WOS)
4. **Гилева О.Г.**, Бутолин Е.Г., Терещенко М.В., Иванов В.Г. Оценка показателей углеводного и липидного обмена у крыс в зависимости от вида высококалорийного питания // Ожирение и метаболизм. – 2022. – Т.19, №1. – С. 47-52. (ВАК, Скопус)

ДРУГИЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЯЗАННЫЕ С ИССЛЕДОВАНИЯМИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Гилева О.Г.** Показатели липидного и углеводного обмена в крови крыс в условиях различных моделей метаболического синдрома // Биология ва тиббиёт муаммолари (Проблемы биологии и медицины). Материалы 73-й научно-практической конференции студентов-медиков и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины». – 2019. – Т. 108, №1.1. - С. 371.
2. **Гилева О.Г.**, Бутолин Е.Г. Изменения показателей углеводного и липидного обмена у крыс с экспериментальным метаболическим синдромом // LXXX научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2019»: тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 202.

3. **Гилева О.Г.**, Бутолин Е.Г., Наумова Н.Г. Содержание фибронектина в крови крыс в условиях высокофруктозной диеты // Сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская биохимия – от фундаментальных исследований к клинической практике. Традиции и перспективы», посвященной 90-летию профессоров А.Ш. Бышевского и Р.И. Лифшица. – Тюмень, 2019. – С. 26-29.
4. **Гилева О.Г.**, Бутолин Е.Г., Терещенко М.В. Содержание фибронектина в крови и печени крыс при иммобилизационном стрессе на фоне высокофруктозной диеты // Биология ва тиббиёт муаммолари (Проблемы биологии и медицины). – 2021. – Т. 132, №6. – С. 169-173.
5. Терещенко М.В., Бутолин Е.Г., **Гилева О.Г.** Сравнительная характеристика показателей липидного и углеводного обменов в сыворотке крови крыс при высокожировой и фруктозообогащенной диетах // Биология ва тиббиёт муаммолари (Проблемы биологии и медицины). – 2021. – Т. 132, №6. – С. 194-199.
6. **Gileva O.G.**, Butolin E.G. The content of laminin in the blood of rats during the experimental metabolic syndrome // 6th International Conference «Modern Synthetic Methodologies for Creating Drugs and Functional Materials» (MOSM 2022). – Yekaterinburg, 2022. - P. 345.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | |
|------------|--|
| МС | метаболический синдром |
| У.е. | условные единицы |
| ИФА | иммуноферментный анализ |
| ИА | индекс атерогенности |
| ХС | общий холестерин |
| ЛПВП | холестерин липопротеинов высокой плотности |
| ЛПНП | холестерин липопротеинов низкой плотности |
| ТГ | триглицериды |
| АЛТ | аланинаминотрансфераза |
| АСТ | аспартатаминотрансфераза |
| ЛДГ | лактатдегидрогеназа |
| ЩФ | щелочная фосфатаза |
| Ацетил-КоА | ацетил-коэнзим А |
| АТФ | аденозинтрифосфорная кислота |
| ЛП | липопротеины |
| НОМА | индекс инсулинорезистентности (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) |
| CARO | индекс инсулинорезистентности, F. Caro, 1991г |
| Me | медиана |