

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

На правах рукописи

Комар Александра Андреевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ В
ПАТОГЕНЕЗЕ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ОЖИРЕНИИ
И САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА**

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Л.С. Литвинова

Калининград - 2021

Оглавление

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Неалкогольная жировая болезнь печени: эпидемиология, диагностические критерии.....	12
1.1.1. Роль печени в формировании осложнений при ожирении.....	15
1.1.2. Патогенез неалкогольной жировой болезни печени.....	16
1.2. Роль митохондрий в развитии НАЖБП у пациентов с ожирением.....	18
1.2.1. Структурно-функциональное состояние митохондрий при окислительном стрессе.....	22
1.3. Ожирение как этиологический фактор НАЖБП	26
1.3.1. Молекулярно-генетические механизмы формирования воспаления жировой ткани.....	27
1.4. Взаимосвязь инсулинорезистентности с НАЖБП при ожирении	29
1.4.1. Развитие инсулинорезистентности в ЖТ и печени	31
1.5. Факторы, влияющие на развитие НАЖБП.....	33
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Объект исследования.....	37
2.1.1. Критерии включения и исключения	38
2.2. Материалы исследования.....	39
2.3. Методы исследования	40
2.3.1. Исследование биохимических показателей	40
2.3.2. Морфологическое исследование биоптатов печени	43
2.3.3. Определение цитокинов в крови.....	44
2.3.4. Определение уровня относительной экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени	45

2.3.5. Определение числа копий митохондриальной ДНК методом цифровой капельной ПЦР.....	49
2.3.6. Количественное определение белка методом Western Blotting	51
2.3.7. Статистический анализ	53
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ	54
3.1. Исследование биохимических параметров в крови у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него	54
3.2. Исследование индикаторов инсулинорезистентности в крови у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него	59
3.3. Исследование экспрессии генов и продукции белков в печени у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него	61
3.4. Исследование количества мтДНК в печени у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него.....	65
3.5. Исследование цитокинов в крови у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него.....	65
3.6. Исследование гистологических препаратов печени у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него	68
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	75
ВЫВОДЫ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	95

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ - аспартатаминотрансфераза

АФК - активные формы кислорода

ГГТ - гамма-глутамилтрансфераза

ДАГ - диацилглицерол

ЖК - жирные кислоты

ЖТ - жировая ткань

ИМТ - индекс массы тела

ИР - инсулинорезистентность

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

мтДНК - митохондриальной ДНК

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

НАСГ – неалкогольный стеатогепатит

СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа

СЖК - свободные жирные кислоты

СРБ - С-реактивный белок

ТГ - триглицериды

ЦТК - цикл трикарбоновых кислот

ЩФ - щелочная фосфатаза

ЭТЦ - электрон-транспортная цепь

ВAX - проапоптотический член семейства Bcl-2 (*Bcl-2 associated X-protein*)

DRP1 - деление регулируется белком деления 1 (*Dynamin-related protein 1*)

HIF – фактор, индуцированный гипоксией (*Hypoxia-inducible factor*)

ИКК- β - ингибитор киназы ядерного фактора каппа β (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit β*)

IL – интерлейкин

IL-6Ra - рецептор интерлейкина-6

IRS – субстрат рецептора инсулина

JNK – c-Jun N-терминальная киназа (*c-Jun N-terminal kinases*)

LT β R - рецептор лимфотоксина β (*The lymphotoxin β receptor*)

MAPK – митоген-активированная протеинкиназа (*Mitogen-activated protein kinase*)

MFN – митофузин (*Mitofusin*)

MT-ND - субъединица митохондриальной ДНК (*Mitochondrially encoded NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit 1*)

NF- $\kappa\beta$ - транскрипционный ядерный фактора (*Nuclear factor $\kappa\beta$*)

NIK - киназа, индуцирующая NF- $\kappa\beta$ (*NF- $\kappa\beta$ -inducing kinase*)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (*Phosphoinositide 3-kinase*)

PKC – протеинкиназа C (*Protein kinase C*)

gp130 - гликопротеин 130 (*Glycoprotein 130*)

SOD – супероксиддисмутаза (*Superoxide dismutase*)

TFAM – митохондриальный транскрипционный фактор A (*Transcription Factor A, Mitochondrial*)

TNF- α – фактор некроза опухоли α (*Tumor necrosis factor α*)

TNFSF14/LIGHT - цитокин фактора некроза опухоли суперсемейства 14 (*Tumor necrosis factor superfamily member 14*)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Ожирение является глобальной проблемой здравоохранения, так как примерно 1,5 миллиарда взрослых во всем мире имеют избыточный вес [Polyzos S. A. et al., 2019]. Ожирение – это хроническое заболевание, характеризующееся избыточным накоплением жировой ткани в организме, представляющим угрозу здоровью, и являющееся основным фактором риска ряда других заболеваний, включая сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа) и сердечно-сосудистые патологии [WHO, 1997]. Согласно Global Obesity Observatory, к 2025 году избыточный вес будут иметь 2,7 миллиарда взрослых, более 1 миллиарда людей будут страдать ожирением, а 177 миллионов взрослых будут иметь серьезные последствия от ожирения [Prevalence of Obesity, 2018]. Ожирение увеличивает риск развития таких заболеваний, как СД 2 типа, неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), гипертония, инфаркт миокарда, инсульт, деменция, остеоартрит и некоторые виды рака, способствуя тем самым, снижению качества и продолжительности жизни [Blüher M., 2019].

НАЖБП является лидирующим заболеванием в гепатологии [Brunt E. M. et al., 2021]. Основной теорией формирования НАЖБП при ожирении является поступление большого количества провоспалительных цитокинов из жировой ткани (ЖТ) в систему портальной вены печени, что приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, локальному воспалению в печеночной ткани [Polyzos S. A. et al., 2019]. Согласно накопленным к настоящему времени в мировой литературе многочисленным данным, большой вклад в патогенез метаболических нарушений ЖТ, скелетных мышц и печени вносит митохондриальная дисфункция [Lee J. et al., 2019; Meex R. C. R. et al., 2021; Wang J. et al., 2020]. Основные механизмы, вызывающие накопление жира в печени, включают увеличение липогенеза *de novo* в печени и синтеза триглицеридов (ТГ), снижение синтеза липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и β -окисления жирных кислот (ЖК) [Parthasarathy G. et al., 2020]. Важно отметить, что митохондрии играют важную роль в контроле метаболизма липидов в печени [Wang J. et al., 2020]. Поскольку большинство ферментов, участвующих в метаболизме липидов локализованы в митохондриях, важно контролировать синтез этих белков [Wang J. et al., 2020]. Все вышесказанное, в целом, обуславливает своевременность и актуальность

данной тематики, касающейся изучения функционирования митохондрий при ожирении и сопутствующих ему заболеваниях.

Степень разработки темы

Известно, что при ожирении, в ответ на избыток питательных веществ, в митохондриях печени компенсаторно увеличивается активность β -окисления, цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий [Mello A. H. et al., 2018]. В свою очередь, эти процессы способствуют развитию окислительного стресса и воспаления, что, как следствие, сопровождается формированием стеатоза и стеатогепатита [Sergi D. et al., 2019]. В понятие структурно-функционального состояния митохондрий входят такие показатели, как динамика и биогенез. Динамика митохондрий обусловлена делением и слиянием этих органелл [Yaffe M., 1999], а биогенез включает в себя скоординированную репликацию митохондриальной ДНК (мтДНК) и синтез белков, ответственных за электрон-транспортную цепь митохондрий [Touyz R.M., 2012; Tsiloulis T., Watt M.J., 2015; J.S. Bhatti et al., 2017]. В литературе приводятся противоречивые данные об изменениях динамики митохондрий у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров [Lee K. et al., 2018; Staňková P. et al., 2020; Takeichi Y. et al., 2021]. При этом имеются достаточно скудные и противоречивые данные о структурных и функциональных изменениях митохондрий ткани печени у человека при ожирении, которые описывают состояние митохондрий, в целом, без конкретизации отдельных компонентов (изменения экспрессии конкретных генов и белков) [Koliaki C. et al., 2015; Trebicka J., Schierwagen R., 2016; Diao L. et al., 2018; Wang J. et al., 2020]. Также в литературе мало описано взаимовлияние плазменных цитокинов и компонентов митохондриального биогенеза, что позволило бы найти новые терапевтические и профилактические мишени в отношении поддержания структурно-функционального статуса митохондрий [Bournat J.C., Brown C.W., 2010; Simões I.C.M. et al., 2018; Rocha M. et al., 2020; Prasun P. et al., 2021]. В связи с этим, для более полного понимания роли митохондрий в патогенезе НАЖБП, необходимо расширенное комплексное изучение экспрессии митохондриальных генов печени при ожирении, а также оценка роли плазменных факторов в этом процессе.

Цель исследования: оценить роль структурно-функциональных нарушений митохондрий печени в механизмах формирования неалкогольной жировой болезни печени у больных ожирением и сахарным диабетом 2 типа.

Задачи исследования:

1. Оценить показатели структурно-функционального состояния митохондрий (содержание мтДНК, экспрессию митохондриальных генов *TFAM*, *SOD1*, *MFN2*, *MT-ND4*, *BAX*, *NF- κ B1*, *DNM1L* и концентрацию кодируемых ими белков) во взаимосвязи с морфологическими изменениями в печени при неалкогольной жировой болезни печени у больных с ожирением и сахарным диабетом 2 типа и без него.
2. Проанализировать взаимосвязь структурно-функционального состояния митохондрий клеток печени с содержанием медиаторов sLIGHT/TNFSF14, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra в крови при неалкогольной жировой болезни печени у больных с ожирением и сахарным диабетом 2 типа и без него.
3. Выявить общие закономерности и особенности структурно-функциональных нарушений митохондрий клеток печени и изменений плазменной концентрации цитокинов в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени при ожирении в сочетании с сахарным диабетом 2 типа и без него.

Научная новизна

Научную ценность представляют данные об особенностях структурно-функциональных нарушений митохондрий в клетках печени при формировании неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) у больных ожирением и сахарным диабетом (СД) 2 типа. Впервые показано, что у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа рост площади липидных капель в гепатоцитах обеспечивают: высокий уровень экспрессии гена *MT-ND4* (кодирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий) на фоне уменьшения числа копий мтДНК и низкой транскрипции гена *DNM1L* (кодирует деление митохондрий) и его белка DRP1 в ткани печени. Впервые выявлено, что у больных НАЖБП с морбидным ожирением, независимо от состояния углеводного обмена, увеличение площади стеатоза в гепатоцитах коррелирует с низким уровнем экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в ткани печени. Оригинальными являются данные, свидетельствующие, что высокое содержание белка NF- κ B/p65 (компонент неканонического пути NF- κ B) и низкая экспрессия гена *NF- κ B1* (компонент канонического пути NF- κ B) в ткани печени у больных ожирением с НАЖБП без СД 2 типа ассоциированы с менее выраженными показателями площади стеатоза и лимфоцитарной инфильтрации печени. Приоритетными являются данные о том, что у

больных ожирением с НАЖБП без СД 2 типа высокий уровень плазменных факторов gp130/sIL-6Rb, IL-6, IL-6RA и IL-10 оказывает протекторный эффект на митохондрии, поддерживая процесс их деления. Впервые доказано, что у больных ожирением с НАЖБП без СД 2 типа высокая концентрация sTNFSF14/LIGHT в крови опосредует поддержание нормогликемического состояния. Продемонстрировано, что у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа низкий уровень sTNFSF14/LIGHT в крови взаимосвязан со снижением экспрессии мРНК гена *DMN1L* в ткани печени и, напротив, ростом экспрессии гена *MT-ND4*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены знания фундаментального характера о закономерностях и особенностях структурно-функциональных нарушений митохондрий в клетках печени, а также о роли гуморальных факторов в их формировании при неалкогольной жировой болезни печени, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа.

Практическая значимость работы обусловлена доказательством причинно-следственных взаимосвязей между структурно-функциональными нарушениями митохондрий с морфологическими изменениями в печени и продукцией цитокинов, которые могут быть использованы для разработки новых методов профилактики и/или лечения неалкогольной жировой болезни печени, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре фундаментальной медицины медицинского института и Института Живых Систем БФУ им. И. Канта г. Калининграда.

Методология и методы исследования

Согласно поставленным задачам, выбраны высокоинформативные методы исследования, которые выполнялись на базе современного научно-исследовательского Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта. В качестве материалов исследования использовали периферическую венозную кровь и биоптаты печени, полученные у обследуемых лиц, принявших участие в исследовании (больные НАЖБП с ожирением и СД 2 типа и без него, группа сравнения).

Основные методы исследования:

1. Комплексное исследование биохимических показателей (оценка углеводного, белкового, пигментного и жирового обменов, определение сывороточных уровней активности печеночных ферментов) методом биохимического анализа.
2. Исследование биоптатов печени (гистологическое исследование).
3. Оценка экспрессии мРНК генов *TFAM*, *SOD1*, *MFN2*, *MT-ND4*, *BAX*, *NF- κ B1*, *DNM1L* в ткани печени методом количественной ПЦР.
4. Исследование содержания белков *TFAM*, *SOD1*, *MFN2*, *BAX*, *NF- κ B/p65*, *DRP1* в ткани печени методом Western Blotting.
5. Количественная оценка числа мтДНК в ткани печени методом цифровой капельной ПЦР.
6. Определение содержания цитокинов *sLIGHT/TNFSF14*, *IL-10*, *IL-6*, *gp130/sIL-6Rb*, *sIL-6Ra* в плазме крови методом проточной флуориметрии.
7. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Увеличение площади стеатоза в гепатоцитах при неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) с ожирением и сахарным диабетом (СД) 2 типа взаимосвязано с высоким уровнем экспрессии гена *MT-ND4*, низкой экспрессией гена *DNM1L* и его белка *DRP1*, а также уменьшением числа копий мтДНК в ткани печени и снижением концентрации плазменных факторов *gp130/sIL-6Rb*, *IL-6*, *IL-6RA*, *IL-10* и *sTNFSF14/LIGHT*. При НАЖБП с индексом массы тела (ИМТ) более 40 кг/м² рост площади липидных капель в гепатоцитах опосредован низким уровнем экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в ткани печени независимо от наличия СД 2 типа.
2. У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа установлены менее выраженные проявления стеатоза гепатоцитов и лимфоцитарной инфильтрации печени, сочетающиеся с высокой концентрацией белка *NF- κ B/p65*, низким уровнем экспрессии генов *NF- κ B1* и *BAX* в ткани печени, а также с высоким содержанием цитокинов *gp130/sIL-6Rb*, *IL-6*, *IL-6RA*, *IL-10* и *sTNFSF14/LIGHT* в крови.
3. В патогенезе НАЖБП у больных ожирением с СД 2 типа и без него установлены разнонаправленные изменения структурно-функционального состояния митохондрий в клетках печени и содержания регуляторных медиаторов в крови.

Степень достоверности и апробации результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом клинико-экспериментального материала, использованием современных методов (биохимические методы исследования, гистологический анализ, ПЦР в реальном времени и цифровая капельная, Western Blotting, проточная флуориметрия) и методических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на всероссийских и международных конференциях: 8-ая международная конференция «Human Genetics and Genetic Diseases» (Мадрид, Испания), Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные проблемы клеточной биологии и клеточных технологий» (Санкт-Петербург, Россия), международная конференция «Наука. Исследования. Практика» (Москва, Россия), V и VI Научно-практические школы-конференции «Аллергология и клиническая иммунология» (Сочи, Россия). Работа осуществлена при финансовой поддержке: Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ (НШ-2495.2020.7), Государственного задания (№ FZWM-2020-0010), а также Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-415-393004).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 7 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для опубликования основных научных результатов диссертаций, 1 учебно-методическое пособие, 4 статьи и тезиса в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 107 страницах машинного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 10 таблицами. Библиографический указатель включает 149 источников (145 - иностранных и 4 - отечественных).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании экспериментальных работ. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Неалкогольная жировая болезнь печени: эпидемиология, диагностические критерии

НАЖБП является одним из самых распространенных заболеваний в гепатологии, приводящим к ухудшению качества жизни, инвалидизации и смерти [EASL-EASD-EASO, 2016]. За два прошедших десятилетия стал очевиден факт принадлежности НАЖБП и неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) к самым распространенным патологиям печени в Западных странах. Распространенность НАЖБП удвоилась за прошедшие 20 лет, в то время как распространенность других хронических заболеваний печени не изменилась, или даже снизилась [Blüher M., 2019; Obesity and overweight, 2021]. Согласно последним данным, распространенность НАЖБП и НАСГ не зависят от экономического, социального положения страны и уровня урбанизации [Shetty A., Syn W.-K., 2019; Sanai F. M. et al., 2021].

Мировая распространенность НАЖБП колеблется от 6 до 35% [Fazel Y. et al., 2016; Sayiner M. et al., 2016; Bellentani S., 2017; Sanai F. M. et al., 2021]. При этом, у 63–87% пациентов, страдающих как диабетом, так и НАЖБП, может наблюдаться НАСГ [Bazick J. et al., 2015; Corey K.E. et al., 2016]. НАЖБП встречается во всех возрастных группах. Однако больше всего подвержены риску развития НАЖБП женщины в возрасте 40–60 лет с признаками метаболического синдрома [Pafili K., Roden M., 2021]. Хотя НАЖБП более распространена у пациентов с ожирением и сахарным диабетом, болезнь также выявляется у людей с нормальным ИМТ, не страдающих СД 2 типа [Vos B. et al., 2011; Younossi Z. M. et al., 2012]. Согласно прогнозу ВОЗ, экономические затраты на лечение НАЖБП в четырех европейских странах (Германия, Франция, Италия и Великобритания) составит 35 млрд долларов, а в Соединенных Штатах Америки примерно 103 млрд. долларов [Younossi Z. M. et al., 2016]. Такой экономический анализ показывает, что денежные затраты на лечение НАЖБП в развитых странах мира огромно и потенциально возрастает.

Логично, что по мере роста клинических последствий данного заболевания, экономические затраты на его лечение также будут увеличены.

В России за период с 2007 г. по 2015 г., выявляемость НАЖБП увеличилась и составила 37,3% [Ивашкин В.Т. и др., 2015]. Высокая распространенность заболевания была зарегистрирована у пациентов с ожирением, СД 2 типа, дислипидемией,

метаболическим синдромом, артериальной гипертензией, повышенным уровнем холестерина [Ивашкин В.Т. и др., 2015]. Согласно исследованиям Ивашкина В.Т. и соавт. (2015), распространенность НАЖБП возрастает по мере увеличения возраста пациентов с 2,90% (12-17 лет) до 42,96% (60-69 лет) [Ивашкин В.Т. и др., 2015]. Максимальная распространенность НАЖБП отмечена в возрастной группе 70-80 лет (34,26%), НАСГ - у пациентов 50-59 лет (10,95%) [Ивашкин В.Т. и др., 2015]. Такие данные подтверждают актуальность исследования НАЖБП и ее последствий в российской популяции.

Детальная расшифровка механизмов патогенеза НАЖБП может способствовать разработке современных технологий ранней диагностики данного заболевания, принципов этиологического лечения и методик реабилитации, что снизит развитие НАЖБП до критических стадий, и, как следствие, приведет к уменьшению экономических затрат на лечение заболевания.

Ранняя диагностика НАЖБП практически невозможна, так как болезнь в целом протекает бессимптомно [EASL-EASD-EASO, 2016]. Во врачебной практике специалисты сталкиваются со случайно обнаруженным синдромом цитолиза по биохимическим показателям [Tholey D., 2019]. У пациентов с НАЖБП обычно нет каких-либо симптомов, либо предъявляют жалобы на слабость, утомляемость (астеновегетативный синдром) и болевые ощущения в правом подреберье [Tholey D., 2019]. Более агрессивные симптомы, такие как кожный зуд, диспепсический синдром, желтуха и портальная гипертензия, свидетельствуют об уже прогрессивной стадии НАЖБП [Tholey D., 2019]. В связи с этим, точный диагноз НАЖБП ставится только после получения гистологического анализа биоптатов печени.

Существует несколько типов классификации НАЖБП по морфологии: система Маттеони (Matteoni), выявляющая пациентов с риском развития цирроза [Cobbina E. et al., 2017]; система, созданная комитетом по патологии сети клинических исследований НАСГ Национального института диабета, заболеваний пищеварительной системы и почек (the Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network (NASH CRN) of the National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Disease (NIDDK)), для оценки НАЖБП в клинических испытаниях; система SAF (steatosis, activity and fibrosis), которая учитывает наличие стеатоза, активность баллонной дистрофии и лобулярного воспаления и фиброз.

Система, разработанная Брунтом (Brunt) [Brunt E. M. et al., 2004], является полуколичественной и оценивает степень прогрессирования основных признаков НАСГ. Так, система Брунта (Brunt) распределяет стеатоз и стеатогепатит по «степеням», а фиброз по «стадиям» [Angulo P., 2002]. Стеатоз оценивается по шкале от 1 до 3 в зависимости от процента пораженных гепатоцитов ($<33\% = 1$; $33-66\% = 2$; $> 66\% = 3$) [Brunt E. M., et al., 2004]. Стеатогепатит, аналогичным образом, оценивают по шкале от 1 до 3 (1 = легкая; 2 = умеренная; 3 = тяжелая), но на основании тяжести и степени стеатоза, баллонирования, лобулярного и портального воспалений [Brunt E. M. et al., 2004]. Фиброз разделен по шкале от 1 до 4 [Brunt E. M. et al., 2004]. Однако, система Брунта (Brunt) не охватывает весь спектр признаков НАЖБП, как это учитывается в системе Маттеони (Matteoni) [Cobbina E. et al., 2017]. Система Брунта (Brunt) также не подходит для оценки НАЖБП у детей [Kleiner D. E. et al., 2005]. Так, на практике врач выбирает более подходящую для конкретного случая систему классификации НАЖБП.

Основным диагностическим признаком НАЖБП является избыточное накопление жира в печени [Cobbina E. et al., 2017]. НАЖБП включает две морфологические формы заболевания с различным прогнозом: неалкогольный жировой гепатоз и НАСГ [Cobbina E. et al., 2017]. Тяжесть заболевания при НАСГ весьма вариабельна, и включает в себя фиброз, цирроз и гепатоцеллюлярную карциному [EASL-EASD-EASO, 2016]. Важно отметить, что диагноз НАЖБП подразумевает исключение употребления алкоголя (более 30 г в день для мужчин и 20 г в день для женщин) [Cobbina E. et al., 2017]. Употребление алкоголя в дозах, превышающих отмеченные, указывает на алкогольную болезнь печени.

Обобщая данные, можно сделать вывод, что НАЖБП — это спектр следующих морфологических изменений в печени:

- 1) стеатоз гепатоцитов более чем 5% [Cobbina E. et al., 2017], при незначительном или нулевом потреблении алкоголя (не более 30 г этанола в сутки для мужчин и не более 20 г — для женщин);
- 2) воспаление;
- 3) фиброз;
- 4) цирроз.

Известно, что ожирение и ИР играют ключевую роль в патогенезе как НАЖБП, так и СД 2 типа [Bugianesi E. et al., 2010; Khan R. S. et al., 2019]. В основе НАЖБП лежат, по крайней мере, три из нижеперечисленных факторов: абдоминальное ожирение, повышенный уровень триглицеридов, низкий уровень ЛПВП, повышенное артериальное давление и гипергликемия [Parthasarathy G. et al., 2020]. По различным данным, частота встречаемости НАЖБП среди пациентов с ожирением и СД 2 типа варьирует в диапазоне от 70% до 100% [Мехтиев С. Н. и др., 2008]. При этом, СД 2 типа или нарушение толерантности к глюкозе отмечаются у 10–75%, ожирение — у 30–100%, гипертриглицеридемия — у 20–92% пациентов с НАЖБП [Мехтиев С. Н. и др., 2008]. Существуют и другие причины развития НАЖБП. Так, НАЖБП обнаруживается у 10–15% людей без клинических проявлений ожирения, что может быть обусловлено синдромом избыточной пролиферации бактерий в кишечнике или дисбиозом [Мехтиев С. Н. и др., 2008]. Таким образом, НАЖБП является полиэтиологическим заболеванием.

1.1.1. Роль печени в формировании осложнений при ожирении

Печень является центральным звеном промежуточного метаболизма, которая поддерживает ключевые анаболические пути, в результате которых происходит синтез глюкозы, липидов и кетонов [Kim O.-K. et al., 2015]. Такие питательные вещества необходимы для удовлетворения энергетического потребления периферических тканей, печени, сердца и мозга. В условиях ожирения и ИР печени происходят количественные изменения в составе питательных веществ и гормонов, способствуя увеличению накопления ТГ в печени (простой стеатоз) [Ipsen D. H. et al., 2018]. Накопление жира в печени происходит из-за дисбаланса между накоплением и утилизацией липидов, которые регулируются четырьмя основными путями: поглощение циркулирующих липидов, липогенез *de novo*, окисление ЖК и секреция липопротеинов с очень низкой плотностью (ЛПОНП) [Ipsen D. H. et al., 2018]. Однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе патологической агрегации жира в печени, до конца не выяснены. Усиленная мобилизация гепатоцитов для снижения уровня липидов, может наоборот, способствовать прогрессированию заболевания, поскольку окисление ЖК вызывает окислительный стресс, истощение антиоксидантной системы и способствует повреждению клеточных органелл и ДНК [Cobbina E. et al., 2017; Ipsen D. H. et al., 2018].

Различные плазменные факторы при ожирении вызывают воспаление и окислительный стресс в печени через множество механизмов и могут оказывать негативное влияние на передачу сигналов инсулина. Так, ожирение, воспаление в ЖТ и ИР (как в ЖТ, так и в гепатоцитах) тесно связаны между собой, образуя порочный круг, приводящий к развитию НАЖБП.

1.1.2. Патогенез неалкогольной жировой болезни печени

В современной медицине ведущей теорией патогенеза НАЖБП является гипотеза “двух ударов” (Рисунок 1) [Parthasarathy G. et al., 2020]. “Первый удар” связан с чрезмерным накоплением триглицеридов в печени, что в конечном итоге ведет к развитию НАЖБП [Friedman S. L. et al., 2018; Parthasarathy G. et al. 2020]. “Второй удар” - прогрессирование НАЖБП до НАСГ - включает дополнительные патогенетические факторы, такие как: воспалительные цитокины, дисфункция митохондрий, окислительный стресс и т.д., которые приводят к необратимому повреждению печени [Friedman S. L. et al., 2018; Parthasarathy G. et al., 2020].

На сегодняшний день используется еще одна теория патогенеза НАЖБП – теория «множественных параллельных ударов», смысл которой заключается в том, что патологические процессы, ведущие к развитию НАЖБП, протекают параллельно, а не последовательно [Friedman S. L. et al., 2018].

Таким образом, механизмы, ведущие к заболеванию и их клинические проявления, весьма неоднородны [Alonso C. et al., 2017] .

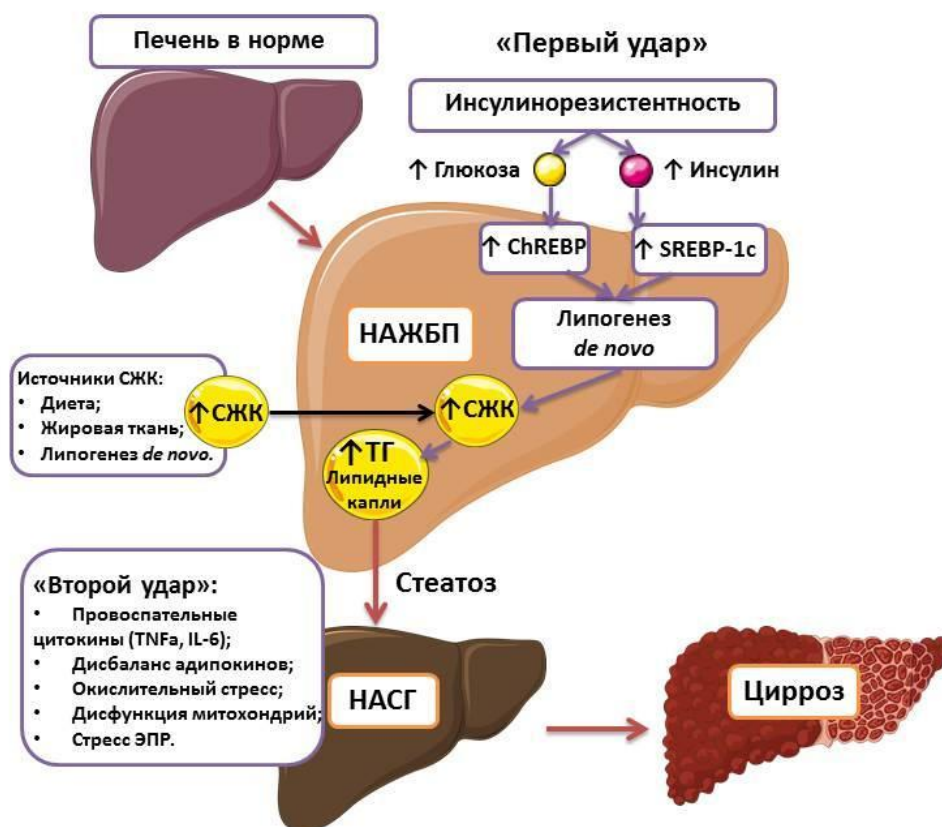


Рисунок 1. Схема развития НАЖБП по теории «двух ударов». (Адаптировано из Friedman S. L. et al., 2018).

Основная концепция патогенетических факторов НАЖБП и НАСГ заключается в том, что способность печени к переработке углеводов и ЖК перегружена.

Выделяют три основных источника свободных жирных кислот (СЖК) в печени: (1) циркулирующие ЖК, высвобождающиеся (депонированные) из ЖТ, (2) пищевые источники и (3) липогенез *de novo* из углеводов или аминокислот [Postic C., Girard J., 2008]. Когда ЖК поступают в избытке или нарушаются пути их утилизации, они могут служить субстратом для образования липотоксичных веществ (диацилглицерол (ДАГ), керамида), которые вызывают окислительный стресс и повреждение паренхимы печени [Parthasarathy G. et al., 2020]. Окислительный стресс у пациентов с НАЖБП рассматривается как один из факторов, который в конечном итоге приводит к необратимой гибели гепатоцитов [Ipsen D. H. et al., 2018]. Параллельно стеатоз способствует усилению передачи сигналов транскрипционного ядерного фактора NF-κβ, посредством активации ингибитора киназы ядерного фактора каппа β (IKK-β) [Zeng L. et al., 2014; Wu L., Xie Y., 2017]. Активация NF-κβ индуцирует выработку

провоспалительных медиаторов, таких как: фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкина (IL)-6 и IL-1 β [Pan X. et al., 2020; Gehrke N. et al., 2020]. Эти цитокины способствуют рекрутированию и активации клеток Купфера (резидентных печеночных макрофагов) [Gehrke N. et al., 2020]. Недавние исследования на мышах показали, что активация воспаления гепатоцитов может быть связующим звеном между начальным метаболическим стрессом и последующей их гибелью, а также стимуляцией фиброгенеза при НАСГ [Csak T. et al., 2011]. НАСГ является более тяжелой формой НАЖБП и характеризуется стеатозом, гепатоцеллюлярным баллонированием (просветление цитоплазмы) и лобулярным воспалением [Kleiner D. E. et al., 2016]. НАСГ далее может прогрессировать до фиброза и цирроза [Parthasarathy G. et al., 2020]. Цирроз является конечной стадией фиброза, приводя к печеночной недостаточности [Byrne C. D. et al., 2015; Friedman S. L. et al., 2018], в результате чего пациенту необходима трансплантация печени.

Таким образом, патогенез НАЖБП представляет собой порочный круг стеатоза, накопления «липотоксинов» и воспаления, который приводит к патологическим изменениям печени.

1.2. Роль митохондрий в развитии НАЖБП у пациентов с ожирением

Митохондрии являются ключевыми органеллами клетки и играют жизненно важную роль, которая заключается в синтезе энергии за счет метаболизма глюкозы и липидов. Помимо продукции АТФ, митохондрии также принимают участие во многих других клеточных процессах, включая β -окисление ЖК, синтез кетоновых тел, продукции метаболитов за счет ЦТК и активных форм кислорода (АФК) [Lee J. et al., 2019].

Известно, что стеатоз увеличивает β -окисление ЖК, индуцирует ЦТК и стимулирует окислительное фосфорилирование. В норме ЖК, поступающие в печень, подвергаются β -окислению, при котором образуется ацил-КоА [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014]. Далее ацил-КоА транспортируется в митохондрии с помощью карнитинацилтрансферазы-1 (КАТ-1), локализованной на внешней мембране митохондрий [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014]. КАТ-1 катализирует образование ацилкарнитина из ацил-КоА и свободного карнитина. Образовавшиеся ацилкарнитины транспортируются через внутреннюю митохондриальную мембрану в митохондрии посредством КАТ-2 [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A.,

2014]. Затем ацил-КоА расщепляются β -окислением на ацетил-КоА с помощью четырех реакций, которые генерируют НАДН и ФАДН₂. НАДН и ФАДН₂, образующиеся в результате β -окисления и ЦТК, используются для генерации АТФ, связанной с переносом электронов в дыхательной цепи митохондрий. ЖК являются основным энергетическим субстратом для производства АТФ в скелетных мышцах и сердце. В нормальных условиях печень окисляет ЖК, в основном, при низком уровне глюкозы в крови, например, при длительном голодании и повышенной физической активности. Также β -окисление в печени дает кетоновые тела (ацетоацетат, β -гидроксibuтират, ацетон), которые являются энергетическим топливом для мозга и нервной ткани, так как СЖК не способны проходить через гематоэнцефалический барьер [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014].

В постпрандиальном состоянии высокий уровень инсулина способствует липогенезу *de novo* за счет активации фактора транскрипции 1, связывающего регуляторный элемент стерола (SREBP-1) и дефосфорилирования ацетил-КоА-карбоксилазы. Инсулин ингибирует липолиз ЖТ, тем самым уменьшая поток СЖК в печень. С другой стороны, инсулин регулирует поступление ЖК в митохондрии [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014]. В результате гликолиза образуется пируват, который затем превращается в митохондриях в ацетил-КоА и оксалоацетат. Оба продукта реакции превращаются в цитрат и покидают митохондрии. В цитозоле с помощью цитратлиазы цитрат снова распадается на оксалоацетат и ацетил-КоА, который трансформируется в малонил-КоА, а затем в пальмитат под действием ацетил-КоА-карбоксилазы и синтазы высших ЖК соответственно. Повышенный уровень малонил-КоА, продуцируемый активностью ацетил-КоА-карбоксилазы, ингибирует КАТ-1, тем самым снижая скорость β -окисления за счет уменьшения поступления ЖК в митохондрии [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014]. В таком случае СЖК направлены на образование ТАГ и секрецию ЛПВП.

Митохондрии участвуют в окислительном фосфорилировании и производстве АФК - молекул, которые играют важную роль в передаче сигналов. Во время голодания глюкагон способствует окислению ЖК. Передача сигналов глюкагоном активирует АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК), которая в свою очередь, инактивирует ацетил-КоА-карбоксилазу путем фосфорилирования [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014; Sunny N. E. et al., 2017]. Это блокирует синтез малонил-КоА и

декарбоксилирует малонил-КоА, что усиливает элиминацию малонил-КоА [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014; Sunny N. E. et al., 2017]. В результате снижается синтез ЖК и активируется кетогенез. PPAR α также важен для опосредованной глюкагоном окислению ЖК [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014; Sunny N. E. et al., 2017]. Ядерный рецептор-активатор пролиферации пероксисом (PPAR) α , активируемый ЖК, который играет важную роль в регуляции транскрипции метаболизма липидов и глюкозы [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014; Sunny N. E. et al., 2017]. Активированный PPAR α связывается со специфическими последовательностями ДНК такими как: элемент ответа гормона пролифератора пероксисом (PPRE) [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014; Sunny N. E. et al., 2017]. Эти транскрипционные комплексы способствуют экспрессии генов, опосредующих окисление ЖК. Так, мишень PPAR α - фактор роста фибробластов 21 (FGF21) - способствует окислению ЖК и кетогенезу во время голодания [Северин Е.С. и др., 2008; Nassir F., Ibdah J.A., 2014; Sunny N. E. et al., 2017]. Следовательно, воздействуя на сигнальные пути в клетке, можно регулировать функции митохондрий.

Изменения в структуре и функции митохондрий являются отличительной чертой при НАЖБП. Гиперактивный цикл ЦТК может перегрузить электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) митохондрий печени и, таким образом, ускорить выработку АФК [Lee J. et al., 2019; Sunny N. E. et al., 2017]. Дефекты в морфологии митохондрий, ЭТЦ и продукции АТФ были зарегистрированы при НАЖБП, наряду с высокими уровнями АФК и других медиаторов воспаления. Satapati S. et al. (2015) продемонстрировали, что для активации митохондриального окислительного механизма в здоровой печени достаточно умеренно повышенной доставки СЖК [Satapati S. et al., 2015]. Что еще более важно, в данном эксперименте было продемонстрировано сопутствующее увеличение окислительного стресса и воспаления с более интенсивным переносом электронов на мембране митохондрий [Satapati S. et al., 2015] (Рисунок 2).

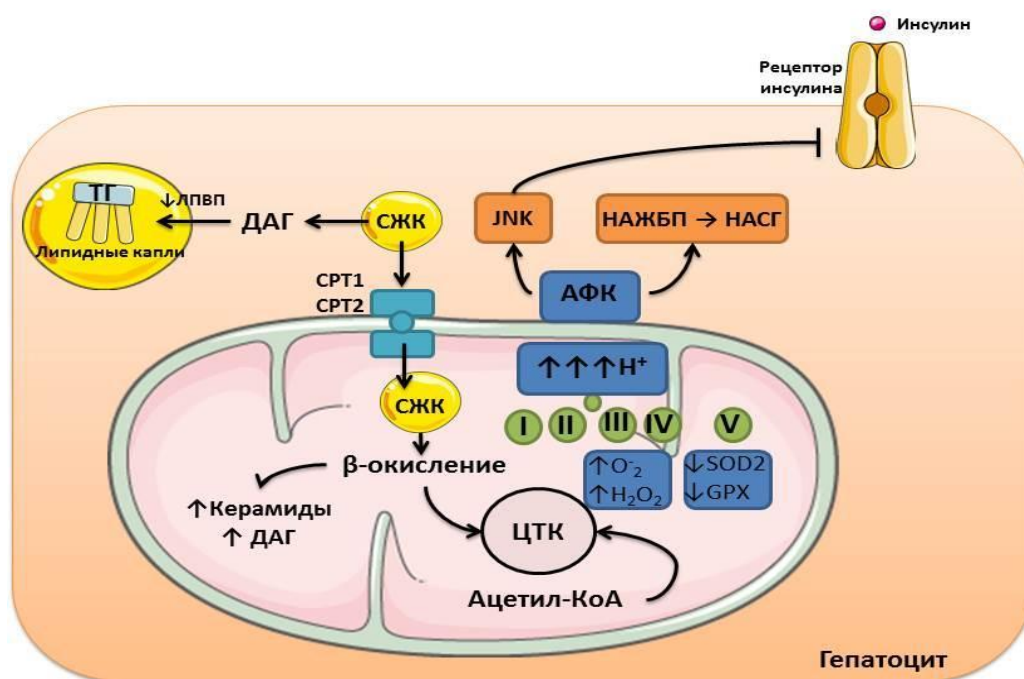


Рисунок 2. Изменения в биогенезе митохондрий при НАЖБП.

Снижение митохондриальной активности было продемонстрировано на модели НАЖБП с дефицитом холина, которая показывала увеличение эффективности окислительного фосфорилирования через 12 недель, но потеряла способность через 16 недель [Simões I. C. M. et al., 2018]. Это доказывает тот факт, что митохондрии пытаются компенсировать патологическое состояние, но со временем резервы истощаются [Simões I. C. M. et al., 2018].

Исследование, опубликованное в 2015 году с использованием респирометрии с высоким разрешением в митохондриях, выделенных из ткани печени, показало, что функция митохондрий печени не одинаково нарушалась при ожирении и НАЖБП [Koliaki C. et al., 2015; Tilg H. et al., 2017]. У пациентов, страдающих ожирением, максимальная частота митохондриального дыхания была в пять раз выше, чем у здоровых людей. При этом, у пациентов с НАСГ, эта частота была ниже на 40% [Koliaki C. et al., 2015]. Пациенты с НАСГ также имели повышенную разобщенность ЭТЦ и утечку протонов по сравнению со здоровыми людьми, а также окислительный стресс в печени, сопровождающийся снижением антиоксидантной защиты и усилением воспалительных реакций [Koliaki C. et al., 2015]. После приема пищи у людей, страдающих ожирением, стеатозом печени и ИР, также наблюдается шестикратное

увеличение АТФ в печени, по сравнению с контрольной группой, в то время как у пациентов с НАСГ наблюдалось нарушение выработки АТФ в печени, в результате истощения митохондриального потенциала [Tilg H. et al., 2017].

Перечисленные выше процессы, в итоге, приводят к более высоким уровням перекисного окисления липидов, образованию цитотоксических альдегидов и продукции провоспалительных цитокинов, что вызывает повреждение ДНК и возможную гибель клеток.

Таким образом, уменьшение количества питательных веществ, путем снижения потребления пищи или снижения уровня липолиза, при ожирении может потенциально предотвратить окислительную дисфункцию митохондрий печени и стать эффективным механизмом для уменьшения воспаления и окислительного стресса у пациентов с НАЖБП.

1.2.1. Структурно-функциональное состояние митохондрий при окислительном стрессе

Для нормального функционирования клетки необходимо поддержание структурно-функционального состояния митохондрий. Помимо выработки энергии в виде молекул АТФ, митохондрии участвуют в передаче сигналов кальция, окислительно-восстановительном гомеостазе, дифференцировке, пролиферации и апоптозе клеток. Митохондрии динамичные органеллы, что отражается в их постоянном делении и слиянии [Yaffe M., 1999]. По данным литературы, деление и слияние митохондрий объединяют в понятие динамики митохондрий [Yaffe M., 1999]. Помимо этого, митохондрии имеют свой собственный геном, в котором закодировано (37 генов, 16,5 пн) 13 субъединиц комплексов I, III, IV и V ЭТЦ митохондрий [Touyz R.M., 2012; Tsiloulis T., Watt M.J., 2015; J.S. Bhatti et al., 2017]. Правильная скоординированная репликация мтДНК и синтез белков, ответственных за ЭТЦ и репликацию самой мтДНК, в литературе определены как биогенез митохондрий [Touyz R.M., 2012; Tsiloulis T., Watt M.J., 2015; Bhatti J.S. et al., 2017]. Также митохондриальный биогенез заключается в организованной индукции нескольких регуляторов транскрипции, активность которых зависит от энергетических потребностей. PPAR-гамма ко-активатор-1 (PGC-1), митохондриальный транскрипционный фактор А (TFAM) и ядерный респираторный фактор 1 (NRF-1) являются важными регуляторами митохондриального биогенеза [Ngo

Н. В. et al., 2014; Xie D. et al., 2016]. Некоторые данные свидетельствуют о том, что при НАЖБП уровни экспрессии *TFAM*, *NRF-2* и *PGC-1 α* снижаются [Lee J. et al., 2019].

TFAM является многофункциональным ДНК-связывающим белком, который необходим для активации транскрипции, репликации и организации мтДНК [Ngo Н. В. et al., 2014]. *TFAM* играет центральную роль в продукции транскриптов промотора легкой цепи (*LSP*) и промотора тяжелой цепи 1 (*HSP1*) митохондриального генома. В экспериментах *in vitro* показана ключевая роль *TFAM* для поддержания нормального уровня транскриптов *LSP* и *HSP1* [Ngo Н. В. et al., 2014]. Митохондриальные транскрипты *LSP* и *HSP1* кодируют 13-ть важнейших компонентов дыхательной цепи, в связи с этим, *TFAM* необходим для эффективного окислительного фосфорилирования [Ngo Н. В. et al., 2014]. Кроме того, *TFAM* необходим для репликации мтДНК, поскольку укороченные транскрипты *LSP* используются для первичного синтеза ДНК [Xie D. et al., 2016]. Так, у мышей, у которых отсутствовал *Tfam*, нарушались процессы транскрипции и поддержания мтДНК, что приводило к недостатку биоэнергетики [Ngo Н. В. et al., 2014].

Для поддержания структурно-функционального состояния митохондрий необходима скоординированная митофагия органелл, которая включает в себя процессы деления и слияния митохондрий. Митофагия является специфичным для митохондрий аналогом аутофагии, а именно, разрушением поврежденных и неправильно функционирующих митохондрий, и считается важным процессом для сохранения структурно-функционального статуса митохондрий и чувствительности клеток к инсулину [Schrepfer E., Scorrano L., 2016; Simões I. C. M. et al., 2018]. На молекулярном уровне слияние митохондрий представляет собой двухэтапный процесс, для которого необходимо скоординированное действие как наружной, так и внутренней митохондриальной мембраны, посредством отдельных последовательных событий [Schrepfer E., Scorrano L., 2016]. У млекопитающих этот процесс зависит от четкой митохондриальной сублокализации трех белков: митофузины (*MFN*) 1 и 2, локализованные на наружной митохондриальной мембране, и белок оптической атрофии 1 (*Opa1*), локализованный на внешней митохондриальной мембране [Schrepfer E., Scorrano L., 2016].

Помимо участия в процессе слияния, *MFN2* также влияет на митохондриальный метаболизм, а уровень его экспрессии регулирует мембранный потенциал митохондрий

и систему окислительного фосфорилирования. Так, уменьшение экспрессии *Mfn2* в клетках мышечной ткани, подавляет экспрессию I, II, III и V субъединиц окислительного фосфорилирования и, соответственно, снижает активность комплексов I + III и комплекса III [Bach D. et al., 2005]. Напротив, усиление экспрессии *Mfn2*, усиливает регуляцию субъединиц комплексов I, IV и V [Bach D. et al., 2005]. Мутации в *MFN2* вызывают невропатию Шарко-Мари-Тута типа 2А, что говорит о ключевой роли *MFN2* для клеточной функции [Bach D. et al., 2005]. Было показано, что *MFN2* связывает Ras и останавливает клеточный цикл посредством ингибирования передачи сигналов, связанных с внеклеточным сигналом и MAP-киназой [Bach D. et al., 2005]. В дополнение, в исследованиях *in vivo* было показано, что уровни белка TFAM и *MFN-2* были значительно снижены у пациентов с НАСГ [Gao W. et al., 2018]. На основании таких данных можно предположить, что потеря функции *MFN2* участвует в запуске патологических механизмов, вызывающих заболевания в тканях с высоким уровнем окислительных процессов (мышцы, нервная ткань, сердце), в том числе, в гепатоцитах [Gao W. et al., 2018].

Деление или фрагментация митохондрий увеличивают количество органелл и подготавливают клетку к делению [Simões I. C. M. et al., 2018]. Деление регулируется белком деления 1 (FIS1), находящимся на внешней мембране, и цитозольным белком, динамин-подобным белком 1 (DRP1), который транспортируется на внешнюю митохондриальную мембрану во время инициации процесса [Li R. et al., 2020]. Динамический переход митохондрий между слитым и фрагментированным состоянием позволяет им реорганизовать свою структуру и избавиться от поврежденных или дисфункциональных компонентов с помощью митофагии. В условиях голода и истощения питательных веществ, митохондрии, как правило, дольше остаются в связанном или удлинённом состоянии [Li R. et al., 2020]. При стеатозе печени, избыточное поступление СЖК в клетки требует большего количества митохондрий для компенсаторного увеличения β -окисления. Поэтому, нарушение деления митохондрий и нарушение баланса процессов слияние/деление критично в рамках прогрессирования НАЖБП [Lee J. et al., 2019; Li R. et al., 2020].

Ранее было сказано, что при работе ЭТЦ митохондрий могут образовываться АФК. В нормальных условиях нейтрализация образовавшихся АФК происходит за счет работы ферментов антиоксидантной системы [Lee J. et al., 2019]. Однако, при НАЖБП,

наряду с повышенной продукцией АФК регистрируется снижение экспрессии и активности механизмов антиоксидантной защиты от АФК (SOD2, каталазы или GSH) [Li R. et al., 2020]. На животных моделях НАЖБП было показано, что введение липоевой кислоты приводит к профилактическому и терапевтическому воздействию на стеатоз печени, ингибируя липогенез *de novo* и способствуя снижению окислительного стресса. Также наблюдалось увеличение количества антиоксидантных ферментов (SOD2, GPX, GSH), снижение продукции АФК и увеличение числа копий мтДНК [Geng C. et al., 2017]. Лечение антиоксидантом гинкголидом А у мышей с высококалорийной диетой увеличивало уровни противоапоптотического белка Bcl-2 и снижало содержание проапоптотического протеина Bax в печени [Jeong H.-S. et al., 2017]. Поддержание нормального структурно-функционального состояния митохондрий требует тонкого баланса между биогенезом и митофагией, что имеет решающее значение для определения биоэнергетического ответа на метаболический стресс. Следует отметить, что исследования на мышах показали, что подавление митохондриальной протеазы, которая расщепляет поврежденные белки в митохондриальном матриксе, нарушает биоэнергетический гомеостаз митохондрий и способно индуцировать ИР в печени [Lee J. et al., 2019]. Таким образом, можно предположить, что снижение функций антиоксидантной защиты играет одну из ключевых ролей в патогенезе НАЖБП.

Таким образом, первоначально митохондрии справляются с избыточным поступлением липидов за счет повышения их окислительной способности. С прогрессированием тяжести заболевания происходит уменьшение β -окисления митохондрий. Это приводит к накоплению токсичных липидных интермедиаторов (керамидов и ДАГ), которые, в свою очередь, могут вызывать ИР, создавая тем самым порочный круг между ИР и снижением функций митохондрий. Потеря митохондриальной адаптации при длительном воздействии окислительного стресса способствует не только отложению липидов, но и накоплению АФК, что запускает продукцию провоспалительных цитокинов. Хроническое воспаление потенцирует фиброзирование тканей печени, которое в конечном итоге, приводит к развитию НАСГ. Так, чрезмерная перегрузка липидами нарушает антиоксидантную способность и энергетический баланс клетки, приводит к множественным повреждениям митохондриального биогенеза.

1.3. Ожирение как этиологический фактор НАЖБП

Ожирение — это состояние, при котором в организме человека накапливаются избыточные жировые отложения. У человека признается наличие этого заболевания, если его ИМТ >30 кг/м², а патологическое ожирение, определяется как морбидное - ИМТ >40 кг/м² [Obesity and overweight, 2021].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) ожирению поставила статус глобальной эпидемии [Obesity and overweight, 2021]. Около 500 миллионов взрослых по всему миру страдают ожирением и 1,5 миллиарда - избыточным весом [Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation, 2000; Obesity and overweigh, 2021]. Помимо этого, рост распространенности ожирения сопровождается с общим увеличением смертности и сокращением продолжительности жизни до 20 лет [Obesity and overweight, 2021].

Данные мировой литературы свидетельствуют, что многие сопутствующие заболевания, в частности, НАЖБП связаны с генерацией хронического воспаления [Olefsky J. M., Glass C. K., 2010; Reilly S. M. et al., 2017; Luci C. et al., 2020]. Причинно-следственная связь между воспалением и осложнениями ожирения остается до конца невыясненной. Выделяют три этапа хронического воспаления [Reilly S. M. et al., 2017].

Так, неопределенный фактор стресса провоцирует острый адаптивный воспалительный ответ [Luci C. et al., 2020]. Затем развивается длительная дезадаптивная фаза, которая приводит к осложнениям.

В случае ожирения, первоначальными триггерами могут быть избыток калорийной пищи и малоподвижный образ жизни с общим гиперанаболическим состоянием [Reilly S. M. et al., 2017]. ЖТ высвобождает хемокины, которые инициируют адаптивный воспалительный ответ, обеспечивая гипертрофию адипоцитов, уменьшая, одновременно, накопление энергии [Reilly S. M. et al., 2017; Milić S. et al., 2014]. Чрезмерная гипертрофия адипоцитов вызывает дисфункцию их органелл (в частности, митохондрий и эндоплазматического ретикулума), нарушение регуляции гормонов, нарушение накопления ЖК, увеличение циркулирующих СЖК, накопление ДАГ и керамидов в таких органах, как печень, мышцы и поджелудочная железа [Pan X. et al., 2020; Reilly S. M. et al., 2017]. Кроме того, постоянное поступление калорийной пищи в организм, с недостаточным адипогенезом в подкожной ЖТ, может также способствовать увеличению доставки СЖК в инсулинзависимые органы [Olefsky J. M.,

Glass C. K., 2010]. Избыточное поступление СЖК в гепатоциты является ключевым триггером для развития НАЖБП [Milić S. et al., 2014].

Однако, со временем система стремится восстановить гомеостаз. Эти изменения сопровождаются снижением адаптации метаболических процессов к изменяющимся условиям среды. Также при гипертрофии и гиперплазии адипоцитов кровоснабжение жировой ткани уменьшается, что ускоряет гипоксию тканей и ускоряет развитие последующих иммунопатологических реакций [Pan X. et al., 2020].

1.3.1. Молекулярно-генетические механизмы формирования воспаления жировой ткани

В условиях гипоксии при ожирении активируется фактор, индуцируемый гипоксией (HIF), состоящий из двух димерных субъединиц: α -субъединицы, чувствительной к кислороду, и β -субъединицы [Chen J. et al., 2019; Lee Y. S. et al., 2014]. Существует две α -субъединицы, HIF-1 α и HIF-2 α , которые по-разному регулируются напряжением кислорода и метаболическими сигналами [Keith B. et al., 2011; Lee Y. S. et al., 2014]. В норме α -субъединицы гидроксилируются пролилгидроксилазами, что позволяет убиквитин-лигазе убиквитинировать HIF-1 α , который затем подвергается протеолитической деградации через протеасомный путь [Morello E. et al., 2018; Zhang X. et al., 2020]. Стадия гидроксирования ингибируется в условиях гипоксии, что приводит к стабилизации и увеличению экспрессии HIF-1 α . HIF-1 α и HIF-2 α регулируют различные подгруппы генов, такие как *VEGF* и *GLUT1* [Lee Y. S. et al., 2014]. В гомеостазе аргинина HIF-1 α индуцирует экспрессию iNOS и увеличивает выработку оксида азота (NO), тогда как HIF-2 α - стимулирует экспрессию аргиназы и подавляет продукцию оксида азота [Reilly S. M. et al., 2017].

На молекулярном уровне, стимуляция насыщенными ЖК адениннуклеотидтранслоказы 2 (ANT2), белка внутренней митохондриальной мембраны, приводит к разобщению дыхательной цепи митохондрий [Keith B. et al., 2011; Lee Y. S. et al., 2014; Reilly S. M. et al., 2017]. Это является индуктором экспрессии HIF-1 α , а также выработки хемокинов, что усугубляет окислительный стресс за счет увеличения продукции iNOS [Reilly S. M. et al., 2017]. Таким образом, при ожирении гипертрофия адипоцитов, в сочетании с нарушенной васкуляризацией ЖТ, приводит к гипоксии жировой ткани [Lee Y. S. et al., 2014]. Гипоксия адипоцитов и индукция HIF-1 α действуют как ранние триггеры воспаления [Zhang X. et al., 2020].

СЖК активируют Toll-подобные рецепторы (TLR4 и TLR2) и способствуют передаче сигналов NF- κ B [Saad M. J. A., et al., 2016; Cunningham A. L. et al., 2021]. В адипоцитах, активация NF- κ B может усиливать синтез и секрецию хемокинов, таких как моноцитарный хемотаксический фактор-1 (MCP1, также известный как CCL2), что приводит к инфильтрации ЖТ макрофагами [Reilly S. M. et al., 2017]. Макрофаги ЖТ являются фенотипически гетерогенными и разделяются на два различных фенотипа, макрофаги M1 и M2 [Fischer-Posovszky P. et al., 2011; Kazankov K. et al., 2019]. «Классически активированные», или макрофаги M1, активируются в ответ на стимуляцию интерфероном (IFN) γ и воздействие бактериальных компонентов, например липополисахаридов [Fischer-Posovszky P. et al., 2011; Kazankov K. et al., 2019]. Макрофаги M1 являются первой линией защиты от внутриклеточных патогенов и характеризуются повышенной продукцией провоспалительных медиаторов (TNF α , IL-6 и IL-12) [Appari M. et al., 2018]. «Альтернативно активированные» или M2 макрофаги возникают при стимуляции IL-4 и IL-13, трансформирующим фактором роста (TGF) β и глюкокортикоидами [Fischer-Posovszky P., et al., 2011; Appari M., et al., 2018]. Поляризованные клетки M2 участвуют в ремоделировании ткани в ответ на повреждение, а также ответственны за общую регуляцию гомеостаза ткани [Fischer-Posovszky P. et al., 2011; Kazankov K. et al., 2019]. В норме макрофаги и другие иммунные клетки (эозинофилы, Т-клетки, дендритные клетки и др.) распределены в ЖТ равномерно. При ожирении макрофаги M1 образуют короноподобные структуры вокруг адипоцитов [Reilly S. M. et al., 2017]. Дисфункция адипоцитов вызывает фенотипическое переключение макрофагов с альтернативно активированного M2-подобного фенотипа на провоспалительный M1-фенотип [Reilly S. M. et al., 2017; Kazankov K. et al., 2019]. В связи с тем, что количество M1 макрофагов возрастает в сравнении с M2, уровень провоспалительных цитокинов повышается, что приводит к развитию воспалительного процесса в ЖТ, и, в конечном итоге, формированию ИР [Fischer-Posovszky P. et al., 2011; Kazankov K. et al., 2019].

Таким образом, достижение порога экспансии клеток ЖТ приводит к окислительному стрессу адипоцитов и запуску каскада воспалительных реакций, что сопровождается развитием сопутствующих патологических процессов, в частности ИР и НАЖБП.

1.4. Взаимосвязь инсулинорезистентности с НАЖБП при ожирении

В норме, после приема пищи, примерно одна треть потребляемой глюкозы поглощается печенью, а остальная часть - периферическими тканями, прежде всего скелетными мышцами, с помощью инсулинозависимого механизма [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010]. Постпрандиальная гипергликемия стимулирует секрецию инсулина из поджелудочной железы, а повышение концентрации инсулина в плазме стимулирует усвоение глюкозы скелетными мышцами, что приводит к метаболизму глюкозы в клетке [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010].

Ключевым регуляторным гормоном метаболизма глюкозы является инсулин. Инсулин - гормон пептидной природы, который вырабатывается β -клетками островками Лангерганса в поджелудочной железе при поступлении глюкозы в кровь. В норме, для проявления биологических эффектов инсулина, гормон должен связываться со специфическими рецепторами к инсулину (IR), находящимися на мембране клеток. Рецептор инсулина является гетеротетрамером и состоит из двух α -субъединиц и двух β -субъединиц, которые связаны дисульфидными связями [Meshkani R. et al., 2009; Yazıcı D., Sezer H., 2017; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019]. Две α -субъединицы рецептора инсулина расположены на внеклеточной поверхности плазматической мембраны и содержат инсулинсвязывающий домен [Meshkani R. et al., 2009; Yazıcı D., Sezer H., 2017; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019]. β -субъединицы имеют внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены, которые передают инсулин-стимулированную активность киназы, направленную к своим собственным тирозиновым остаткам [Meshkani R. et al., 2009; Yazıcı D., Sezer H., 2017; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019].

В физиологических условиях, при связывании инсулина с α -субъединицей рецептора, активируется ферментативный домен (β -субъединица) рецептора. Так как он обладает тирозинкиназной активностью, то фосфорилирует внутриклеточные белки - субстраты инсулинового рецептора (IRS). Дальнейшее развитие событий может пойти двумя направлениями: митоген-активируемый протеинкиназный путь (МАРК-путь) и фосфоинозитид-3-киназный (PI3K) механизм действия [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010; Kim O.-K. et al., 2015].

При активации PI3K механизма, результатом являются быстрые эффекты – активация GLUT-4 и поступление глюкозы в клетку, изменение активности

"метаболических" ферментов – ТАГ-липазы, гликогенсинтазы, гликогенфосфоорилазы, киназы гликогенфосфоорилазы, ацетил-SKoA-карбоксилазы и других. При реализации MAPK механизма, регулируются медленные эффекты – пролиферация и дифференцировка клеток, процессы апоптоза и выживания [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010; Kim O.-K. et al., 2015; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019].

PI3K состоит из регуляторной (p85) и каталитической (p110) субъединиц. При реализации PI3K пути, фосфорилированные тирозиновые остатки IRS ассоциируются с 85 кДа регуляторной субъединицей PI3K, приводя к активации фермента (Рисунок 3) [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010].

Активация PI3K фосфорилированным IRS приводит к стимуляции протеинкиназы В/Akt, которая является центральным промежуточным звеном для многих метаболических функций инсулина [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019].

В норме Akt отвечает за инактивацию гликогенсинтазкиназы посредством ее фосфорилирования, что приводит к активации гликогенсинтазы. В результате происходит синтез гликогена из глюкозы. Akt также фосфорилирует субстрат Akt AS160, что приводит к его перераспределению в клетке и активации белков Rab, необходимых для транслокации везикул, содержащих GLUT, в плазматическую мембрану. GLUT – это широкая группа мембранных белков, которые осуществляют транспорт глюкозы через плазматическую мембрану. На сегодняшний день идентифицировано 14 членов GLUT. На основе сходства последовательностей семейство GLUT было разделено на три подкласса. В контексте рассматриваемой нами тематики, наибольший интерес представляет I класс, в который входят GLUT1-GLUT4, являющиеся двунаправленными транспортерами. GLUT4 распространен в жировой ткани, мышцах и миокарде. В результате внедрения GLUT в мембрану, происходит инсулин-зависимый транспорт глюкозы, что необходимо для поддержания равновесия углеводов в крови и в организме в целом [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010; Kalupahana N. S. et al., 2012; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019].

Также при взаимодействии инсулина с IRS происходит фосфорилирование таких адаптерных белков как Grb2 и Shc с доменами SH2 PI3K, за счет тирозинкиназной активности IRS. Grb2 и Shc связывают IRS-1/IRS-2 с сигнальным MAPK-путем, который играет важную роль в генерации факторов транскрипции и способствует росту,

пролиферации и дифференцировке клеток [Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010; Santoleri D., Titchenell P. M., 2019].

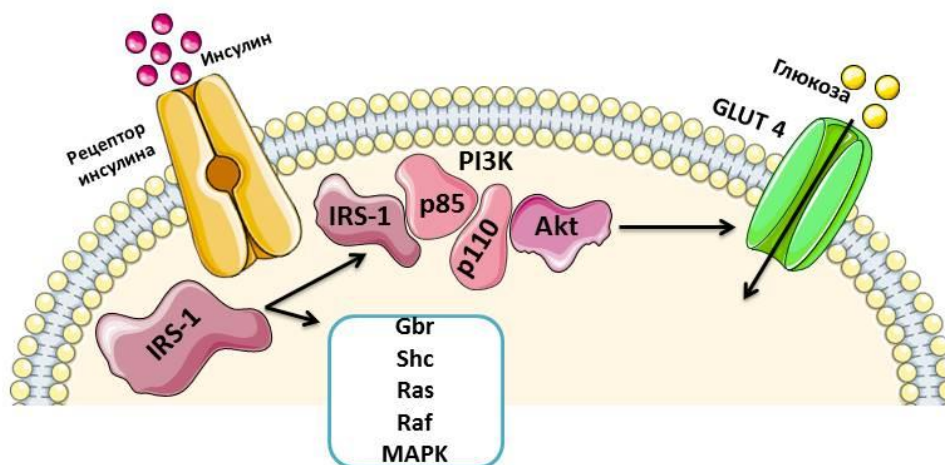


Рисунок 3. Передача сигнала инсулина в норме. (Адаптировано из Abdul-Ghani M. A., DeFronzo R. A., 2010).

1.4.1. Развитие инсулинорезистентности в ЖТ и печени

Инсулинорезистентность — это снижение реакции инсулин-чувствительных тканей (ЖТ, печень, скелетные мышцы) на инсулин при его достаточной концентрации. Наличие ИР вызывает хроническую компенсаторную гиперинсулинемию [Kim O.-K. et al., 2015].

Не смотря на то, что ЖТ не является значимым органом, участвующим в стимулированной инсулином утилизации глюкозы (на ее долю приходится менее 5% нагрузки глюкозой), специфическая для ЖТ делеция GLUT4 у мышей приводит к формированию ИР в адипоцитах [Fazakerley D. J. et al., 2019; Petersen M. C., Shulman G. I., 2018].

Основным механизмом формирования ИР в адипоцитах является высокая продукция аутокринных или паракринных воспалительных цитокинов, которые могут нарушать передачу сигналов инсулина [Petersen M. C., Shulman G. I., 2018]. Так, ингибирование PI3K с интактной передачей сигналов MAP киназы, активирует множество воспалительных путей, включая ингибитор $\kappa\beta$ $\text{KK}\beta/\text{NF-}\kappa\beta$ и c-Jun N-терминальную киназу (JNK), которые также вызывают резистентность к инсулину (Рисунок 4) [Yazıcı D., Sezer H., 2017; Petersen M. C., Shulman G. I., 2018]. Устойчивая

физиологическая гиперинсулинемия активирует множество генов, вовлеченных в воспаление [Yazıcı D., Sezer H., 2017].

Известно, что при ожирении происходит системное разобщение метаболических процессов [Yazıcı D., Sezer H., 2017]. Основными биохимическими признаками ИР являются гиперинсулинемия и гипергликемия. В печени, в этих условиях, гиперинсулинемия приводит к усилению работы фактора SREBP-1, который является главным регулятором транскрипции всех генов, отвечающих за липогенез. Одновременно, гипергликемия активирует белок, связывающий элементы, реагирующие на углеводы (ChREBP) [Petersen M. C., Shulman G. I., 2018]. В свою очередь, ChREBP активирует гены, участвующие в липогенезе, и способствует развитию дисбаланса транспорта липидов через мембрану, в результате которого происходит накопление ДАГ. Последний активирует атипичные изоформы протеинкиназы C (PKC ϵ). В свою очередь, PKC ϵ ослабляет действие инсулина, фосфорилируя и ингибируя тирозинкиназный домен IR. Снижение фосфорилирования IRS опосредует ингибирование PI3K [Yazıcı D., Sezer H., 2017; Petersen M. C., Shulman G. I., 2018]. В результате нарушается транспорт везикул, содержащих GLUT, в плазматическую мембрану, что уменьшает поступление глюкозы в клетку и синтез гликогена (Рисунок 4) [Petersen M. C., Shulman G. I., 2018].

В конечном итоге, в ответ на относительную гипергликемию, наблюдается компенсаторный ответ β -клеток поджелудочной железы, вызывающий повышенную секрецию инсулина [Yazıcı D., Sezer H., 2017]. Более высокие концентрации инсулина увеличивают поглощение глюкозы скелетными мышцами и подавляют синтез глюкозы в печени для поддержания углеводного гомеостаза. Следовательно, в условиях ИР в первую очередь происходит поддержание нормогликемии путем высокой продукции инсулина поджелудочной железой [Kalupahana N. S. et al., 2012]. В итоге, сочетание ИР и гиперсекреции инсулина поджелудочной железой приводят к недостаточности β -клеток, что приводит к развитию СД 2 типа [Kalupahana N. S. et al., 2012; Yazıcı D., Sezer H., 2017].

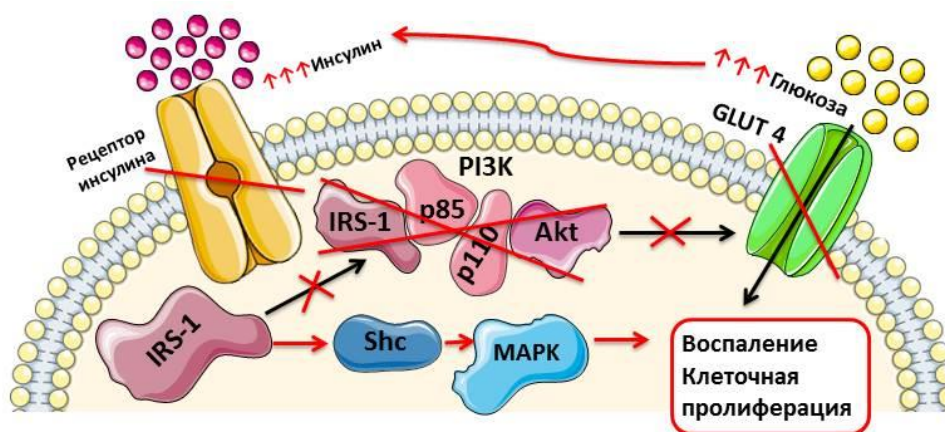


Рисунок 4. Нарушение передачи сигнала инсулина. (Адаптировано из Abdul-Ghani M. A. et al., 2010).

1.5. Факторы, влияющие на развитие НАЖБП

Провоспалительные цитокины

Прогрессирование НАЖБП в НАСГ в значительной степени обусловлено клетками Купфера в печени, которые секретируют различные провоспалительные цитокины [Stojšavljević S. et al., 2014; Niederreiter L., Tilg H., 2018]. TNF- α является основным звеном в патогенезе НАЖБП, ожирения и ИР. TNF- α является ключевым медиатором с провоспалительным действием, оказывающим различные биологические эффекты (метаболический, воспалительный, пролиферативный, некротический), которые связаны с его повышенной экспрессией в печени и жировой ткани [Stojšavljević S. et al., 2014]. TNF- α является оптимальным триггером для развития НАЖБП. TNF- α секретируется макрофагами в жировой ткани, гепатоцитами, клетками Купфера и другими типами клеток [Stojšavljević S. et al., 2014].

TNF- α увеличивает фосфорилирование IRS-1, что ведет к ингибированию транслокации GLUT4 в мембрану клетки [Stojšavljević S. et al., 2014]. Это приводит к нарушению транспорта глюкозы в ткань (в частности, в скелетные мышцы). Он также стимулирует гормон-чувствительную липазу, что приводит к увеличению СЖК сыворотки и их притока в печень [Stojšavljević S. et al., 2014; Fontes-Cal T. C. M. et al., 2021]. Таким образом, продукция TNF- α нарушает углеводный и липидный обмены.

Накопление липидов в печени вызывает транслокацию Bax (проапоптотического члена семейства Bcl-2) в лизосомы, вызывая их дестабилизацию и высвобождение лизосомальной цистеинпротеазы катепсина В, посредством активации IKK- β в

гепатоцитах, что активирует NF- κ B и усиливает экспрессию генов провоспалительных цитокинов, включая TNF- α [Stojšavljević S. et al., 2014]. В гепатоцитах TNF- α активирует супрессоры передачи сигналов цитокинов (SOCS), что приводит к снижению передачи сигналов инсулина, а также к индукции белка SREBP-1 и, следовательно, к стеатозу печени [Seo Y. Y. et al., 2013]. TNF- α активирует цитозольную сфингомиелиназу, которая расщепляет липиды с образованием керамидов [Stojšavljević S., et al., 2014]. Керамиды, в свою очередь, активируют несколько киназ, что приводит к нарушению передачи сигналов инсулина, а также увеличивает синтез АФК. Последние дополнительно усиливают продукцию TNF- α гепатоцитами, что увеличивает проницаемость мембран митохондрий, высвобождает митохондриальный цитохром С и ускоряет образование АФК [Stojšavljević S. et al., 2014]. В конце концов это приводит к гибели гепатоцитов. Существуют два рецептора TNF- α : рецептор фактора некроза опухоли 1 (TNFR1) и 2 (TNFR2) [Wandrer F. et al., 2020]. Но только TNFR1 является медиатором апоптоза гепатоцитов [Wandrer F. et al., 2020].

Все вышеперечисленные биологические эффекты TNF- α приводят к прогрессированию НАЖБП. Было показано, что у здоровых людей с высоким плазменным уровнем TNF- α риск развития НАЖБП значительно выше, чем у людей с уровнем TNF- α в норме [Stojšavljević S. et al., 2014]. Основываясь на обширных данных источников литературы, можно сделать вывод, что TNF- α связан с ИР, усиленным периферическим липолизом, стеатозом печени, воспалением, некрозом, апоптозом и фиброзом.

Инсулинорезистентность

ИР является одним из «множественных факторов», приводящих к развитию НАЖБП и НАСГ, что сопровождается накоплением липотоксинов, АФК и активацией воспалительного каскада [Buzzetti E. et al., 2016]. У пациентов с НАЖБП, генетические факторы и факторы окружающей среды также влияют на каскад передачи сигналов инсулина и, следовательно, способствуют формированию ИР.

Выделяют ряд механизмов, способствующих нарушению передачи сигналов инсулина у пациентов с НАЖБП:

- 1) серинфосфорилирование субстрата рецептора инсулина IRS (insulin receptor substrate) с помощью воспалительных сигнальных молекул, таких как JNK или IKK-b [Sabio G. et al., 2008];

2) активация NF- κ B и супрессоров передачи цитокинов SOCS [Taniguchi C. M. et al., 2006].

Как уже упоминалось ранее, у пациентов при избыточной массе тела, ЖТ характеризуется повышенной секрецией СЖК, лептина и провоспалительных цитокинов, включая TNF- α и IL-6 [Niederreiter L., Tilg H., 2018].

«Портальная гипотеза» предполагает, что повышенный липолиз в клетках висцеральной ЖТ усиливает приток СЖК в воротную вену, что, в свою очередь, приводит к нарушению передачи сигналов IRS и формированию стеатоза печени [Kim O.-K. et al., 2015].

С помощью процедуры катетеризации печеночной вены с контрастным изотопом было показано, что липолитический вклад СЖК составил 5-10% у людей с нормальным ИМТ и до 30% у лиц с избыточной висцеральной ЖТ [Buzzetti E. et al., 2016]. После выделения в воротную вену, СЖК поглощаются гепатоцитами, главным образом, с помощью синтетазы длинноцепочечных ЖК, активность которой обеспечивается членами семейства белков-переносчиков ЖК [Kim O.-K. et al., 2015; Buzzetti E. et al., 2016]. При попадании в гепатоцит, СЖК связываются с коферментом А и через образование ацил-КоА превращаются в ТГ. В исследованиях на животных было показано, что избыточное поступление в клетку СЖК приводит к накоплению липотоксинов. Последние, или липидные интермедиаторы, такие как ДАГ, ингибируют передачу сигналов инсулина и стимулируют отложение ТГ в печени [Tilg H. et al., 2017]. ДАГ способствует ИР посредством активации PKC ϵ и JNK, которые являются двумя основными регуляторами воспалительных путей [Buzzetti E. et al., 2016; Tilg H. et al., 2017]. Активация воспалительных путей ингибирует фосфорилирование IRS-1, что усугубляет ИР и увеличивает выработку цитокинов в печени. Липиды, в частности ДАГ, также тесно связаны с воспалительными цитокинами, включая TNF- α , IL-6 и прокоагулянтные факторы, такие как: фактор VIII, ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI-1) [Buzzetti E. et al., 2016; Niederreiter L., Tilg H., 2018]. В этих условиях, митохондрии в большей степени вырабатывают АФК при окислении ЖК. АФК вызывают окислительный стресс из-за дисбаланса между их выработкой и защитными антиоксидантными функциями клетки [Kim O.-K. et al., 2015]. Гепатоцит, в свою очередь, пытаясь ограничить накопление СЖК, увеличивает митохондриальное β -окисление. Связанные с коферментом А СЖК, переносятся в митохондриальный

матрикс с помощью карнитин-О-пальмитоилтрансферазы (CPT) 1 и CPT2, ферментами, которые ингибируются инсулином, малонил-КоА и ацил-КоА [Tilg H. et al., 2017]. CPT1 и CPT 2 активирует рецептор пролифератора пероксисом, стимулируя тем самым β -окисление ЖК [Tilg H. et al., 2017]. Избыток ацетил-КоА направляется в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), а НАДН - в цепь переноса электронов [Kim O.-K. et al., 2015]. Истощение антиоксидантных способностей SOD2 и глутатионпероксидазы (GPX), в конечном итоге, приводит к усилению окислительного стресса, опосредованного анионами супероксида ($O_2^{\cdot-}$) и перекиси водорода H_2O_2 , что приводит к ИР и прогрессированию НАЖБП до НАСГ и фиброза [Kim O.-K. et al., 2015; Tilg H. et al., 2017] (Рисунок 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При ожирении гепатоциты подвергаются избыточному поступлению СЖК, которые подвергаются β -окислению для синтеза АТФ или этерификации для производства ТГ. Избыток ТГ накапливается в липидных каплях внутри гепатоцитов, вызывая стеатоз. Помимо этого, СЖК связываются с коферментом А, образуя ацил-КоА, что снижает инсулин-опосредованное поглощение глюкозы. Гиперинсулинемия приводит к ингибированию β -окисления СЖК, что способствует еще большему накоплению ТГ в печени. Избыток ацетил-КоА через цикл трикарбоновых кислот способствует большему поступлению ионов водорода в цепь переноса электронов. В результате, выработка АФК митохондриями превышает норму, что потенцирует окислительный стресс в гепатоцитах. Чрезмерное количество АФК может вызывать высвобождение провоспалительных молекул, таких как TNF- α , что усугубляет воспалительные процессы в клетке. Длительное воздействие окислительного стресса приводит к локальному воспалению ткани, развитию и прогрессированию фиброза. При этом, происходит истощение активности антиоксидантных систем клетки, что усугубляет развитие НАЖБП. Избыточное содержание АФК вызывает перекисное окисление липидов, что приводит к разрушению мембраны митохондрий и повреждению мтДНК. Логично, что при повреждении митохондриального генома происходят изменения в экспрессии генов и синтеза белков, в частности, участвующих в процессах слияния и деления. Баланс между этими процессами необходим для митохондриального биогенеза. В рамках НАЖБП увеличение количества митохондрий увеличит способность β -окисления, что позволит утилизировать СЖК. Высокая продукция АФК вполне может быть компенсирована за счет системы антиоксидантной защиты. При этом увеличение количества с поврежденной мтДНК скорее приведет еще

большему увеличению АФК и снижению антиоксидантной системы. Это подтверждает тот факт, что нарушение баланса процессов слияние/деление критично в рамках прогрессирования НАЖБП.

Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В данном исследовании были использованы результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 305 человек, из которых 263 пациента имели алиментарно-конституциональный тип ожирения. Тип локализации ожирения был абдоминальный и гипертрофический по морфологии. Распределение пациентов по группам представлено в таблице 1. 44 пациента с НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² составили группу 2, 88 пациентов с НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² – группу 3. К группам 4, 5 относились люди, больные НАЖБП с ожирением и СД 2 типа: 42 пациента с ИМТ <40 кг/м² и 89 пациентов с ИМТ >40 кг/м² соответственно (Таблица 1). Группу сравнения (группа 1) составили 42 условно здоровых донора (далее – группа контроля), с нормальными антропометрическими и биохимическими показателями. Все исследуемые группы были сопоставимы по возрастным и гендерным характеристикам (Таблица 1).

Таблица 1

Основные клинические показатели исследуемых групп

Показатели	Показатели исследуемых групп				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Пациенты с НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ <40 кг/м ² (Группа 2; n=44)	Пациенты с НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 3; n=88)	Пациенты с НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 4; n=42)	Пациенты с НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 5; n=89)
Мужчины/женщины	17/25	11/33	18/70	18/24	21/68
Возраст, лет	35,82±8,26	41,59±8,72	44,19±9,11	45,1±9,13	48,47±8,17
ИМТ, кг/м ²	22,55±3,49	35,69±2,62	48,38±7,31	36,1±2,73	49,53±7,59

Примечание: * - при p<0,05 по отношению к показателей контрольной группы
Mean - среднее значение; SD - стандартное отклонение

Со всеми пациентами было подписано добровольное информированное согласие на исследование. Для проведения исследования было получено разрешение в локальном

этическом комитете БФУ им. И. Канта (протокол №1 БФУ им. И. Канта от 28 февраля 2019 года). Согласно полученным анкетам, все участники эксперимента принадлежали к восточнославянской популяции и проживали на территории Северо-Западного региона России. Диагнозы ожирение и СД 2 типа были установлены по рекомендованным критериям ВОЗ ((1999, 2000) и (1999–2013), соответственно). Все больные, вошедшие в исследование, посещали школу ожирения, организованную Затолокиным П.А. (канд. мед. наук, хирург высшей категории) и Миронюк Н.И. (канд. мед. наук, врач-эндокринолог), в КОКБ г. Калининграда. Всем пациентам групп 2-5 были проведены Затолокиным П.А. бариатрические операции, направленные на лечение ожирения. Больные НАЖБП ожирением и СД 2 типа (группы 4 и 5) принимали гипогликемические препараты: метформин (доза от 500 до 1500 мг в сутки) и эксенатид (доза 5 мкг 2 раза/день) без инсулинотерапии в течение года и более. Пациентам было рекомендовано изменение образа жизни, а именно включение физических нагрузок и диеты без содержания высокого содержания жиров и углеводов. У 4 и 5 групп продолжительность СД 2 типа составила $2,0 \pm 1,3$ года.

2.1.1. Критерии включения и исключения

В критерии включения были отнесены следующие пункты:

- возраст от 18 до 65 лет;
- поставленный в условиях стационара диагноз ожирения (не более 10 лет);
- поставленный в условиях стационара диагноз СД 2 типа;
- поставленный в условиях стационара диагноз НАЖБП;
- наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании и использование биологического материала в целях исследования.

К критериям исключения относились следующие пункты:

- возраст до 18 лет и после 66 лет;
- нарушение мозгового кровообращения, острый инфаркт миокарда, заболевания щитовидной железы, аутоиммунные и инфекционные заболевания, воспалительные очаги любой локализации, онкологические и наследственные заболевания, психические заболевания, длительный прием гиполлипидемических препаратов, алкогольная и наркотическая зависимости;

- больные, которые отказывались от врачебного и лабораторного контроля в ходе исследования.

В анамнезе лиц группы сравнения (контрольной группы) отсутствовали аллергические заболевания, обострения хронических воспалительных процессов, инфекционных заболеваний, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление курением, алкоголем, наркотическая зависимость. От момента последнего эпизода ОРВИ прошло более двух месяцев. Все обследованные лица этой группы не имели кардиоваскулярной патологии, нарушений углеводного, белкового и липидного обменов.

2.2. Материалы исследования

При проведении бариатрических операций (гастрошунтирование или продольная резекция) у больных НАЖБП с ожирением, вне зависимости от состояния углеводного обмена, были взяты биоптаты печеночной ткани. Перед проведением операции за 36 часов пациенты с НАЖБП и ожирением прекращали прием лекарственных препаратов, влияющих на углеводный и липидный обмены. Биоптаты печени у контрольной группы были взяты при проведении рутинных лапароскопических операций: паховая грыжа справа или слева, бедренная, диафрагмальная и вентральная грыжи, нефроптоз; образцы крови у контрольной группы были получены натощак перед проведением оперативных вмешательств.

Ткань печени использовали для гистологического исследования, а также для оценки результатов исследования тканеспецифической экспрессии генов *TFAM*, *MFN2*, *BAX*, *DMN1L*, *SOD1*, *NF- κ B* и *MT-ND4* и уровней соответствующих генам белков. Для оценки биохимических и молекулярно-генетических показателей, взятие образцов венозной крови проводили натощак, накануне плановых лапароскопических операций.

Кровь отбирали в вакуумные пробирки Vacuette с активатором образования сгустка для получения сыворотки или ЭДТА для получения плазмы крови. Для определения биохимических показателей в сыворотке крови использовали кровь с активатором свертываемости. Для определения содержания цитокинов в плазме крови использовали кровь, стабилизированную ЭДТА.

2.3. Методы исследования

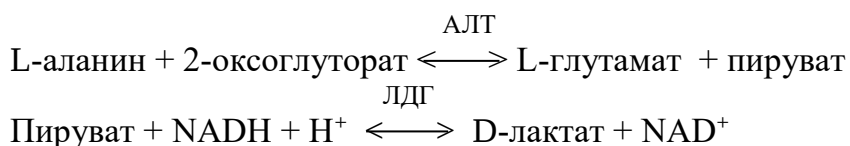
Во всех группах проводили комплексное исследование биохимических показателей крови (оценка углеводного, белкового, пигментного и жирового обменов, определение сывороточных уровней активности печеночных ферментов); определение содержания цитокинов (sTNFSF14/LIGHT, sIL-10, sIL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra) в плазме крови; гистологический анализ срезов биоптатов печени; определение уровня относительной тканеспецифической экспрессии генов и уровня синтеза белка в печеночной ткани.

2.3.1. Исследование биохимических показателей

Фотометрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-180 («Furuno Electric Company», Япония) было проведено измерение биохимических показателей в сыворотке крови с использованием коммерческих тест-систем DiaSys («DiaSys Diagnostic Systems», Германия).

Определение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ).

В основе метода определения концентрации АЛТ лежала реакция обратимого переноса аминокислотной группы от аланина к 2-оксоглутарату с образованием пирувата и глутамата. Процесс трансаминирования катализировала АЛТ, активность которой определялась по скорости уменьшения NADH (в реакции с участием лактатдегидрогеназы - ЛДГ). В основе определения АЛТ в сыворотке крови лежали следующие реакции:

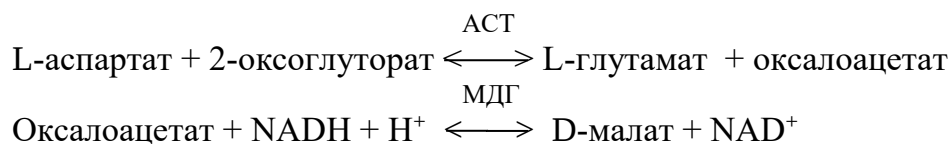


Длина волны, при которой измеряли оптическую плотность 340 нм.

Референсные значения АЛТ в сыворотке крови: для женщин до 31,0 е/л; для мужчин до 41,0 е/л.

Определение уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ).

Активность АСТ измеряли по скорости изменения оптической плотности в результате окисления NAD⁺. В основе определения АСТ в сыворотке крови лежали следующие реакции:

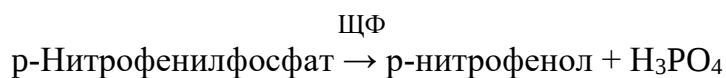


Длина волны, при которой измеряли оптическую плотность 340 нм.

Для женщин референсные значения АСТ в сыворотке крови составляли до 31,0 е/л; а для мужчин до 35,0 е/л.

Определение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ).

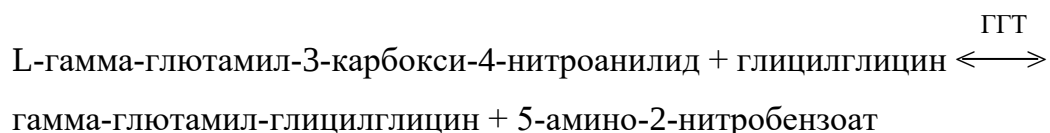
В основе определения концентрации ЩФ в сыворотке является измерение скорости гидролиза эфира фосфорной кислоты – р-нитрофенилфосфата. Скорость гидролиза р-нитрофенилфосфата прямо пропорциональна активности ЩФ в пробе при длине волны 405 нм. Уравнение реакции выглядит следующим образом:



Референсные значения ЩФ в сыворотке крови: до 258,0 е/л.

Определение уровня гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ).

Метод измерения ГГТ в сыворотке крови основан на переносе глутаминовой кислоты на глицилглицин. Активность ГГТ определяется по скорости увеличения образования 5-амино-2-нитробензоата, оптическая плотность которого измеряется при 405 нм. В основе определения ГГТ в сыворотке крови лежат следующие реакции:



Для женщин референсные значения ГГТ в сыворотке крови составили до 32,0 е/л; а для мужчин до 49,0 е/л.

Определение уровня общего белка.

В основе метода определения общего белка в сыворотке крови лежит реакция белка с раствором сульфата меди в щелочной среде с образованием фиолетово-голубого комплекса (биуретовая реакция). Белок реагирует в щелочной среде с раствором сульфата меди, содержащим тартрат (биуретовый реагент), формируя фиолетово-

голубой комплекс. Интенсивность окраски образующегося комплекса пропорциональна числу пептидных связей.

Длина волны, при которой измеряли оптическую плотность 540 нм.

Референсные значения общего белка в сыворотке крови: 66,0-88,0 г/л.

Определение уровня глюкозы.

В основе метода определения концентрации сывороточной глюкозы лежит реакция окисления глюкозы под действием пероксида водорода. Реакция Триндера приводит к образованию окрашенного индикатора хинонимина, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в пробе.

В сыворотке крови референсные значения для глюкозы: 3,9-6,4 ммоль/л.

Определение триглицеридов.

В основе метода измерения концентрации ТГ лежит образование окрашенного вещества - хинонимина при каталитическом воздействии пероксидазы. Интенсивность окраски полученной смеси прямо пропорциональна содержанию ТГ пробе, референсные значения которого в сыворотке крови равны до 2,53 ммоль/л.

Определение холестерина.

В основе метода определения содержания сывороточного холестерина лежит реакция Тридера, в результате которой образуется окрашенный раствор хинонимин из фенола при каталитическом воздействии пероксидазы. Интенсивность окраски реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе, референсные значения которого в сыворотке крови равны до 5,2 ммоль/л.

Определение липопротеинов высокой плотности (ЛПВП).

В основе методики определения ЛПВП в сыворотке крови лежит образование комплекса антиген-антитело из антител против человеческих липопротеинов, для связывания ЛПНП, и хиломикронов.

Референсные значения ЛПВП: для женщин в диапазоне 0,78 - 2,2 ммоль/л; для мужчин в диапазоне 0,78 - 1,81 ммоль/л.

Определение липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

Методика определения ЛПНП в сыворотке крови состоит из 2-ух этапов. В первом этапе липопротеины подвергаются воздействию ферментов. На втором этапе

ЛПНП освобождаются и селективно определяются с помощью цветной ферментативной реакции.

Референсные значения ЛПНП-ХС в сыворотке крови: до 3,4 ммоль/л.

Определение общего билирубина и прямого билирубина

В основе метода измерения концентрации фракции билирубина лежит в реакция общего прямого билирубина (конъюгированного с глюкоронатом) и непрямого билирубина (неконъюгированного, связанного с альбумином) с диазотированным 2,4-дихлоранилином в кислой среде. В результате образуется азосоединение красного цвета, оптическая плотность которого прямо пропорциональна концентрации общего билирубина в пробе при длине волны 546 нм.

Референсные значения общего билирубина в сыворотке крови: 1,7-21,0 мкмоль/л; прямого билирубина: до 3,4 мкмоль/л.

Определение С-реактивного белка (СРБ).

Методика определение концентрации СРБ основана на образовании комплекса антиген-антитело, оптическая плотность которого измеряется при длине волны 340 нм.

Для СРБ в сыворотке крови референсными значениями являются до 6,0 мг/л.

Определение гликированного гемоглобина

В основе методики определения гликированного гемоглобина в сыворотке крови лежит конкурентное связывание общего и гликозилированного (гликированный, HbA1c) гемоглобина с латексными частицами, что пропорционально их концентрации. Специфические мышинные антитела к HbA1c человека образуют комплекс антиген-антитело с HbA1c и вызывают агглютинацию латексных частиц. Степень агглютинации измеряют на спектрофотометре при длине волны 415 нм.

Референсные значения гликированного гемоглобина в сыворотке крови: до 6,0%.

2.3.2. Морфологическое исследование биоптатов печени

После получения биоптаты печени подвергались криозаморозке. Биоматериал хранили в дьюарах в жидком азоте при -196°C . Кусочки печени, полученные интраоперационно при инцизионной биопсии из левой доли печени, фиксировали в нейтральном забуференном формалине.

Гистологическое исследование (создание парафиновых срезов, окрашивание образцов) было проведено д.м.н., заведующей иммуногистохимической лабораторией Волковой Л.В.

Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и изучали с помощью традиционного гистологического исследования (микроскоп Leica DM3000) и полуколичественной оценки степени ожирения и воспалительного процесса.

Исследованные биоптаты содержали не менее 4-х портальных трактов и были информативными, при исследовании выявлены стеатоз печени и стеатогепатит. Стеатоз I-III степени диагностировали в зависимости от морфологических изменений печеночного ацинуса: 1) I-ой степени (умеренно выраженное очаговое средне- и крупнокапельное ожирение печеночных клеток с поражением менее 1/3 части гепатоцитов ацинуса; 2) II –ой степени (умеренно выраженное диффузное мелко-, средне-, крупнокапельное, преимущественно внутриклеточное ожирение с поражением от 1/3 до 2/3 гепатоцитов ацинуса); 3) III степени (выраженное диффузное крупнокапельное ожирение с поражением более 2/3 гепатоцитов печеночного ацинуса, иногда с проявлениями внеклеточного ожирения с образованием жировых кист). Стеатогепатит диагностировали в биоптатах с наличием воспалительного инфильтрата преимущественно в портальных трактах, иногда определялась внутридольковая клеточная инфильтрация. Дополнительно, помимо полуколичественной оценки морфологических изменений в печени, проводили оценку степени стеатоза и подсчет количества инфильтрирующих лимфоцитов с помощью исследования цифровых изображений биоптатов, полученных при сканировании гистологических срезов с помощью сканирующего микроскопа Pannoramic 250 FLASH и программного обеспечения Image–J Software.

2.3.3. Определение цитокинов в крови

Количественное определение цитокинов sLIGHT/TNFSF14, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra в крови оценивали методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman Diabetes 37-Plex Assay).

Протокол:

- В 96-луночный планшет добавляли по 50 мкл микросфер, после чего проводили отмывку буферным раствором с использованием промывочной станции (Bio-PlexPro™ WashStations, Bio-Rad, США). Промывку проводили 2 раза.
- Затем добавляли 50 мкл раствора бланка, стандартных и исследуемых образцов, в соответствующие лунки планшета. Далее проводили инкубацию планшета на мешалке при 300 об/мин в течение 30 мин в темноте и комнатной температуре. После инкубации проводили промывку планшета 3 раза.
- Затем в каждую лунку планшета добавляли 25 мкл специфических антител и инкубировали на мешалке при 300 об/мин в течение 30 мин в темноте и комнатной температуре. После инкубации проводили промывку планшета 3 раза.
- Далее в каждую ячейку планшета добавляли по 100 мкл стрептавидина-PE, который связывался с биотинилированными антителами. После чего проводили инкубацию планшета на мешалке при 300 об/мин в течение 10 мин в темноте и комнатной температуре. Затем проводили промывку планшета 3 раза.
- Затем вносили в каждую лунку по 125 мкл буфера и встряхивали на мешалке при 1100 об/мин в течение 30 сек.
- После готовый планшет помещали на платформу прибора.

На автоматическом фотометре Bio-Plex (Bio-Plex® 200 Systems, Bio-Rad, США) проводили измерение содержания исследуемых аналитов. С помощью программы Bio-Plex Manager (Bio-Rad, США) для каждого аналита были построены стандартные кривые (определяемый динамический диапазон 2-32 000 пг/мл), по которым рассчитывали концентрацию.

2.3.4. Определение уровня относительной экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК из образцов ткани печени проводили с использованием набора реагентов ExtractRNA («Евроген», Россия) по протоколу производителя.

Перед выделением каждый образец вносили в эппендорф и гомогенизировали. Далее добавляли 1000 мкл ExtractRNA и инкубировали 10-15 минут при комнатной температуре, центрифугировали (13000g, 10 минут). Полученный супернатант

аккуратно, не затрагивая осадок, переносили в чистый эппендорф. Далее 0,2 мл хлороформа добавляли в каждый эппендорф и вручную встряхивали. После чего инкубировали 3-5 минут при комнатной температуре и центрифугировали (12000g, 15 минут, 4°C). Образовавшийся верхний слой (водная фаза) переносили в новый эппендорф и добавляли 100% изопропанола объемом 0,5 мл. Полученную смесь инкубировали 10 минут при комнатной температуре и далее центрифугировали (12000g, 10 минут). Получившийся супернатант сливали из эппендорфа таким образом, чтобы осадок РНК остался на дне. После к осадку добавляли 2 мл 75% этанола и центрифугировали (максимальные обороты, 2 минуты). После этого удаляли этанол и высушивали эппендорфы на воздухе 5-7 минут. Далее каждый осадок выделенной РНК растворяли в 35 мкл деионизированной дистиллированной воде, свободной от РНКаз.

Образцы хранили при -80°C не более суток до дальнейшего использования.

Чистоту выделенной РНК определяли по отношению значений поглощения на длинах волн 260 нм и 280 нм (A260 нм/280 нм) на спектрофотометре NanoVue Plus («GE Healthcare Bio-Sciences», Швеция). Значения варьировали в диапазоне 2,7-2,9 усл.ед.

Реакция обратной транскрипции РНК

До проведения реакции обратной транскрипции образцы РНК очищали от двуцепочечных фрагментов ДНК с помощью рестрикции. После обратную транскрипцию образцов мРНК проводили с использованием набора реагентов MMLV RT kit («Евроген», Россия).

Протокол реакции обратной транскрипции РНК и синтеза коплементарной ДНК (кДНК):

- В 26 мкл выделенного образца РНК добавляли смесь из 1 мкл фермента DNase I («NEB», США) и 3 мкл реакционного буфера CurtSmart («NEB», США). Полученный раствор прогревали при 37 °C 10 минут в термоциклере CFX96 («Bio-Rad», США).
- Далее к полученной смеси добавляли 0,3 мкл 50 мМ EDTA, после чего повторяли прогрев, но при 75 °C.
- По истечению срока инкубации, полученную смесь делили на две пробирки по 15,5 мкл образца в каждую, затем к каждому образцу добавляли по 7,5 мкл олиго(dT)-праймера.

- Смесь инкубировали в термоциклере CFX96 («Bio-Rad», США) при 70°C в течение 3 минут, затем переносили образцы на лед.
- До потепления образцов в каждый эппендорф вносили по 27,5 мкл смеси, состоящей из: 10 мкл 5х буфера, 5 мкл смеси dNTP (10 мМ), 5 мкл DTT (20 мМ), 6 мкл MMLV ревертазы (250 ед) и 1,5 мкл деионизированной дистиллированной воды свободной от РНКаз. Затем реакционную смесь инкубировали амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США) в течение 60 минут при 42°C.
- Полученные образцы синтезированной кДНК хранили при -80°C не более 10 дней.

Постановка ПЦР в режиме реального времени

Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами. Матрицей для определения уровня экспрессии генов *TFAM*, *MFN2*, *BAX*, *DMN1L*, *SOD1*, *NF- κ B1* и *MT-ND4* служила тотальная РНК. Ген *RPLPO* был использован в качестве референсного гена [Vandesompele J., et al., 2002], а ген *β 2-microglobulin* - в качестве нормировочного.

С помощью базы данных NCBI (National Center for Biotechnological Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) были извлечены нуклеотидные последовательности и первичные транскрипты изучаемых генов *RPLPO*, *SOD*, *MFN2*, *MT-ND4*, *BAX*, *DMN1L*, *NF- κ B1*. В программах «Primer.3», «Oligo Analyzer», «Primer-BLAST» конструировали олигонуклеотидные праймеры для амплификации кДНК вышеперечисленных генов. Все правила при проектировании структуры праймеров были соблюдены.

Таблица 2

Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер продукта, п.н.
RPLPO	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'	20
	R: 5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'	20
	Bgl635-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-2	25
SOD1	F: 5'-CGTGGCTGTGGTGGCTTC-3'	18
	R: 5'-CGTGGTGTCTGCTGTGGT-3'	18

	FAM-5'-CCTCCCCGACCTGCCCTACGACTA-3'-BHQ-1	24
MFN2	F: 5'-CCAGCGTCCCATCCCTCT-3'	18
	R: 5'-TCCACACCACTCCTCCAACA-3'	20
	FAM-5'-ACAGGGCTCGCTACCCAGGAG-3'-BHQ-1	22
MT-ND4	F: 5'- GCTCCATCTGCCTACGACAAA -3'	21
	R: 5'- TGCGACTGTGAGTGC GTTC -3'	19
	FAM-5'- TAACAGCCATTCTCATCCAAACCCC -3'-BHQ-1	25
BAX	F: 5'-AGTAACATGGAGCTGCAGAGGA-3'	22
	R: 5'- CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGAA -3'	
	FAM-5'-TGATTGCCGCCGTGGACACAGACT-3'-BHQ-1	24
DMN1L	F: 5'-TCTGGAGGTGGTGGGGTTG-3'	19 26
	R: 5'- TGGGTTTTGATTTTTCTTCTGCTAAT -3'	
	FAM-5'-ACCAACCACAGGCAACTGGAGAGGA-3'-BHQ-1	25
NF- κ B1	F: 5'-CAGGAAGATGTGGTGGAGGA-3'	20
	R: 5'- TGGGGTGGTCAAGAAGTAGTG-3'	21
	FAM-5'-CCTTCTGGACCGCTTGGGTAACTCTGT-3'-BHQ-1	27
TFAM	F: 5'-CGCTCCCCCTTCAGTTTTGT-3'	20
	R: 5'-TACCTGCCACTCCGCCCTAT-3'	20
	FAM-5'-CGAGGTGGTTTTTCATCTGTCTTGGCA-3'-BHQ-1	26

ПЦР проводилась на амплификаторе CFX96 («BioRad», США) в объеме 25 мкл. В состав реакционной смеси входили: 4 мкл кДНК, 5 мкл 5X готовой реакционной смеси qPCRmix-HS («Евроген», Россия), 2 мкл Pr (F+R) с концентрацией 10 pM и 1 мкл флуоресцентных ТакМан зондов с концентрацией 10 pM, 13 мкл деионизованной дистиллированной воды свободной от РНКаз.

Протокол амплификации (шаг нагревания 5°C, 39 циклов): 3 минуты при 96°C; 10 секунд при 96°C; 30 секунд при 60-62°C; 15 секунд при 72°C; 5 минут 72°C.

Результаты ПЦР анализировали с помощью метода максимума второй производной (Second Derivative Maximum method) по точки Cp (Crossing point) на графике накопления ДНК по форме кривой. Расчеты уровня относительной экспрессии исследуемых генов производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации (<https://toptipbio.com/pfafl-method-qpcr/>).

2.3.5. Определение числа копий митохондриальной ДНК методом цифровой капельной ПЦР

Выделение ДНК

ДНК выделяли из ткани печени с использованием коммерческих наборов «QIAamp DNA Mini Kit» согласно протоколу производителя («QIAGEN»).

Протокол выделения ДНК:

- К образцам печени добавляли 200 мкл протеиназы К и 200 мкл Buffer AL, затем вортиксовали 15 сек. Содержимое инкубировали при 56 °С 10 минут.
- После к раствору добавляли 200 мкл Et OH 96% и вортиксовали 15 сек.
- Смесь переносили в QIAamp Spin Column и центрифугировали при 8000 обр/мин в течение 1 мин.
- Далее сливали осадок, добавляли 500 мкл AWI Buffer I и центрифугировали при 8000 обр/мин в течение 1 мин.
- После сливали осадок, добавляли 500 мкл AWI Buffer II и центрифугировали при 14000 обр/мин в течение 8 мин.
- Осадок сливали и еще раз и центрифугировали при 14000 обр/мин в течение 8 мин.
- Далее брали новый эппендорф и помещали в него колонку, добавив 200 мкл Buffer AE и инкубировали 10 минут, а после центрифугировали при 8000 обр/мин в течение 1 мин.

Концентрацию ДНК в образцах измеряли с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer на длине волны 260 нм. Качество экстрагированной ДНК определяли по соотношению поглощений на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280} > 1,8$).

Постановка цифровой капельной ПЦР

Подсчет количества копий мтДНК в расчете на 1 клетку определяли методом мультиплексной *цифровой капельной ПЦР* (цкПЦР) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System, BioRad.

Полученные образцы ДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции ApaI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) (1мкл (10U) ApaI, 5мкл 10x CutSmart® buffer, ~ 30 нг образца ДНК). Реакционную смесь инкубировали в термостате 3-4 часа при 37 °С и инактивировали при 75°С 10 мин. Рестриктаза была выбрана так, что на

амплифицируемом участке ядерной и митохондриальной ДНК не было ее сайтов рестрикции.

Компоненты самой кцПЦР реакции включали коммерческую ПЦР смесь, выбранные флуоресцентные ТакМан зонды и олигонуклеотидные праймеры. Олигонуклеотидные праймеры и ТакМан зонды, меченые флуоресцентными метками HEX и FAM, были подобраны для амплификации соответствующих участков митохондриального гена ND1 (кодирующего субъединицу 1 НАДН-дегидрогеназного комплекса) и однокопийного ядерного гена RPP30 (кодирующего рибонуклеазу P/MRP субъединицу P30).

К мультиплексной смеси кцПЦР, включающую в себя 10 мкл коммерческого 2x ddPCR MasterMix (Bio-Rad, Pleasanton, США), по 1 мкл каждого праймера (конечная концентрация 450 нМ) и FAM- и HEX меченых ТакМан зондов (конечная концентрация каждого зонда в смеси 125 нМ) добавили 8 мкл образца ДНК.

Далее, приготовленную реакционную смесь загружали в автоматический генератор капель (Bio-Rad, Pleasanton, CA), где смесь эмульсифицировалась примерно на 15–20 тысяч капель, каждая объемом приблизительно один нанолитр.

Эмульсифицированная кцПЦР смесь переносилась в стандартные 96-луночные планшеты и амплифицировалась в термоциклире (Bio-Rad T100 thermal cycler) по следующему температурному протоколу: 95 °C 10 минут, 40 циклов 94 °C 30 секунд и 53 °C 60 секунд и заключительный цикл 98 °C 10 минут.

После реакции амплификации проводилась регистрация флуоресцентных сигналов по конечной точке с использованием модуля (QX200 Droplet Reader, Bio-Rad, Pleasanton, США).

Полученные данные кцПЦР с модуля X200™ Droplet Digital™ PCR System анализировались в программе QuantaSoft (версия 1.7.4.0917).

Абсолютное количество копий мтДНК в расчете на клетку вычисляли по формуле:

$$\text{копии мтДНК на 1 клетку} = \frac{2 * \text{копии мтДНК}}{\text{ядерные копии ДНК}} \quad (1)$$

Применение новейшего метода обусловлено подсчетом абсолютной количественной оценки таргентных молекул мтДНК, что необходимо для выявления закономерностей изменения числа копий мтДНК.

2.3.6. Количественное определение белка методом Western Blotting

Выделение белков

Выделение суммарного белка из гомогенизированной ткани печени проводилось с помощью лизирующего буфера RIPA (Thermo Scientific, USA). Для предотвращения денатурации белка на 250 мкл лизирующего буфера добавляли 25 мкл коктейля протеаз Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X) (Thermo Scientific, USA) и 25 мкл 0.5M EDTA Solution (100X) (Thermo Scientific, USA). После чего проводили инкубацию образцов при +4°C в течение часа, после чего центрифугировали при +4°C со скоростью 13000g в течение 15 минут. Затем проводили забор супернатанта в новые пробирки.

Определение концентрации белка на спектрофотометре (ФОТОМЕТР КФК-3-«ЗОМЗ», ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия) с использованием коммерческого набора для количественного анализа белка Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Электрофорез белков и перенос на PVDF-мембрану

Для проведения электрофореза использовали коммерческие полиакриламидные гели (mini-PROTEAN TGX Stein-Free Gels, Bio-Rad, USA). Перед загрузкой в гели образцы прогревали при 95°C в течение 5 минут с добавлением буфера для загрузки проб Tris-Glycine SDS 2x (novex, USA) и DDT (Thermo Fisher Scientific, USA). Электрофорез проводили в течение часа при 200V. Далее «сэндвич», состоящий из губок, PVDF-мембраны и геля помещали в электрофорезную камеру для полусухого переноса Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA) на режим Turbo (2,5 A, 25V).

Инкубация PVDF-мембраны и детекция хемилюминисценции

Перед инкубацией проводили гибридизацию PVDF-мембраны в гибридизующем буфере в течение часа.

Для специфического определения белка в экспериментах были использованы следующие первичные антитела: GAPDH Monoclonal Antibody (ZG003) (Thermo Scientific, USA), DNM1L Monoclonal Antibody (OTI3F4) (Thermo Scientific, USA), NF-κβ p65 Rabbit Monoclonal Antibody (Invitrogen, USA), TFAM Mouse Monoclonal Antibody (Thermo Scientific, USA), SOD1 Mouse Monoclonal Antibody (Invitrogen, USA), MFN2 Mouse Monoclonal Antibody (Invitrogen, USA), Bax Monoclonal Antibody (2D2)

(Invitrogen, USA). С первичными антителами PVDF-мембрану инкубировали всю ночь при +4°C. Далее использовали вторичные антитела конъюгированные с пероксидазой хрена: Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Thermo Scientific, USA), Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Thermo Scientific, USA) (инкубация в течение 1 часа). После первичных и вторичных антител проводили отмывку PVDF-мембраны в отмывочном буфере 3 раза по 15 минут.

Для детекции специфических бэндов белков проводили инкубацию PVDF-мембраны в растворе ECL (Thermo Scientific, USA) в течение 3 минут, после чего детектировали хемилюминисценцию в Chemi Doc (Bio-Rad, USA) в режиме Optimal Auto-exposure.

Полученные данные анализировали с помощью программы ImageLab (Bio-Rad, USA) (Рисунок 5). На рисунке 5 в выделенной области «А» изображен пик интенсивности окрашивания белка в лунке, измеренная денситометрическим методом. Данная область автоматически подсчитывается с помощью программы ImageLab. В данном исследовании использовался показатель *Adjective Volume*, который измеряет интенсивность пика без бэкграунда. Далее продукция белков рассчитывались по следующей формуле:

$$\text{Продукция таргетного белка} = \frac{\text{Adj. Volume таргетного белка}}{\text{Adj. Volume референсного белка (GAPDH)}}$$

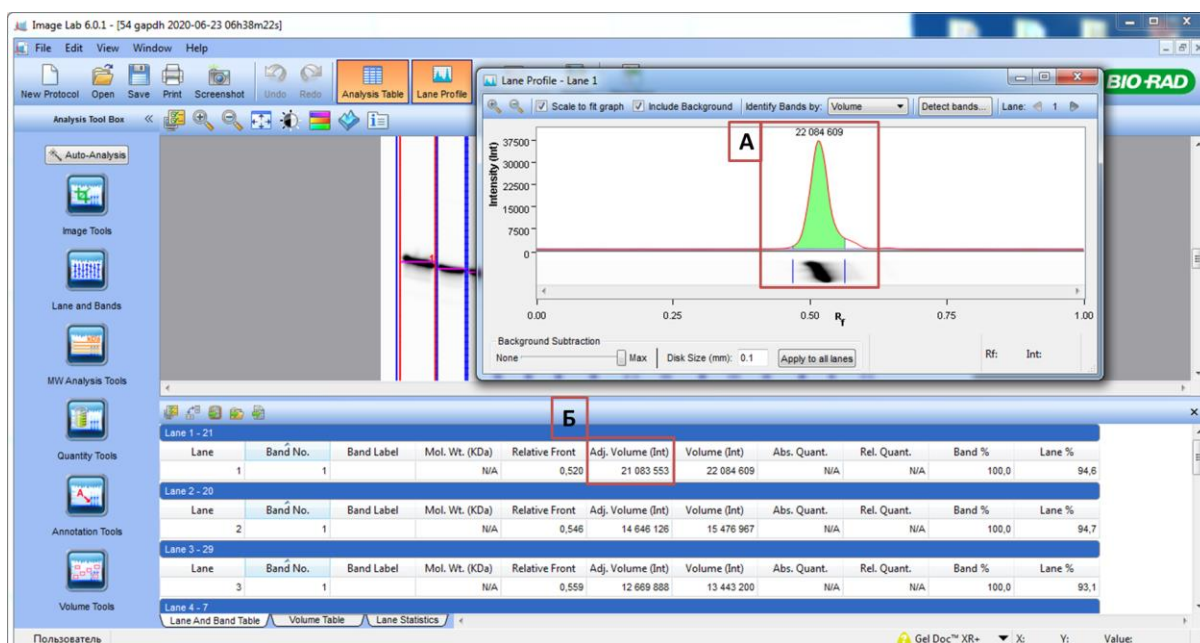


Рисунок 5. Программа анализа PVDF-мембран в программном обеспечении ImageLab. Область «А» - пик сигнала денситометрии; область «Б» - значение Adjective Volume, соответствующее пику «А» в таблице исходных данных.

2.3.7. Статистический анализ

В программе Graph Pad Prism 7 были проанализированы полученные данные эксперимента. Первоначально, все изученные параметры были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Далее в исследуемых выборках проводили проверку гипотезы о равенстве средних независимых выборочных величин с помощью t-критерия Стьюдента (при нормальном распределении данных) и критерия Манна-Уитни (при ненормальном распределении данных). Достоверными различия являлись при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ для подтверждения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Исследование биохимических параметров в крови у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него

У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа содержание АЛТ в крови превышало аналогичные значения контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3). У всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа уровень АЛТ в крови превышал значения контроля ($p < 0,001$) (Таблица 3). Содержание сывороточного АЛТ у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² выходил за рамки референсных значений и был значимо выше аналогичных параметров обеих групп больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа ($p = 0,002$ и $p = 0,014$, соответственно) и с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² ($p = 0,028$) (Таблица 3).

Таблица 3

Показатели печеночных проб исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 2; n=28)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ > 40 кг/м ² (Группа 3; n=51)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 4; n=35)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ > 40 кг/м ² (Группа 5; n=69)
АЛТ (до 31,0 е/л)	15,15 (12,25-19,80)	23,60 (16,40-27,23) $p_1 < 0,001^*$	22,00 (15,70-37,60) $p_1 < 0,001^*$	35,10 (18,10-51,00) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,002^*$ $p_3 = 0,014^*$	24,20 (14,90-40,85) $p_1 < 0,001^*$ $p_4 = 0,028^*$
АСТ (до 31,0 е/л)	18,05 (15,95-22,28)	21,05 (17,65-25,53)	23,50 (16,00-37,50) $p_1 = 0,043^*$	22,50 (17,00-37,00) $p_1 = 0,008^*$	22,60 (16,65-29,95) $p_1 = 0,007^*$
ЩФ (до 258,0 е/л)	149,50 (121,80-179,30)	170,00 (141,30-206,50) $p_1 = 0,049^*$	180,00 (155,00-206,00) $p_1 < 0,001^*$	167,00 (133,00-194,00)	192,00 (157,30-232,80) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,045^*$ $p_4 = 0,002^*$

ГГТ (до 32,0 е/л)	15,50 (13,13-19,45)	21,25 (17,50-29,38) $p_1 < 0,001^*$	28,50 (20,00-50,20) $p_1 < 0,001^*$	40,50 (22,00-61,20) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$	39,50 (28,10-56,35) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$ $p_3 = 0,006^*$
Общий белок (66,0-88,0 г/л)	79,00 (74,95-80,00)	73,85 (70,02-77,85) $p_1 = 0,004^*$	73,90 (71,10-77,40) $p_1 < 0,001^*$	72,50 (66,60-75,70) $p_1 < 0,001^*$	69,80 (65,10-74,20) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,005^*$ $p_3 < 0,001^*$
Общий билирубин (1,7-21,0 мкмоль/л)	11,34 (7,69-13,66)	10,71 (8,95-13,18)	12,05 (10,64-15,96) $p_2 = 0,028^*$	9,71 (8,20-11,59) $p_3 < 0,001^*$	10,52 (8,42-13,86) $p_3 = 0,026^*$
Прямой билирубин (до 3,4 мкмоль/л)	1,86 (1,08-3,23)	1,94 (1,00-3,14)	2,93 (2,26-3,59) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,001^*$	2,42 (0,96-2,80) $p_3 = 0,003^*$	2,52 (1,80-3,61)

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

Значения концентрации АСТ в исследуемых группах не выходили за пределы референсных значений (Таблица 3). Выявлено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² ($p=0,043$) и у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа (с ИМТ <40 кг/м² $p=0,008$ и с ИМТ >40 кг/м² $p=0,007$) уровень АСТ был значимо выше, чем в контрольной группе (Таблица 3).

Уровень ЩФ в крови во всех группах не выходил за рамки референсных значений (Таблица 3). У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа концентрация ЩФ в крови была значимо выше, чем в контрольной группе (с ИМТ <40 кг/м² $p=0,049$ и с ИМТ >40 кг/м² $p<0,001$). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² уровень сывороточной ЩФ превышал значения группы контроля ($p<0,001$) и больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ <40 кг/м² ($p=0,002$ и $p=0,045$, соответственно) (Таблица 3).

У больных НАЖБП без СД 2 типа содержание ГГТ и не выходило за пределы референсных значений, но превышало аналогичные значения контроля ($p<0,001$) (Таблица 3). У больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа уровень ГГТ выходил за рамки референсных значений и был значимо выше контроля ($p<0,001$) (Таблица 3). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² содержание ГГТ в крови было выше, чем

у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($p<0,001$) (Таблица 3). Также было выявлено превышение концентрации сывороточного ГГТ у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² в сравнении с обеими группами больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа ($p<0,001$ и $p=0,006$, соответственно).

Уровень общего белка в крови не выходил за рамки референсных значений во всех группах. У всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа/без него содержание сывороточного общего белка превышало аналогичные значения контроля ($p<0,001$) (Таблица 3). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² уровень общего белка в крови был значимо выше, чем у обеих групп больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа (с ИМТ<40 кг/м² $p=0,005$ и ИМТ>40 кг/м² $p<0,001$) (Таблица 3).

Во всех группах концентрация исследуемого показателя не выходила за пределы референсных значений. Превышение содержания общего билирубина было выявлено в крови больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² в сравнении с больными НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($p=0,028$) и обеими группами больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа (с ИМТ<40 кг/м² $p<0,001$ и ИМТ>40 кг/м² $p=0,026$) (Таблица 3).

У всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа/без него концентрация прямого билирубина варьировала в диапазоне референсных значений. Однако у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² уровень изучаемого показателя был значимо выше, чем в контроле ($p<0,001$) и у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ<40 кг/м² ($p=0,003$ и $p=0,001$, соответственно) (Таблица 3).

Концентрация сывороточного ТГ во всех группах больных НАЖБП был значимо выше в сравнении с контрольной группой ($p<0,001$) (Таблица 4). Выявлено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² значения ТГ в крови были ниже относительно больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² ($p=0,007$) и обеих групп больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа ($p=0,004$ и $p<0,001$, соответственно) (Таблица 4).

Показатели липидного обмена исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ <40 кг/м ² (Группа 2; n=28)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 3; n=51)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 4; n=35)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 5; n=69)
ТГ (до 2,53 ммоль/л)	0,67 (0,55-0,98)	1,29 (0,83-1,88) p ₁ <0,001*	1,76 (1,25-2,02) p ₁ <0,001* p ₂ =0,007*	1,84 (1,12-2,34) p ₁ <0,001* p ₂ =0,004*	1,85 (1,37-2,27) p ₁ <0,001* p ₂ <0,001*
Холестерин (до 5,2 ммоль/л)	4,83 (4,35-5,20)	4,69 (4,20-4,97)	5,09 (4,08-6,07)	5,21 (4,11-6,12)	5,14 (4,32-5,75)
ЛПВП (до 0,78-2,2 ммоль/л)	1,49 (1,23-1,92)	1,20 (0,98-1,48) p ₁ <0,001*	1,07 (0,96-1,27) p ₁ <0,001*	1,09 (0,88-1,29) p ₁ <0,001* p ₂ =0,035*	1,09 (0,94-1,27) p ₁ <0,001*
ЛПНП (до 3,4 ммоль/л)	2,72 (2,39-2,97)	2,83 (2,54-3,27)	3,09 (2,27-3,76)	3,19 (2,35-3,72)	2,90 (2,51-3,47) p ₁ =0,042*

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

Во всех группах уровень холестерина не выходил за пределы референсных значений, однако у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² показатель достигал верхних границ (Таблица 4).

Во всех исследуемых группах содержание ЛПВП в крови был значимо ниже аналогичных значений контроля (p<0,001). Также у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² концентрация сывороточного ЛПВП была значимо ниже, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² (p=0,035) (Таблица 4).

Во всех группах уровень ЛПНП не выходил за пределы референсных значений, и только у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м², концентрация сывороточного ЛПНП была значимо выше, чем в контроле ($p=0,042$) (Таблица 4).

У всех больных НАЖБП с ожирением с СД 2 типа и без него концентрация СРБ в крови была значимо выше значений контроля ($p<0,001$) (Таблица 5). Во всех исследуемых группах уровень СРБ входил в диапазон референсных значений, кроме больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² (Таблица 5). Интересно, что у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² значения сывороточного СРБ были значимо ниже, чем у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ > 40 кг/м² ($p=0,002$ и $p=0,011$, соответственно) (Таблица 5).

Таблица 5

Показатели С-реактивного белка исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 2; n=28)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ > 40 кг/м ² (Группа 3; n=51)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 4; n=35)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ > 40 кг/м ² (Группа 5; n=69)
СРБ (до 6,0 мг/л)	1,04 (0,53-2,02)	7,34 (2,64-9,02) $p_1<0,001^*$	6,95 (3,56-9,73) $p_1<0,001^*$	2,97 (1,11-6,44) $p_1=0,005^*$ $p_3=0,011^*$	7,77 (3,64-14,08) $p_1<0,001^*$ $p_4=0,002^*$

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

В целом, согласно результатам биохимического исследования, было установлено, что практически все сывороточные параметры липидного, белкового и печеночного обменов у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа/без него были выше контрольной группы. Исключением явилось снижение уровня ЛПВП в сыворотке у больных НАЖБП с ожирением и с СД 2 типа/без него по сравнению с контролем. Уровни холестерина и ЛПНП не изменялись среди исследуемых групп. Не смотря на значимость изменений в группах, в большинстве случаев исследуемые параметры не выходили за пределы референсных значений, указанных в коммерческих наборах

(DiaSys, Германия). Только у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа, сывороточные уровни АЛТ и ГГТ выходили за пределы референсных значений.

3.2. Исследование индикаторов инсулинорезистентности в крови у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него

Концентрация гликированного гемоглобина в крови во всех исследуемых группах была выше уровня контроля ($p < 0,001$) (Таблица 6). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² уровень гликированного гемоглобина составил 6,20 (5,80-6,55)% и был значимо выше, чем у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа (с ИМТ < 40 кг/м² $p = 0,005$ и с ИМТ > 40 кг/м² $p = 0,044$, соответственно) (Таблица 6). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² содержание сывороточного гликированного гемоглобина превышало аналогичные значения обеих групп больных НАЖБП без СД 2 типа ($p < 0,001$) и с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p < 0,001$) (Таблица 6).

Таблица 6

Показатели углеводного обмена исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 2; n=28)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ > 40 кг/м ² (Группа 3; n=51)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 4; n=35)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ > 40 кг/м ² (Группа 5; n=69)
Гликированный гемоглобин (до 6,00 %)	5,15 (5,00-5,30)	5,80 (5,58-6,00) $p_1 < 0,001^*$	5,80 (5,60-6,03) $p_1 < 0,001^*$	6,20 (5,80-6,55) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,005^*$ $p_3 = 0,044^*$	7,10 (6,45-8,88) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$ $p_3 < 0,001^*$ $p_4 < 0,001^*$
Глюкоза натощак (3,9-6,4 ммоль/л)	5,14 (4,91-5,35)	5,66 (4,87-6,48) $p_1 = 0,009^*$	5,12 (4,67-6,01)	6,64 (5,59-8,12) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,004^*$ $p_3 < 0,001^*$	7,30 (5,98-9,83) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$ $p_3 < 0,001^*$

Глюкоза после завтрака до 7,8 ммоль/л	5,49 (4,51-5,75)	6,42 (5,83-7,52) $p_1=0,004^*$	7,15 (5,69-8,79) $p_1<0,001^*$	8,64 (7,14-9,76) $p_1<0,001^*$ $p_2=0,016^*$	8,07 (7,05-10,53) $p_1<0,001^*$ $p_2=0,006^*$ $p_3=0,046^*$
Инсулин	45,93 (39,26-61,25)	93,42 (44,41-170,50)	134,30 (67,79-237,10) $p_1=0,003^*$	502,20 (255,70-1248,00) $p_1<0,001^*$ $p_2=0,010^*$ $p_3=0,004^*$	262,20 (134,00-530,70) $p_1<0,001^*$ $p_2=0,030^*$ $p_3=0,020^*$
НОМА-IR	6,15 (4,55-8,30)	13,11 (5,99-22,68)	19,68 (11,62-36,41) $p_1<0,001^*$	127,90 (48,77-292,50) $p_1<0,001^*$ $p_2=0,006^*$ $p_3=0,004^*$	52,00 (30,22-211,00) $p_1<0,001^*$ $p_2=0,007^*$ $p_3=0,010^*$ $p_4=0,030^*$

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Ме, Q1–Q3)

Уровень глюкозы в крови больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² был значимо выше значений контроля ($p=0,009$) (Таблица 6). У всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа содержание глюкозы превышало аналогичные значения контрольной группы ($p<0,001$) и больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа (с ИМТ<40 кг/м² $p<0,001$ и с ИМТ>40 кг/м² $p<0,001$) (Таблица 6). Уровень глюкозы в крови выходил за пределы референсных значений только у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа (Таблица 6).

Во всех исследуемых группах содержание сывороточной глюкозы после завтрака значимо превышало аналогичные значения контроля ($p<0,001$) (Таблица 6). Уровень глюкозы после завтрака в крови у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² был значимо выше, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($p=0,016$) (Таблица 6). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² концентрация глюкозы после завтрака превышала значения больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа (с ИМТ<40 кг/м² $p=0,006$ и с ИМТ>40 кг/м² $p=0,046$) (Таблица 6).

Плазменное содержание инсулина у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² и у обеих групп больных НАЖБП с СД 2 типа превышало аналогичные значения контроля ($p=0,001$) (Таблица 6). У больных НАЖБП с СД 2 типа (с ИМТ<40 кг/м² и

ИМТ>40 кг/м²) уровень инсулина в крови был значимо выше, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($p=0,010$ и $p=0,030$, соответственно) и с ИМТ>40 кг/м² ($p=0,004$ и $p=0,020$, соответственно) (Таблица 6).

У больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² индекс НОМА-IR был выше, чем в контроле ($p<0,001$). Значения индекса НОМА-IR у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа значимо превышали аналогичные значения контроля ($p<0,001$) и больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($p<0,006$ и $p=0,007$, соответственно) и с ИМТ>40 кг/м² ($p=0,004$ и $p=0,010$, соответственно) (Таблица 6). Также, у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² индекс НОМА-IR был значимо выше в сравнении с больными НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($p=0,030$) (Таблица 6).

Изменения углеводного обмена, наряду с развитием СД 2 типа у групп обследованных лиц с ожирением, были вполне ожидаемы, а именно: уровни гликированного гемоглобина, глюкозы натощак и после приема пищи были выше у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа/без него в сравнении с контролем. Однако, данные показатели выходили за пределы референсных значений только у больных НАЖБП ожирением и СД 2 типа.

3.3. Исследование экспрессии генов и продукции белков в печени у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него

У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² был выявлен более низкий уровень экспрессии *DMN1L* в печени, по сравнению с контролем ($p=0,040$) (Таблица 7). Этот факт подтверждается полученными результатами по анализу изменений продукции белка DRP1 в биоптатах печени у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа - у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа продукция белка DRP1 в печени была значимо ниже, по сравнению с аналогичными параметрами контроля ($p=0,006$) (Таблица 8).

Таблица 7

Показатели экспрессии генов и количества мтДНК в биоптатах печени
исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа	Больные	Больные	Больные	Больные

	(Группа 1; n=42)	НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ <40 кг/м² (Группа 2; n=28)	НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м² (Группа 3; n=51)	НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м² (Группа 4; n=35)	НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м² (Группа 5; n=69)
<i>DMN1L</i> усл. ед.	0,99 (0,98-1,02)	0,98 (0,93-1,04)	0,95 (0,92-1,01)	0,93 (0,91-1,06)	0,94 (0,93-1,01) $p_1=0,040^*$
<i>MFN2</i> усл. ед.	0,98 (0,94-1,09)	1,02 (0,95-1,16)	1,01 (0,95-1,08)	1,07 (0,93-1,21)	1,00 (0,94-1,10)
<i>TFAM</i> усл. ед.	0,99 (0,97-1,00)	0,93 (0,91-1,09)	0,98 (0,92-1,06)	0,93 (0,91-1,08)	0,96 (0,92-1,05)
<i>MT-ND4</i> усл. ед.	0,99 (0,97-1,00)	1,07 (1,02-1,13) $p_1=0,009^*$	1,05 (1,04-1,06) $p_1<0,001^*$	1,05 (1,04-1,06) $p_1<0,001^*$	1,07 (1,03-1,10) $p_1=0,002^*$
<i>NF-κB1</i> усл. ед.	1,00 (0,98-1,03)	0,92 (0,86-1,04)	0,90 (0,87-0,98) $p_1=0,023^*$	0,90 (0,89-1,10)	0,93 (0,89-1,05) $p_3=0,046^*$
<i>SOD1</i> усл. ед.	1,01 (0,99- 1,03)	0,96 (0,88- 1,06)	0,92 (0,89- 0,94) $p_1=0,001^*$	0,90 (0,89- 1,05)	0,91 (0,88- 0,96) $p_1=0,001^*$
<i>BAH</i> усл. ед.	0,99 (0,98-1,00)	0,89 (0,87-1,03)	0,89 (0,87-0,92) $p_1<0,001^*$	0,90 (0,88-1,05)	0,92 (0,88-1,05) $p_1=0,028^*$
Количество копий мтДНК копий мтДНК	3253 (2097- 4280)	1412 (531- 3221) $p_1=0,002^*$	711 (520-777) $p_1<0,001^*$	1390 (818,3- 2072) $p_1=0,008^*$ $p_3=0,005^*$	1035 (745- 1566) $p_1<0,001^*$ $p_3<0,001^*$

Примечание: * - значимость «р» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

Таблица 8

Показатели продукции белков в биоптатах печени исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы		
	Группа контроля (Группа 1)	Больные НАЖБП без СД 2 типа (Группа 2)	Больные НАЖБП с СД 2 типа (Группа 3)
DRP1 усл. ед.	0,68(0,01-0,73)	0,12(0,02-0,41)	0,02(0,01-0,07) $p_1=0,006^{**}$
MFN2 усл. ед.	0,212±0,147	0,241±0,159	0,182±0,117
TFAM усл. ед.	1,157±0,291	2,256±1,407	1,723±0,763
NF-κβ/p65 усл. ед.	0,06(0,05-0,35)	0,56(0,17-1,31) $p_1=0,023^{**}$	0,05(0,02-0,45)
SOD1 усл. ед.	1,603±1,350	1,609±1,208	1,350±0,709
BAX усл. ед.	0,285±0,192	0,407±0,226	0,499±0,184 $p_1=0,047^*$

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании параметрического критерия Стьюдента для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Mean±SD); ** - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

Различий в уровнях экспрессии гена *MFN2* в биоптатах печени между группами найдено не было (Таблица 7). Не смотря на отсутствие значимых различий, нами отмечена тенденция к повышению экспрессии гена *MFN2* и содержания белка *MFN2* в

печени в группах больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа/без него относительно контроля (Таблица 8).

Различий уровней экспрессии гена *TFAM* в биоптатах печени между группами обнаружено не было. Несмотря на выявленную тенденцию к снижению экспрессии гена *TFAM* по значениям медианы 75% квартиль был выше у больных ожирением, в сравнении с контролем, что подтверждается значениями содержания белка *TFAM* (Таблица 8).

Уровень экспрессии гена *MT-ND4* в биоптатах печени во всех группах исследования изменялся относительно контроля. У больных НАЖБП с ожирением без нарушений углеводного обмена уровень экспрессии гена *MT-ND4* в печени превышал значения контроля ($p=0,009$ и $p<0,001$, соответственно) (Таблица 7). У больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа уровень экспрессии гена *MT-ND4* в биоптатах печени был выше уровня контрольной группы (с ИМТ <40 кг/м² $p<0,001$, с ИМТ >40 кг/м² $p=0,002$) (Таблица 7).

Было выявлено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² уровень экспрессии гена *NF- κ B1* в биоптатах печени был значимо ниже, чем в контроле ($p=0,023$) и у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² ($p=0,046$) (Таблица 7). При этом содержание белка *NF- κ B/p65* в печени у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа было значимо выше аналогичных значений контрольной группы ($p=0,023$) (Таблица 8).

Было обнаружено, что у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ >40 кг/м² уровень экспрессии гена *SOD1* в биоптатах печени был значимо ниже контроля ($p=0,001$) (Таблица 7).

У больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ >40 кг/м² уровень экспрессии гена был значимо выше, чем в контрольной группе ($p=0,028$ и $p<0,001$, соответственно) (Таблица 7). Результаты исследования содержания белка *BAX* значимо отличались от его экспрессии. Было выявлено, что у больных НАЖБП ожирением и СД 2 типа продукция белка *BAX* в печени значимо выше, чем у контрольной группы ($p=0,047$) (Таблица 8).

Таким образом, в печени у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ >40 кг/м² уровни экспрессии генов *NF- κ B1*, *SOD1* и *BAX* были ниже, чем в контрольной группе. Экспрессия гена *MT-ND4* во всех исследуемых группах была выше по сравнению с контролем.

3.4. Исследование количества мтДНК в печени у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него

Во всех исследуемых группах количество мтДНК в печени было ниже, чем в контроле ($p<0,05$) (Таблица 7). Было обнаружено, что у всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа количество мтДНК в печени превышало аналогичные значения больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² ($p=0,005$ и $p<0,001$, соответственно) (Таблица 7). Так, количество мтДНК в биоптатах печени было ниже во всех исследуемых группах по сравнению с контролем. Интересно, что самое низкое число копий мтДНК в печени было выявлено у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м².

3.5. Исследование цитокинов в крови у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него

В группе больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² значения sTNFSF14/LIGHT в крови превышали аналогичные значения контрольной группы ($p=0,039$), больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² ($p=0,041$) и обеих групп больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа ($p=0,002$ и $p<0,001$, соответственно) (Таблица 9). Уровень плазменного sTNFSF14/LIGHT был ниже в группе больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м², чем в контроле ($p<0,001$) и в группе больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² ($p<0,001$) (Таблица 9).

Таблица 9

Содержание (пг/мл) цитокинов в плазме крови исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ <40 кг/м ² (Группа 2; n=28)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 3; n=51)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ <40 кг/м ² (Группа 4; n=35)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 5; n=69)

TNFSF14/ LIGHT пг/мл	6,32 (2,62-10,51)	7,15 (4,54-9,30)	10,47 (8,59-13,37) $p_1=0,039$ $p_2=0,041$	4,38 (1,46-6,23) $p_3=0,002$	1,50 (0,98-6,81) $p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$
IL-10 пг/мл	0,15 (0,10-0,36)	2,06 (1,24-4,43) $p_1<0,001$	2,00 (0,96-3,17) $p_1<0,001$	0,35 (0,23-0,93) $p_2=0,002$ $p_3<0,001$	0,75 (0,31-0,98) $p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$
IL-6 пг/мл	0,30 (0,19-0,36)	1,83 (1,40-2,30) $p_1<0,001$	1,42 (1,16-1,74) $p_1<0,001$	1,50 (0,60-2,17) $p_1=0,003$	1,24 (0,82-1,87) $p_1<0,001$ $p_2=0,042$ $p_3<0,001$
gp130/ sIL-6Rb пг/мл	14010,00 (11949,00- 27509,00)	35193,00 (18967,00- 37297,00) $p_1=0,008$	38963,00 (31011,00- 50681,00) $p_1<0,001$	4888,00 (4154,00- 7480,00) $p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$	4517,00 (2503,00- 5539,00) $p_1<0,001$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$
sIL-6Ra пг/мл	3119,00 (2238,00- 5756,00)	9064,00 (4751,00- 15021,00) $p_1=0,003$	10329,00 (5786,00- 13449,00) $p_1<0,001$	2380,00 (1675,00- 3723,00) $p_1=0,002$ $p_2<0,005$ $p_3<0,001$	2187,00 (1211,00- 3060,00) $p_1=0,002$ $p_2<0,001$ $p_3<0,001$

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

У всех больных НАЖБП с ожирением без нарушений углеводного обмена, содержание IL-10 в крови было значимо выше аналогичных значений контроля ($p < 0,001$) (Таблица 9). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м², концентрация плазменного IL-10 была значительно ниже аналогичных параметров, полученных у больных НАЖБП с ожирением без нарушений углеводного обмена ($p < 0,001$) (Таблица 9). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² уровень IL-10 в плазме крови превышал значения контроля ($p < 0,001$), но был ниже значений, полученных в обеих группах больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа ($p < 0,001$ во всех случаях, соответственно) (Таблица 9).

У всех больных НАЖБП с ожирением с СД 2 типа/без него, содержание плазменного IL-6 превышали контрольные цифры ($p < 0,001$) (Таблица 9). В группе больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м², уровень IL-6 в крови был ниже в сравнении с больными НАЖБП с ожирением без нарушений углеводного обмена ($p = 0,042$ с ИМТ < 40 кг/м² и $p < 0,001$ с ИМТ < 40 кг/м²) (Таблица 9).

Плазменный уровень gp130/sIL-6Rb у обеих групп больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа был выше относительно группы контроля ($p = 0,008$ и $p < 0,001$, соответственно) (Таблица 9). Напротив, у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа концентрация gp130/sIL-6Rb в крови была значимо ниже относительно контроля ($p < 0,001$) (Таблица 9). Уровень плазменного gp130/sIL-6Rb был ниже у всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа относительно больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p < 0,001$) и с ИМТ > 40 кг/м² ($p < 0,001$) (Таблица 9).

У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа плазменный уровень рецептора IL-6 (sIL-6Ra) был выше в сравнении с контролем ($p = 0,003$ и $p < 0,001$, соответственно) (Таблица 9). Однако у всех больных НАЖБП ожирением с СД 2 типа, концентрация плазменного sIL-6Ra была ниже, чем у контроля ($p < 0,002$ и $p = 0,002$, соответственно) (Таблица 9). Также, значения sIL-6Ra в крови у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа значимо уменьшались относительно групп больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² ($p < 0,001$) и с ИМТ > 40 кг/м² ($p < 0,001$) (Таблица 9).

Таким образом, по результатам исследования цитокинов в крови было выявлено, что у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа уровни sTNFSF14/LIGHT, gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra были выше относительно контроля, а у больных НАЖБП с СД 2 типа –

ниже. Плазменный уровень IL-10 и IL-6 у больных НАЖБП с ожирением и с СД 2 типа/без него был выше контроля. Интересно, что самые максимальные плазменные уровни sTNFSF14/LIGHT, gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra были зарегистрированы у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м², максимальные значения уровней IL-10 и IL-6 были найдены у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м². Самые низкие уровни sTNFSF14/LIGHT, gp130/sIL-6Rb, IL-6 и sIL-6Ra были обнаружены у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м².

3.6. Исследование гистологических препаратов печени у больных НАЖБП с ожирением и сахарным диабетом 2 типа/без него

В контрольной группе регистрировалось нормальное строение печени без признаков воспаления. Однако в контрольной группе встречался очаговый стеатоз (мелко- и среднекапельный), а также единичные липидные капли (Рисунок 6, А). В группе больных НАЖБП с ожирением без нарушений углеводного обмена наблюдался мелко-, средне- и крупнокапельный стеатоз (Рисунок 6, Б). Также у 40% были обнаружены проявления дистрофии гепатоцитов и кариолизиса (17%). Инфильтрация лимфоцитами была выявлена у 58%. При этом у 30% либо не было стеатоза, либо встречались единичные липидные капли, как в группе контроля. У всех больных НАЖБП с СД 2 типа наблюдался мелко-, средне- и крупнокапельный стеатоз (Рисунок 6, В). Практически у всех пациентов с НАЖБП наблюдалась дистрофия гепатоцитов (93,75%), у 62,5% - проявления кариолизиса. Лимфоцитарная инфильтрация была выявлена у 81,25% пациентов с НАЖБП (Рисунок 6, Г).

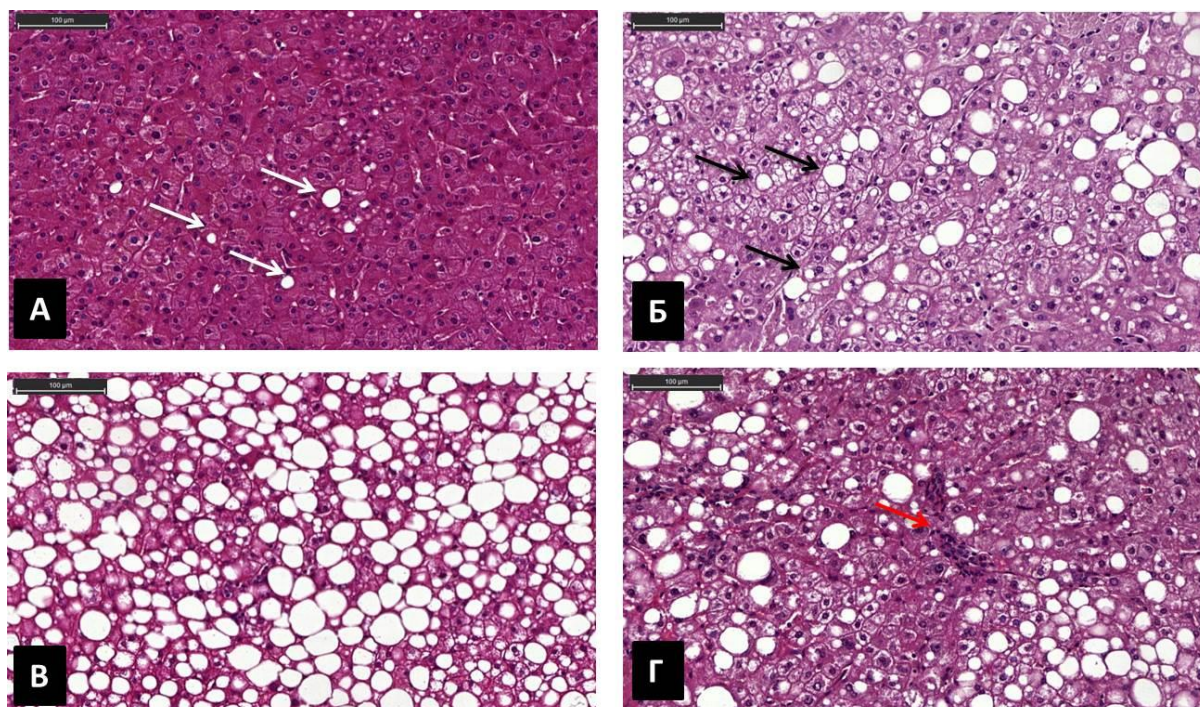


Рисунок 6. Гистологическое исследование печени. А - единичные липидные капли (обозначены белыми стрелками) в печени контрольной группы; Б - мелко-, средне- и крупнокапельный стеатоз (обозначены чёрными стрелками) печени у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа; В - стеатоз печени у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа; Г - лимфоцитарная инфильтрация печени у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа (обозначена красной стрелкой).

У больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² площадь стеатоза в биоптатах печени была значимо выше значений контроля ($p=0,030$) (Таблица 10). Также у обеих групп больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² стеатоз в печени был выше в сравнении с контролем ($p<0,001$) (Таблица 10). Стеатоз печени у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² превышал аналогичный параметр больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² ($p<0,001$) (Таблица 10). Выявлено, что у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² площадь стеатоза в биоптатах печени была значимо выше, чем у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа (с ИМТ < 40 кг/м² $p=0,003$ и с ИМТ > 40 кг/м² $p<0,001$). Таким образом, с развитием СД 2 типа площадь стеатоза в печени возрастает (Таблица 10).

Таблица 10

Показатели гистологического анализа биоптатов печени исследуемых групп

Показатели	Исследуемые группы				
	Контрольная группа (Группа 1; n=42)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ <40 кг/м ² (Группа 2; n=28)	Больные НАЖБП без СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 3; n=51)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ < 40 кг/м ² (Группа 4; n=35)	Больные НАЖБП с СД 2 типа, ИМТ >40 кг/м ² (Группа 5; n=69)
Стеатоз	3,37 (1,84-5,26)	5,16 (2,71-26,46) p ₁ =0,030*	4,10 (2,20-7,98)	22,24 (16,78-25,46) p ₁ <0,001* p ₃ <0,001*	19,17 (11,37-32,24) p ₁ <0,001* p ₂ =0,003* p ₃ <0,001*
Число лимфоцитов	-	121,00 (92,50-134,50)	75,00 (50,50-94,50) p ₂ =0,030*	98,00 (71,00-137,00)	127,00 (102,00-163,50) p ₃ <0,001*

Примечание: * - значимость «рх» определена при использовании непараметрического критерия Манна-Уитни для двух несвязанных выборок, где х-группа сравнения, (Me, Q1–Q3)

В биоптатах печени в контрольной группе лимфоциты обнаружены не были. У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² количество лимфоцитов было значимо выше, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² (p<0,001). Обнаружено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² количество лимфоцитов было выше, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² (p=0,030) (Таблица 10).

Таким образом, в результате гистологического анализа выявлено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² и всех больных НАЖБП с СД 2 типа, площадь жировых включений была выше относительно контроля. Количество лимфоцитов у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ>40 кг/м² было выше аналогичных показателей групп с ИМТ<40 кг/м². Интересно, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² площадь жировых включений и количество лимфоцитов были выше, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м².

Статистически значимые ($p < 0,05$) корреляционные взаимосвязи (r) в исследуемых группах между ИМТ, показателями углеводного обмена в крови (глюкоза, HbA1c, инсулин, HOMA-IR), уровень экспрессии генов (*TFAM*, *SOD1*, *MFN2*, *MT-ND4*, *BAX*, *NF- κ B1*, *DMN1L*) и содержание соответствующих белков в печени, концентрация цитокинов (*sTNFSF14/LIGHT*, *IL-10*, *IL-6*, *gp130/sIL-6Rb*, *sIL-6Ra*) в крови, площадь стеатоза и количество лимфоцитов в печени приведены на рисунках 7-10.

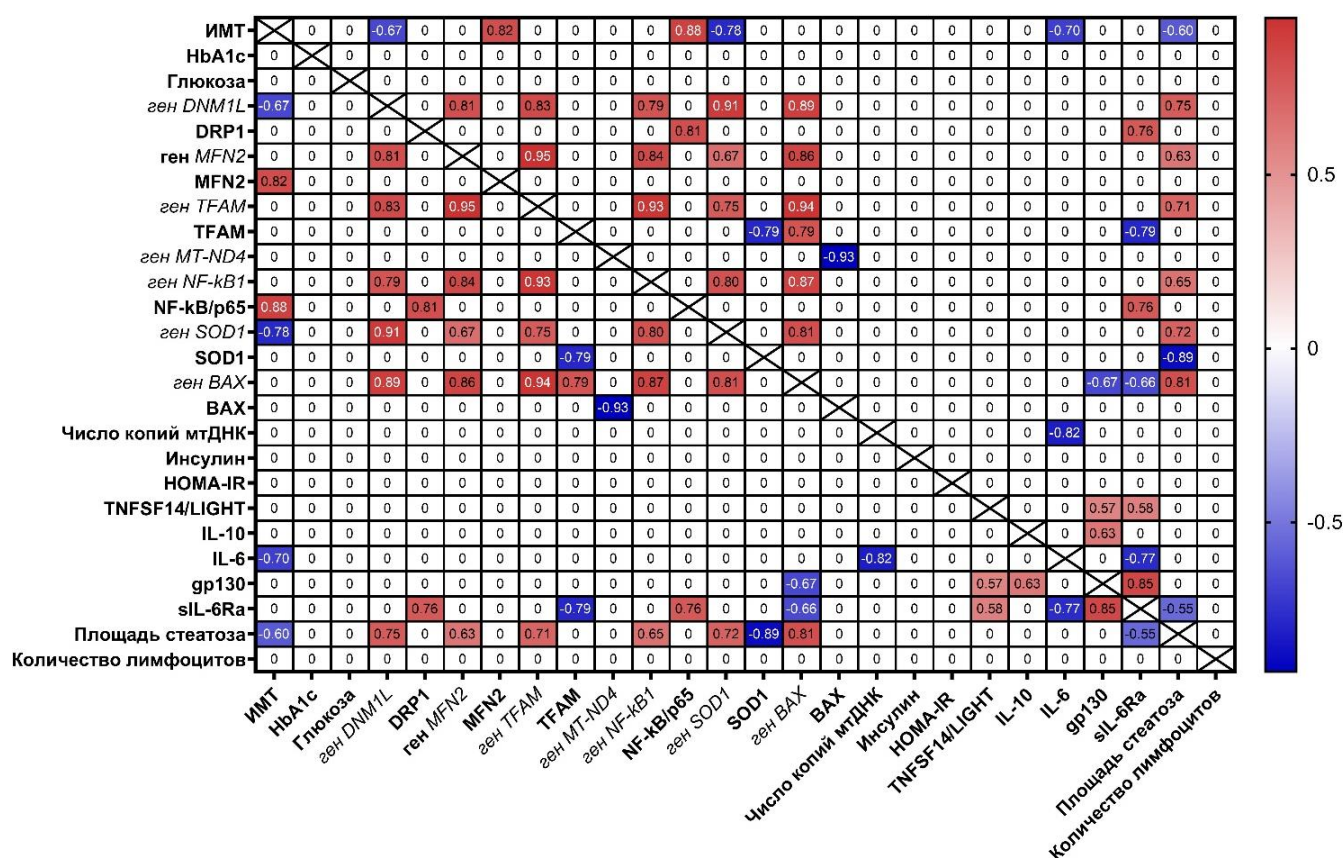


Рисунок 7. Статистически значимые ($p < 0,05$) корреляционные взаимосвязи (r) между исследуемыми параметрами у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ $< 40 \text{ кг/м}^2$.

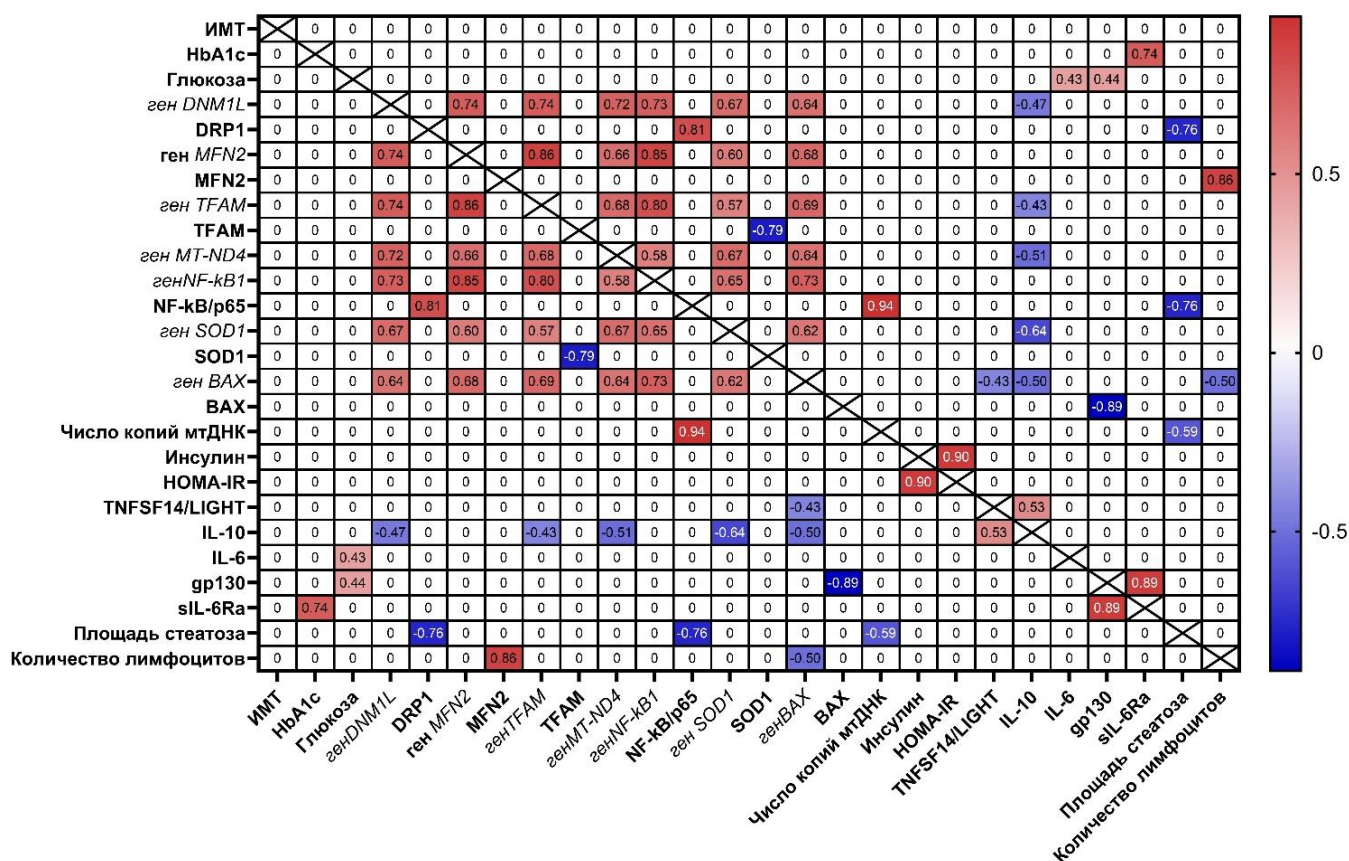


Рисунок 8. Статистически значимые ($p < 0.05$) корреляционные взаимосвязи (r) между исследуемыми у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м².

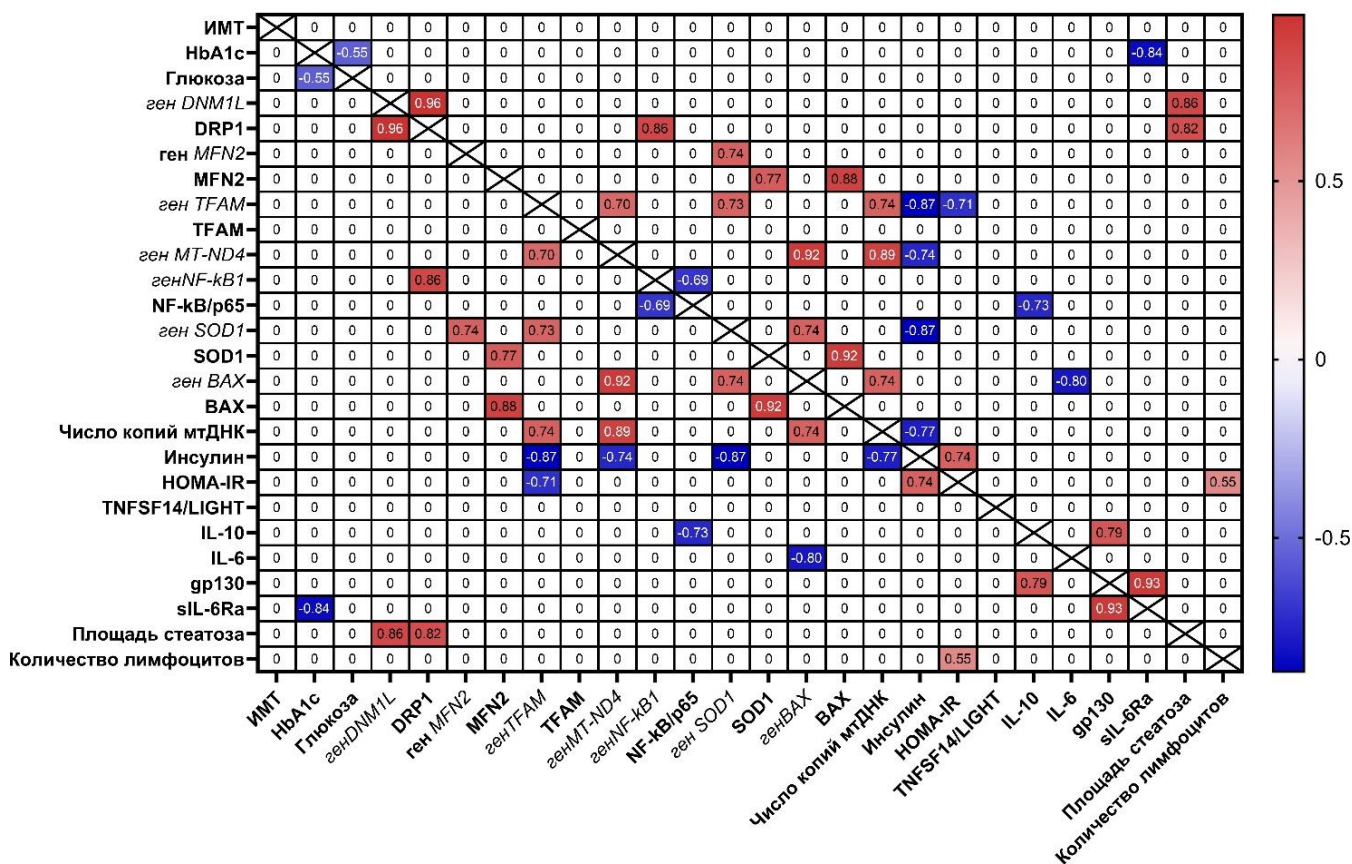


Рисунок 9. Статистически значимые ($p < 0,05$) корреляционные взаимосвязи (r) между исследуемыми у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м².

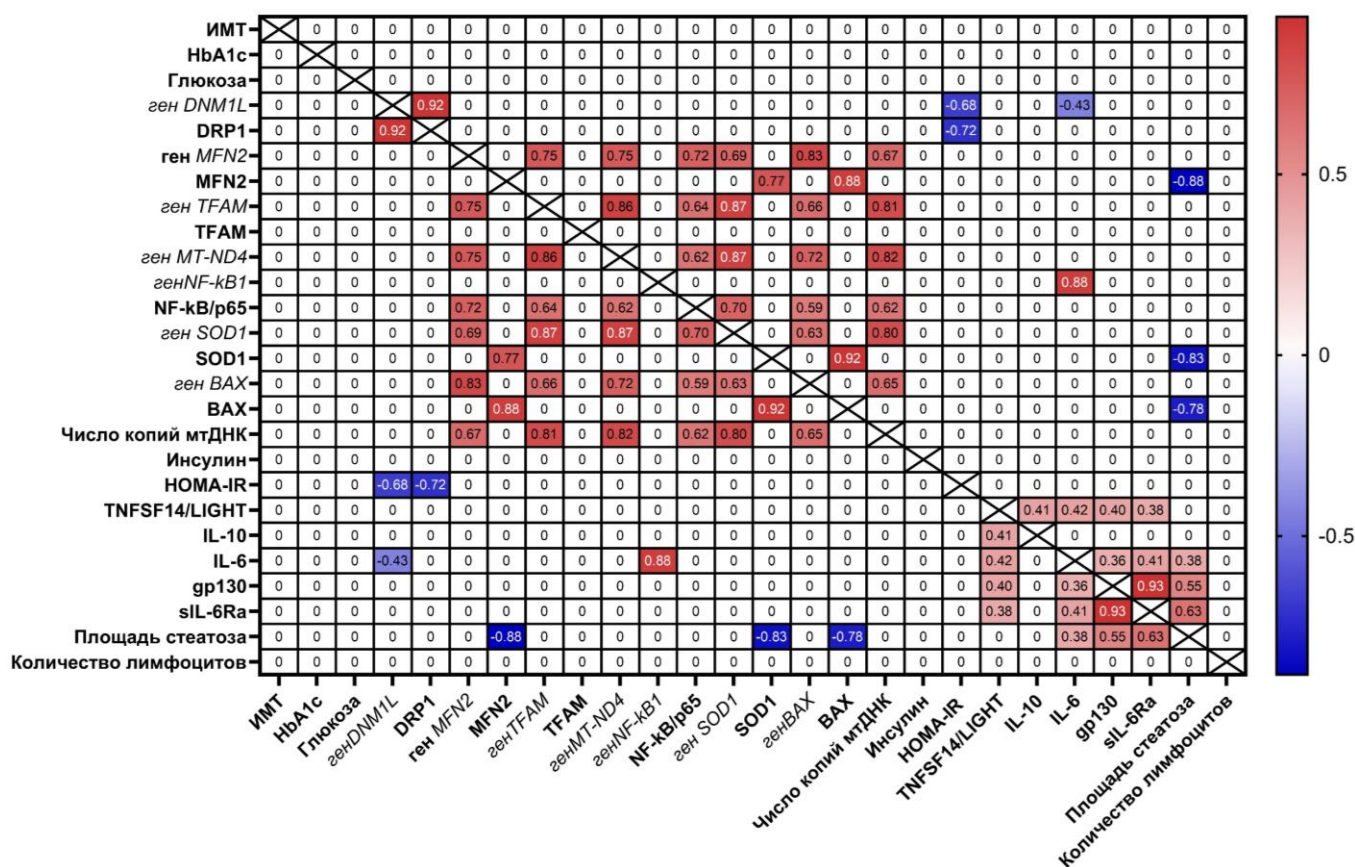


Рисунок 10. Статистически значимые ($p < 0,05$) корреляционные взаимосвязи (r) между исследуемыми у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м².

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя вышесказанное, у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа уровень глюкозы натощак и после тестового завтрака в сыворотке крови превышал диапазон референсных значений.

В ходе проведенного исследования было выявлено, что у всех больных НАЖБП с ожирением нарушена динамика митохондрий в клетках печени. Так, у всех больных НАЖБП с ожирением количество мтДНК в печени было ниже контроля. В группе больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² экспрессия гена *DRP1* в печени была ниже контрольных значений. У этой категории больных была выявлена обратная взаимосвязь экспрессии *DRP1* в печени и уровня СРБ в крови, а также содержания белка DMN1L в печени с площадью стеатоза ($r = -0,88$).

Во всех группах больных НАЖБП с ожирением было выявлено увеличение экспрессии гена *MT-ND4* относительно контрольной группы. Была также выявлена тенденция к уменьшению уровня экспрессии генов *NF-κβ*, *SOD1* и *BAX* в печени с увеличением ИМТ более 40 кг/м².

Нами выявлено, что у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа уровни gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra в крови увеличивались, а у больных СД 2 типа, напротив, уменьшались. Также во всех 5-ти группах была выявлена положительная взаимосвязь между плазменными концентрациями gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra.

У всех больных НАЖБП с ожирением регистрировалось повышение (относительно контроля) факторов: sTNFSF14/LIGHT, IL-10 и IL-6 в крови. Но у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа плазменные уровни sTNFSF14/LIGHT, IL-10 и IL-6 были ниже, чем у больных НАЖБП без СД 2 типа. Кроме того, у больных ожирением с НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² и у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² были обнаружены положительные взаимосвязи между этими тремя показателями (sTNFSF14/LIGHT, gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra).

Интересно, что в группе больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² были зарегистрированы самые низкие цифры площади стеатоза и лимфоцитарная инфильтрация в биоптатах печени. Стоит также отметить высокое содержание плазменных факторов: sTNFSF14/LIGHT, gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra у данной категории больных.

ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

НАЖБП одно из распространенных заболеваний в гепатологии [Parthasarathy G., et al., 2020; Pafili K., Roden M., 2021]. Инсулинорезистентность и окислительный стресс играют ключевую роль в патогенезе НАЖБП [Parthasarathy G. et al., 2020]. Несмотря на понимание того, как липиды накапливаются в печени, механизмы развития стеатогепатита и фиброза до сих пор мало изучены. Согласно классической гипотезе «двух ударов», НАЖБП развивается последовательно, где инсулинорезистентность («первый удар») способствует увеличению проникновению СЖК в гепатоциты [Pafili K., Roden M., 2021]. Если СЖК не метаболизируются или не секретируются надлежащим образом, развивается стеатоз печени [Simões I. C. M. et al., 2018]. «Второй удар» включает в себя развитие митохондриальной дисфункции, стресса эндоплазматического ретикулума и воспаления в гепатоцитах [Kim O.-K. et al., 2015]. Однако, классическую гипотезу сменила теория «множественных параллельных ударов» [Buzzetti E. et al., 2016]. Данная модель патогенеза подразумевает, что инсулинорезистентность, окислительный стресс и активация провоспалительных и фиброгенных путей (включая активацию клеток Купфера и звездчатых клеток печени) происходят параллельно, приводя, в итоге, к неалкогольному стеатогепатиту и фиброзу [Byrne C. D. et al., 2015].

Известно, что при НАЖБП в крови увеличивается содержание печеночных показателей: АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ, общего белка, всех фракций билирубина [Pafili K., Roden M., 2021]. В данном исследовании вышеперечисленные показатели не выходили за рамки референсных значений, однако достоверно увеличивались у всех больных НАЖБП с ожирением по сравнению с контролем (Таблица 3). У всех больных НАЖБП (кроме группы без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м²), значения суммарной площади жировых включений в гепатоцитах были выше, чем в контроле (Таблица 10). У всех пациентов с НАЖБП были обнаружены лимфоциты в ткани печени. У больных НАЖБП с ИМТ >40 кг/м² с СД 2 типа число лимфоцитов в печени превышало аналогичные показатели в группе пациентов без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м². В группе больных НАЖБП с ИМТ >40 кг/м² без СД 2 типа число лимфоцитов в печени оказалось ниже, чем у пациентов с ИМТ <40 кг/м². Таким образом, наличие СД 2 типа у пациентов с НАЖБП с морбидным ожирением связано с большим воспалением в печени.

Апоптоз гепатоцитов является механизмом прогрессирования НАЖБП [Akazawa Y., Nakao K. J., 2018]. Апоптоз способствует повреждению печени и формированию

фиброза при НАЖБП [Alkhouri N. et al., 2011; Akazawa Y., Nakao K. J., 2018]. Процесс апоптоза запускается и регулируется несколькими механизмами. Проапоптотический белок BAX относится к митохондриальному пути апоптоза. В здоровых клетках BAX локализуется в основном в цитозоле, а во время апоптоза перемещается к митохондриям и встраивается во внешнюю митохондриальную мембрану, переходя в активированную форму [Westphal D. et al., 2011]. Нами было выявлено более высокое содержание белка BAX в ткани печени у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа, чем в контроле (Таблица 8), что может вносить вклад в воспалительный процесс печени при развитии инсулинорезистентности (Таблица 10).

Однако, экспрессия гена BAX была ниже у больных НАЖБП с ИМТ >40 кг/м², независимо от состояния углеводного обмена. При НАЖБП сигналы апоптоза не всегда приводят к гибели клеток. Происходит «сублетальная» передача сигналов, при которой процесс запрограммированной смерти инициируется, но не завершается [Akazawa Y., Nakao K. J., 2018]. Эти неполные апоптотические сигналы инициируются в гепатоцитах, поражая звездчатые клетки и макрофаги, что может привести к воспалению и фиброзу [Hirsova P. et al., 2016a; Hirsova P. et al., 2016b]. Поглощение апоптотических тел звездчатыми клетками печени также стимулирует фиброгенную активность этих клеток. У больных НАЖБП с ИМТ <40 кг/м² без СД 2 типа экспрессия гена BAX положительно коррелировала с наличием стеатоза ($r=0,81$, $p<0,05$). Таким образом, незавершенный апоптотический ответ может вносить вклад в формирование стеатоза печени при ожирении у этой категории пациентов.

Как уже упоминалось ранее, при стеатозе печени точкой «невозврата» является факт развития воспаления в органе. Важным регулятором иммунных и воспалительных реакций является фактор транскрипции NF- κ B, который усиливает выработку провоспалительных цитокинов, в том числе, TNF α и IL-1 [Giridharan S. et al., 2018; Morgan M. J., Liu Z., 2011]. Активация NF- κ B при ожирении и СД 2 типа является следствием хронического воспаления, воздействия высокого уровня глюкозы (конечные продукты гликирования), СЖК и стресса эндоплазматического ретикулума [Catrysse L. et al., 2017]. Передача сигналов NF- κ B и выработка провоспалительных медиаторов в печени способствуют развитию инсулинорезистентности, тогда как активация NF- κ B в макрофагах жировой ткани необходима для распространения воспаления и обеспечения системной резистентности к инсулину в мышцах и других инсулинозависимых тканях

[Catrysse L. et al., 2017]. Нами было выявлено, что экспрессия гена *NF-κβ1* (компонент канонического сигнального пути) была снижена у больных НАЖБП с ИМТ>40 кг/м² без СД 2 типа относительно контроля и больных СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² (Таблица 7). Следовательно, при морбидном ожирении в печени снижается активность канонического пути активации NF-κβ (Рисунок 11).

Существует два пути активации сигналинга NF-κβ: канонический и неканонический [Chen Q. et al., 2021]. Канонический путь хорошо изучен и зависит от деградации Iκβ α [Sun S.-C. 2017]. Лишь немногочисленные исследования показали роль неканонического пути NF-κβ в патогенезе метаболического синдрома. Активация неканонического сигнального пути NF-κβ зависит от процессинга p100 [Sun S.-C., 2011; Tilborghs S. et al., 2017]. Киназа, индуцирующая NF-κβ (NIK), является центральным и специфическим сигнальным компонентом в неканоническом сигнальном пути NF-κβ [Mitchell S. et al., 2016; Tilborghs S. et al., 2017]. Неканоническая активация NF-κβ стимулируется членами семейства специфических рецепторов TNF (в том числе TNFSF14/LIGHT), которые передают сигнал посредством рекрутирования TRAF2 и TRAF3 [Chen Q. et al., 2021]. К ним относятся LTβR, CD40, CD27, CD30, BAFF-R, RANK и др. [Morgan M. J., Liu Z., 2011]. Постоянная деградация NIK в покоящихся клетках предотвращает активацию неканонического пути NF-κβ [Morgan M. J., Liu Z., 2011; Chen Q. et al., 2021]. NIK способен фосфорилировать и стабилизировать CREB1, фактор транскрипции, который опосредует глюконеогенез, индуцируя экспрессию ферментов глюконеогенеза (фосфоенолпируваткарбоксикиназу и глюкозо-6-фосфатазу) [Sheng L. et al., 2012], что характеризует его как протектор при развитии ИР. В литературе приводится достаточно данных о том, что NIK может выступать в качестве воспалительного медиатора в скелетных мышцах, поджелудочной железе и лимфоидных органах [Sun S.-C. et al., 2017; Meyerovich K. et al., 2018].

В нашем исследовании у больных НАЖБП без СД 2 типа было выявлено высокое содержание белка NF-κβ/p65 в печени (в сравнении с контролем) (Таблица 8), наряду с более низкими значениями лимфоцитарной инфильтрации, чем у больных НАЖБП с СД 2 типа (Таблица 10).

В подтверждение потенциальных протекторных функций неканонического пути NF-κβ, нами была выявлена отрицательная корреляция между площадью липидных капель в гепатоцитах и содержанием белка NF-κβ/p65 в ткани печени у больных

НАЖБП с ИМТ >40 кг/м² ($r=-0,76$, $p<0,05$). Кроме того, содержание белка NF- κ B/p65 в печени у всех пациентов с НАЖБП было взаимосвязано с биохимическими параметрами липидного обмена: с холестерином ($r=0,4$, $p<0,059$) и ЛПНП ($r=0,38$, $p<0,05$). Таким образом, неканонический путь активации NF- κ B оказывает влияние на липидный обмен. Вероятно, при ожирении происходит переключение активации NF- κ B с канонического на неканонический путь, который может сдерживать прогрессирование стеатоза и воспаления при НАЖБП (Рисунок 11).

Интересно, что самое низкое количество лимфоцитов в печени регистрировалось у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² (Таблица 10); нами были выявлены положительные корреляции между числом лимфоцитов в печени с холестерином ($r=0,69$, $p<0,05$) и ЛПНП ($r=0,62$, $p<0,05$) в крови. Интересен тот факт, что у этой группы больных количество лимфоцитов отрицательно коррелировало с уровнем экспрессии проапоптотического гена *BAX* в печени ($r=-0,50$, $p<0,05$) (Таблица 7). Помимо этого у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него с ИМТ >40 кг/м² были выявлены взаимосвязи между экспрессией генов *BAX* и *NF- κ B1* ($r=0,80$ и $r=0,73$, $p<0,05$, соответственно). Таким образом, снижение уровня экспрессии проапоптотического гена *BAX* и компонента канонического пути *NF- κ B1* у пациентов с морбидным ожирением связано с меньшим воспалением в печени у пациентов с НАЖБП без СД 2 типа (Рисунок 11).

Помимо повышенного накопления внутриклеточных липидов и апоптоза гепатоцитов, НАЖБП характеризуется высоким уровнем АФК в гепатоцитах и адипоцитах [Li R. et al., 2020]. В норме, клетка может эффективно удалять АФК с помощью антиоксидантных механизмов [Li R. et al., 2020]. Однако при НАЖБП повышенная продукция АФК митохондриями и снижение активности механизмов поглощения АФК (например, GSH, SOD2 и каталазы), могут усиливать эффекты окислительного стресса, за счет окисления полиненасыщенных жирных кислот, что приводит к образованию побочных продуктов альдегида, таких как 4-гидрокси-2-ноненаль и малонового диальдегида [Li R. et al., 2020]. В нашей работе мы исследовали экспрессию гена *SOD1* и содержание соответствующего белка в ткани печени. SOD1 является известным внутриклеточным антиоксидантным ферментом. Внутриклеточный SOD1 (цитозольный Cu/ZnSOD) является гомодимером (32 кДа) и локализован в основном в цитозоле, а также в межмембранном пространстве митохондрий [Fukai T.,

Ushio-Fukai M., 2011]. Значения экспрессии гена *SOD1* в печени у больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² с СД 2 типа / без него, были значимо ниже, чем в контроле (Таблица 8), что свидетельствует о снижении содержания компонента антиоксидантной защиты в зависимости от массы ЖТ ($r = -0,78$, $p < 0,05$). У больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² и с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² была обнаружена отрицательная корреляция между содержанием белка *SOD1* и площадью жировых включений в печени ($r = -0,89$ и $r = -0,79$, $p < 0,05$, соответственно). Следовательно, у больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² с СД 2 типа и без него, продукция белка *SOD1* в печени не способна компенсировать повреждения ткани органа. Также у больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² с СД 2 типа / без него снижение уровня экспрессии гена *SOD1* в биоптатах печени было взаимосвязано с низкой экспрессией гена *BAX* ($r = 0,62$ и $r = 0,64$, $p < 0,05$, соответственно) и *NF- κ B1* ($r = 0,63$ и $r = 0,65$, $p < 0,05$, соответственно). Таким образом, выявленное нами снижение экспрессии генов компонентов антиоксидантной защиты и апоптоза у пациентов с НАЖБП с морбидным ожирением, независимо от нарушений углеводного обмена, может свидетельствовать об истощении компенсаторных механизмов в печени. В связи с этим, снижение продукции белка *SOD1* в печени способно вносить вклад в развитие стеатоза при увеличении ИМТ более 40 кг/м² (Рисунок 11,12).

Изменения функций и структуры митохондрий могут критично влиять на жизнедеятельность клеток и выступать в качестве важного звена, лежащего в основе патогенеза НАЖБП [Lee J. et al., 2019; Wang J. et al., 2020]. Митохондрии - ключевые органеллы, которые играют жизненно важную роль в выработке энергии за счет глюкозы, глутамина и метаболизма липидов [Lee J. et al., 2019]. Помимо синтеза АТФ, митохондрии также играют важную роль во многих других клеточных процессах, включая расщепление жирных кислот путем β -окисления, синтез кетонных тел, окислительный катаболизм аминокислот, производство метаболитов через ЦТК и генерацию АФК [Lee K. et al., 2018; Lee J. et al., 2019; Wang J. et al., 2020]. Измененный липидный обмен и окислительный стресс при ожирении опосредуют дисфункцию митохондрий печени [Lee J. et al., 2019]. Индуцированный инсулинорезистентностью приток жирных кислот приводит к стеатозу печени и адаптивному увеличению окисления жирных кислот в митохондриях печени [Wang J. et al., 2020]. Однако метаболическая гибкость митохондрий печени со временем теряется. Исследования протеома митохондрий печени на мышинной модели НАЖБП показали, что

митохондриальные дефекты связаны с изменением количества субъединиц комплекса I [García-Ruiz I. et al., 2010]. В образцах ткани печени, полученных у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него, нами был обнаружен более высокий (относительно контроля) уровень экспрессии гена *MT-ND4*, кодирующего субъединицу Комплекса I дыхательной цепи (Таблица 7). Комплекс I является одним из нескольких ферментных комплексов, необходимых для окислительного фосфорилирования и отвечает за первый этап процесса переноса электронов от никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) к убихинону [García-Ruiz I. et al., 2010]. Вероятно, увеличение первого компонента дыхательной цепи митохондрий в печени является компенсаторным механизмом в ответ на избыточное поступление СЖК в гепатоциты (Рисунок 11,12).

Окислительный стресс в клетках, который возникает вследствие ожирения, может вызывать изменения количества мтДНК и возникновения их мутаций [Lee J. et al., 2019]. МтДНК чувствительна к окислительному повреждению, так как непосредственно примыкает к месту продукции АФК и систем репарации ДНК [Lee J. et al., 2019]. НАЖБП характеризуется как истощением мтДНК, так и повышенным уровнем 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG/окисленная форма дезоксигуанозина) [Lee J. et al., 2019; Wang J. et al., 2020].

Белок TFAM играет двойную роль для митохондрий [Chandrasekaran K. et al., 2019]. Во-первых, TFAM поддерживает количество копий мтДНК, регулируя их репликацию [Chandrasekaran K. et al., 2019]. Связанное с возрастом истощение мтДНК у человека, способствует снижению функций митохондрий и риску развития диабета 2 типа [Chandrasekaran K. et al., 2019]. Вторая роль TFAM - структурная. TFAM полностью покрывает мтДНК с образованием нуклеосомы (нуклеоидной структуры, подобной гистонам), которая также может защищать мтДНК от АФК [Chandrasekaran K. et al., 2019]. В нашем исследовании уровень экспрессии гена *TFAM* в печени значимо не изменялся, однако наблюдалась тенденция к снижению данного показателя у всех больных ожирением (Таблица 7).

Однако, содержание белка TFAM в печени, наоборот, имело тенденцию к увеличению у больных НАЖБП с СД 2 типа (Таблица 8). Было показано, что поддержание адекватного количественного соотношения TFAM и мтДНК необходимо для нормального функционирования митохондрий, поскольку изменение содержания белка TFAM может оказывать влияние на транскрипцию и репликацию мтДНК

[Chandrasekaran K. et al., 2019]. Так, небольшое увеличение уровней TFAM *in vivo* приводит к пропорциональному увеличению мтДНК [Chandrasekaran K. et al., 2019]. В подтверждение вышесказанного, уровень экспрессии гена *TFAM* коррелировал с количеством копий мтДНК в печени ($r=0,77$, $p<0,05$) у всех больных НАЖБП с ожирением.

Как и в случае с изменением копийности мтДНК, белок TFAM также вносит вклад в развитие инсулинорезистентности, что подтверждается его взаимосвязью с индексом НОМА-IR у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² ($r=0,86$, $p<0,05$). Мы предполагаем, что снижение числа копий мтДНК в печени может вносить вклад в развитие ИР.

Ранее считалось, что мтДНК у человека не защищена белками, за исключением области D-петли, однако было выявлено, что мтДНК с белками образует большие комплексы, так называемые нуклеоиды [Kang D. et al., 2007]. В связи с широкой распространенностью TFAM и его связью с мтДНК, его относят к белкам, образующих нуклеоид с мтДНК [Kang D. et al., 2007]. Вероятно, что при ожирении белок TFAM функционирует, в большей степени, как защита мтДНК от повреждающих факторов (например, АФК), нежели как фактор транскрипции, о чем свидетельствует низкое количество копий мтДНК [Kang D. et al., 2007].

Таким образом, наличие стеатоза печени у больных ожирением способствует увеличению митохондриального дыхания, что, в свою очередь, приводит к активации продукции АФК, которые не утилизируются должным образом из-за сниженной антиоксидантной защиты в ткани. Высокий уровень АФК повреждает мтДНК, снижая важные функции митохондрий в липидном обмене. Так, усиленная работа ЭТЦ (за счет увеличения экспрессии гена MT-ND4, кодирующего Комплекс I дыхательной цепи), снижение активности антиоксидантной системы (уменьшение экспрессия гена *SOD1* и продукция белка *SOD1*) и числа копий мтДНК в гепатоцитах при ожирении, способствуют прогрессированию стеатоза в печеночной паренхиме и развитию инсулинорезистентности (Рисунок 11, 12).

Наряду с биогенезом митохондрий, при ожирении наблюдается нарушение процессов деления и слияния митохондрий. Динамические изменения морфологии митохондрий необходимы для нормального функционирования клетки в изменчивых условиях [Ren L. et al., 2020]. Динамика митохондрий включает в себя непрерывное

деление и слияние, формируя динамическую сеть для поддержания их численности, морфологии, качества и функции клеток [Ren L. et al., 2020]. Деление митохондрий приводит к образованию маленьких и круглых митохондрий, а слияние - тонких и удлинённых с взаимосвязанными сетями [Ren L. et al., 2020; Shum M. et al., 2021]. Деление митохондрий необходимо для роста и деления клеток, обеспечивая достаточное количество митохондрий, поддерживая полярность клеток и способствуя устранению повреждённых митохондрий [Ren L. et al., 2020; Shum M. et al., 2021]. Напротив, слияние митохондрий позволяет осуществлять обмен и соединение митохондриального содержимого, обеспечивая достаточную энергию, облегчая окислительное повреждение и поддерживая мембранный потенциал [Ren L. et al., 2020]. У млекопитающих существует несколько белков, участвующих в делении митохондрий: белок митохондриального деления 1 (FIS1), DRP1, фактор деления митохондрий (MFF), белки митохондриальной динамики 49 кДа и 51 кДа (MiD49 и MiD51) [Li R. et al., 2020]. Деление митохондрий опосредуется привлечением DRP1 на внешнюю митохондриальную мембрану из цитоплазмы клетки. Фосфорилирование DRP1 с помощью ERK, P38-MAPK, PKA, AMPK и SIRT способствует его прикреплению на митохондрии посредством четырех рецепторов: FIS1, MFF, MiD49 и MiD51 [Li R. et al., 2020; Ren L. et al., 2020]. Фосфорилирование DRP1 по Ser637 и Ser656 ингибирует деление митохондрий, тогда как фосфорилирование DRP1 по Ser616, Ser579 и Ser600 способствует делению митохондрий [Ren L. et al., 2020; Shum M. et al., 2021]. Активные олигомеры DRP1 собираются в кольцеобразные структуры, которые дополнительно сужаются, чтобы разделить материнские митохондрии на дочерние [Li R. et al., 2020]. По завершении процесса деления, DRP1 возвращается обратно в цитоплазму [Li R. et al., 2020]. Нарушение регуляции белков, участвующих в делении митохондрий, существенно изменяет морфологию митохондрий и нарушает их функции [Horbay R. et al., 2016]. В исследованиях на модели мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, уровни белков Fis1 и Drp1 в печени снижались, что далее сопровождалось воспалением и фиброзом печени [Krishnasamy Y. et al., 2019; Li R. et al., 2020]. Однако другая группа ученых с такой же моделью НАЖБП выявила, что p53 индуцирует связанное с Drp1 деление митохондрий, что приводит к дисфункции митохондрий за счет открытия пор митохондрий (mPTP), снижения митохондриального потенциала, окислительного стресса, перегрузки кальцием и истощения АТФ [Zhou H. et

al., 2018]. Согласно полученным нами данным, у больных НАЖБП с СД 2 типа (ИМТ>40 кг/м²) уровень экспрессии гена *DMN1L* в печени был ниже контроля, что сопоставимо с содержанием белка DRP1 в печени. Были выявлены отрицательные корреляции между продукцией белка DRP1 и площадью жировых включений в печени у больных НАЖБП с СД 2 типа / без него (ИМТ>40 кг/м²) ($r=-0,88$ и $r=-0,76$, $p<0,05$, соответственно). Также у всех больных НАЖБП, вне зависимости от состояния углеводного обмена, были обнаружены отрицательные взаимосвязи экспрессии гена *DMN1L* и продукции белка DRP1 в печени с плазменным уровнем инсулина ($r=-0,57$ и $r=-0,54$, $p<0,05$, соответственно) и индексом HOMA-IR ($r=-0,83$ и $r=-0,76$, $p<0,05$, соответственно). Это демонстрирует, что прогрессия стеатоза, а также развитие инсулинорезистентности приводят к уменьшению деления митохондрий, а значит, происходит нарушение баланса динамики митохондрий при НАЖБП.

У больных НАЖБП с СД 2 типа (ИМТ>40 кг/м²) были найдены взаимосвязи между количеством белков DRP1 и SOD1 в печени ($r=0,88$, $p<0,05$). У больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² также наблюдалась тенденция к снижению деления митохондрий, ассоциированная со снижением компонента антиоксидантной системы (корреляция экспрессии гена *DMN1L* и уровня экспрессии гена *SOD1* $r=0,67$, $p<0,05$). Таким образом, снижение эффективности антиоксидантной защиты, наряду с инсулинорезистентностью при ожирении, приводит к снижению митохондриального деления в печени пациентов с НАЖБП и СД 2 типа (ИМТ>40 кг/м²) (Рисунок 12).

Воспаление также связано со снижением митохондриальной динамики. Так, у всех больных НАЖБП с ожирением снижение экспрессии гена *DMN1L* и содержания белка DRP1 было взаимосвязано с сывороточным уровнем СРБ ($r=-0,40$ и $r=-0,48$, $p<0,05$, соответственно). Было выявлено, что экспрессия гена *DMN1L* коррелировала с уровнем экспрессии компонента канонического сигнального пути *NF-κβ1* у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² ($r=0,73$, $p<0,05$), с СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² ($r=0,74$, $p<0,05$) и с ИМТ>40 кг/м² ($r=0,69$, $p<0,05$). Таким образом, снижение воспаления, ассоциированного с каноническим путем *NF-κβ*, опосредует снижение деления митохондрий.

Резюмируя вышесказанное, на состояние митохондриального деления влияет множество факторов, а именно: развитие СД 2 типа, воспаление, прогрессирование стеатоза, а также состояние антиоксидантной системы.

Слияние митохондрий в клетках млекопитающих опосредуется, в первую очередь, белками MFN1 и MFN2 [Ding M. et al., 2020]. Слияние позволяет поврежденным митохондриям с окисленными липидами, белками и мутантной митохондриальной ДНК смешиваться со здоровыми, что помогает восстановить функции митохондрий и поддерживать клеточный гомеостаз [Li R. et al., 2020]. Таким образом, слияние митохондрий является компенсаторным и защитным механизмом для исправления функциональных дефектов митохондрий в клетках млекопитающих [Simões I. C. M. et al., 2018]. Согласно полученным нами данным, у больных НАЖБП уровень экспрессии гена *MFN2* в печени не изменялся, однако наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии гена *MFN2* в печени у всех пациентов с НАЖБП с СД 2 типа / без него (Таблица 7), что сопоставимо с данными продукции белка MFN2 (Таблица 8).

Выявлено, что у всех больных НАЖБП повышенный уровень экспрессии *MFN2* взаимосвязан с показателем площади стеатоза ($r=0,68$) и количеством лимфоцитов ($r=0,29$, $p<0,05$) в печени. Также экспрессия гена *MFN2* и содержание белка MFN2 в печени были взаимосвязаны с содержанием гликированного гемоглобина ($r=0,46$ и $r=0,37$, $p<0,05$, соответственно) и уровнем глюкозы ($r=0,55$ и $r=0,30$, $p<0,05$, соответственно) крови. Интерпретируя полученные нами данные, можно сделать вывод, что процесс слияния митохондрий влияет на степень выраженности стеатоза и воспаления в печени, а также участвует в развитии инсулинорезистентности (Рисунок 11, 12).

Помимо этого, повышенные уровни экспрессии гена *MFN2* и продукции белка MFN2 коррелировали с низким количеством мтДНК в печени ($r=-0,80$ и $r=-0,69$, $p<0,05$, соответственно). Выявленные изменения являются логичными, так как при снижении деления и увеличении слияния митохондрий, количество копий мтДНК уменьшается.

Таким образом, митохондриям печени отводится основная роль в утилизации и клиренсе избыточных липидов. При ожирении возникает ситуация, когда в гепатоцитах истощаются ресурсы для переработки высокого уровня СЖК. В первую очередь, компенсаторно увеличивается дыхание митохондрий, за счет увеличения экспрессии генов дыхательного комплекса, в частности, комплекса 1 (ген *MT-ND4*), что опосредует высокий уровень АФК, за счет утечки электронов. Одной из мишеней свободных радикалов является мтДНК, что ведет к уменьшению ее копийности. Нами было выявлено, что при увеличении ИМТ более 40 кг/м², снижается активность компонента

антиоксидантной системы, способствуя уменьшению мтДНК в паренхиме печени. Все вышеперечисленные процессы ведут к увеличению образования липидных капель и инфильтрации ткани печени лимфоцитами. В итоге, динамика митохондрий при ожирении претерпевает изменения, а именно деление значительно уменьшается с ростом ИМТ и развитием инсулинорезистентности (Рисунок 11, 12).

Как уже упоминалось ранее, в патогенез ожирения и инсулинорезистентности вовлечен ряд секретируемых факторов [Braunersreuther V. et al., 2012; Niederreiter L. et al., 2018], одним из которых является TNFSF14/LIGHT [Otterdal K. et al., 2015]. TNFSF14/LIGHT передает сигнал через рецепторы - лимфотоксина- β (LT β R) и медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM) [Otterdal K. et al., 2015]. Последний высоко экспрессируется в висцеральной жировой ткани, и наряду с LT β R, в β -клетках поджелудочной железы [Saunders B. M., et al., 2018]. В настоящее время активно обсуждается роль TNFSF14/LIGHT в развитии компонентов метаболического синдрома [Bassols J. et al., 2010; Otterdal K. et al., 2015]. Было показано, что TNFSF14/LIGHT может изменять гомеостаз и функцию печени за счет уменьшения накопления воспалительных клеток и секреции воспалительных цитокинов [Herrero-Cervera A. et al., 2019]. Противовоспалительная роль TNFSF14/LIGHT была доказана в экспериментах Saunders B. M. et al. (2018), где у мышей *Tnfsf14* $-/-$, в условиях диеты с высоким содержанием жиров развивалось ожирение, непереносимость глюкозы, нарушение чувствительности к инсулину [Saunders B. M. et al., 2018]. Исследования J. Bassols et al. (2010) продемонстрировали более высокий уровень TNFSF14/LIGHT в плазме крови у пациентов с ожирением, в сравнении с контролем [Bassols J. et al., 2010]. Вышесказанное коррелирует с нашими данными, где у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа уровень sTNFSF14/LIGHT в крови повышался относительно контроля и больных НАЖБП с СД 2 типа (Таблица 9). У последних, уровень sTNFSF14/LIGHT, наоборот, был ниже, чем у группы контроля и больных НАЖБП без СД 2 типа (Таблица 9). У всех пациентов с НАЖБП с ожирением, уровень sTNFSF14/LIGHT в крови отрицательно коррелировал с концентрациями инсулина ($r=0,41$, $p<0,05$) и НОМА-IR ($r=0,65$, $p<0,05$), а также с сывороточными уровнями глюкозы ($r=-0,41$, $p<0,05$). Снижение концентрации sTNFSF14/LIGHT в крови ассоциировано с ИР. В исследовании Yanbo Kou и др. (2018) было показано, что TNFSF14/LIGHT связывается с рецептором LT β R на преадипоцитах, и, далее, может напрямую блокировать MAPK и

активацию JNK [Kou Y. et al., 2019]. Таким образом, высокий уровень sTNFSF14/LIGHT в крови способен поддерживать взаимодействие инсулина со своим рецептором через блокирование JNK в печени у больных НАЖБП без СД 2 типа (Рисунок 11).

В эксперименте В.М. Saunders и др. (2018) с использованием мышинной модели стеатоза печени, добавление TNFSF14/LIGHT вызывало увеличение содержания компонентов дыхательной цепи митохондрий (Комплексы I-IV) [Saunders B. M. et al., 2018]. В нашей работе у всех больных НАЖБП была выявлена взаимосвязь содержания sTNFSF14/LIGHT в крови с уровнем экспрессии гена *MT-ND4* в печени ($r=0,28$, $p<0,05$). Таким образом, содержание sTNFSF14/LIGHT в крови может оказывать влияние на биогенез митохондрий в печени, через воздействие на уровень экспрессии гена *MT-ND4* (Комплекс I дыхательной цепи митохондрий).

Была выявлена отрицательная взаимосвязь между концентрацией sTNFSF14/LIGHT в крови и уровнем экспрессии гена *DMN1L* ($r=-0,35$, $p<0,05$) в печени у всех пациентов с НАЖБП без СД 2 типа. В эксперименте на мезенхимальных стволовых клетках взаимодействие sTNFSF14/LIGHT и рецептора $LT\beta R$ повышал содержание Akt [Heo S.-K. et al., 2016]. При этом Akt может фосфорилировать DRP1, вызывая деление митохондрий [Kim D. I. et al., 2016]. Учитывая вышесказанное, у больных НАЖБП без СД 2 типа, sTNFSF14/LIGHT в крови может вносить вклад в процессы деления митохондрий печени, через поддержание фосфорилирование DRP1 (Рисунок 11).

Эффекты sTNFSF14/LIGHT могут быть опосредованы его взаимодействием с другими цитокинами, в частности, IL-6 и IL-10, играющими важную роль патогенезе хронических заболеваний печени. Так, в условиях дефицита TNFSF14/LIGHT, у мышей *Tnfsf14* $-/-$ развивалась инсулинорезистентность и увеличивалась продукция IL-10, тогда как синтез IL-6 в печени, напротив, был ниже в сравнении с мышами дикого типа [Saunders B. M. et al., 2018]. В подтверждение вышесказанному, была обнаружена корреляция содержания sTNFSF14/LIGHT с IL-10 в крови у всех больных НАЖБП с ИМТ >40 кг/м² ($r=0,53$ и $r=0,41$, $p<0,05$, соответственно). Следует отметить, что концентрация IL-10 в плазме крови у больных НАЖБП без СД 2 типа была значительно выше контроля и значений больных СД 2 типа (Таблица 9). IL-10 представляет собой противовоспалительный цитокин, который действует как эндогенный модулятор воспаления в нескольких тканях и органах и в различных физиологических и

патологических условиях [Cintra D. E. et al., 2008]. В исследовании на мышах с нокаутом *IL-10*, получавших диету с высоким содержанием жиров, был показан защитный эффект от стеатоза этого цитокина [Boer den M. A. M. et al., 2006]. Выявлено, что *IL-10* способствует подавлению воспаления, ингибируя синтез и действие провоспалительных цитокинов, в том числе *TNF- α* , *IL-1 β* и *IL-6*, а также снижая активацию макрофагов [Zahran W. E. et al., 2013]. У пациентов с НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² и с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м² была выявлена взаимосвязь между плазменным уровнем *IL-10* и значениями экспрессии гена *MT-ND4* в печени ($r = -0,51$ и $r = -0,73$, $p < 0,05$, соответственно), доказывая связь продукции *IL-10* и митохондриальный биогенез. Обобщая вышесказанное, снижение содержания *sTNFSF14/LIGHT* и *IL-10* в крови у больных НАЖБП и СД 2 типа играет критическую роль в прогрессировании осложнений при ожирении (Рисунок 12). Рост уровня *IL-10* может сопровождаться снижением активности биогенеза митохондрий в печени.

Также в нашем исследовании были выявлены взаимосвязи между концентрацией *sTNFSF14/LIGHT* в крови и двумя растворимыми рецепторами к *IL-6*: *IL-6Ra* и гликопротеином 130 (*gp130/sIL6-Rb*) в крови у больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² ($r = 0,58$ и $r = 0,57$, $p < 0,05$, соответственно) и у больных НАЖБП с СД 2 типа ИМТ < 40 кг/м² ($r = 0,38$ и $r = 0,40$, $p < 0,05$, соответственно; *sTNFSF14/LIGHT* и *IL-6*, $r = 0,42$, $p < 0,05$).

IL-6 является одним из основных цитокинов хронического субклинического воспаления и является молекулой с разнонаправленным действием. *IL-6* способствует развитию ИР и нарушает гомеостаз глюкозы [Bastard J. P. et al., 2000; Sarbijani H. M. et al., 2016]. Многие экспериментальные данные подтверждают способность *IL-6* усиливать ИР в гепатоцитах, в то время как результаты для адипоцитов и скелетных мышц не всегда согласуются [Qu D. et al., 2014; Rose-John S. et al., 2018]. Семейство *IL-6* регулирует процессы повреждения/регенерации печени и поддерживает баланс между регуляторными и эффекторными Т-клетками [Rose-John S. et al., 2018]. Хронические воспалительные процессы приводят к жировой инфильтрации печени и распространению очагов воспаления (клеточной инфильтрации) в паренхиме [Rose-John S. et al., 2018]. В проведенном нами исследовании, у всех больных НАЖБП уровень *IL-6* в крови был выше в сравнении с контролем (Таблица 9). Самые низкие значения *IL-6* были у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м². *IL-6* начинает синтезироваться в ответ на повреждение печени. Механизм обратной связи требует более детального

изучения. В нашем исследовании была выявлена отрицательная корреляция между уровнем IL-6 и содержанием белка BAX (у всех больных ожирением, $r=-0,34$) и с уровнем экспрессии гена *SOD1* в биоптатах печени (у больных ожирением с СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м², $r=-0,80$). Следовательно, на фоне повышения плазменного уровня IL-6, BAX-опосредованная клеточная гибель гепатоцитов снижается, однако супероксиддисмутаза не подавляет развитие стеатогепатита у пациентов с СД 2 типа.

В эксперименте Dennis K. Fix и др. (2019) было показано, что в скелетной мускулатуре мышей IL-6 передает сигналы через рецептор gp130 для активации ERK1/2 [Fix D. K. et al., 2019]. Это индуцировало экспрессию белков DRP-1 и FIS-1 [Fix D. K. et al., 2019]. В нашей работе у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² было отмечено снижение экспрессии гена *DMN1L* и содержания белка DRP-1 в печени, а также IL-6, sIL-6Ra и gp130/sIL-6Rb в крови. Вышесказанное может свидетельствовать о влиянии низких концентраций IL-6 и его растворимых рецепторов на развитие дисфункции митохондрий печени у больных НАЖБП с СД 2 типа (Рисунок 12).

Все цитокины семейства IL-6 (кроме IL-31) используют мембранный гликопротеин gp130 в качестве рецептора и последующего сигналинга [Scheller J. et al., 2011]. IL-6 связывается с IL-6R и инициирует последующую передачу сигналов посредством взаимодействия с gp130, что приводит к образованию гомодимера gp130, который включает активацию путей передачи сигнала JAK/STAT, ERK и PI3K [Scheller J. et al., 2011; Rose-John S. et al., 2018]. Существует два пути активации сигналов от IL-6: классический и транс-сигналинг [Rose-John S. et al., 2018]. Противовоспалительные и регенеративные свойства IL-6 опосредуются классическим сигнальным путем, в то время как провоспалительные реакции во многих патологических состояниях включают транс-сигнализацию [Scheller J. et al., 2011].

Классический путь активации происходит в клетках, которые экспрессируют и IL-6Ra и gp130 (макрофаги, нейтрофилы, некоторые типы Т-клеток и гепатоциты) [Scheller J. et al., 2011]. Активация клеток через растворимый комплекс sIL-6/sIL-6R, которые экспрессируют только gp130, называется транс-сигнализацией [Scheller J. et al., 2011]. Этот тип передачи сигналов расширяет спектр потенциальных мишеней для IL-6 практически до любого типа клеток из-за повсеместной экспрессии gp130 [Scheller J. et al., 2011]. Активация gp130 посредством транс-передачи сигналов имеет решающее значение для доставки лимфоцитов в очаг воспаления, контролируя экспрессию

хемокинов [Scheller J. et al., 2011; Qu D. et al., 2014; Rose-John S. et al., 2018]. У пациентов с ожирением образуются растворимые рецепторы sIL-6R α опосредуя транс-сигналинг. Плазменный уровень sIL-6R α повышался у больных НАЖБП без СД 2 типа относительно контроля и больных с СД 2 типа. Тогда как у больных НАЖБП с СД 2 типа концентрация sIL-6R α была ниже, чем в контроле (Таблица 9).

Gp130 также существует в растворимой форме, что приводит к ингибированию передачи транс-сигналов IL-6, не влияя при этом на классический тип передачи сигналов [Rose-John S. et al., 2018]. Растворимый gp130 (gp130/sIL-6Rb) обнаруживается в кровотоке здоровых людей, подавляя воспалительный эффект/ответ циркулирующего комплекса sIL-6/sIL-6R α [; Tenhumberg S. et al., 2006; Rose-John S. et al., 2018]. Нами установлено, что плазменный уровень gp130/sIL6-Rb был выше (относительно контроля) у больных НАЖБП без СД 2 типа и, напротив, ниже у больных НАЖБП с СД 2 типа. Учитывая, что у больных НАЖБП без СД 2 типа уровень gp130/sIL6-Rb в плазме крови повышен относительно других групп, мы предполагаем, что происходит ингибирование транс-сигналинга и активация классической передачи сигналов IL-6, что оказывает протекторный эффект на гепатоциты (Рисунок 11).

У больных НАЖБП с СД 2 типа уровень плазменного gp130/sIL-6Rb был ниже по сравнению с больными НАЖБП без СД 2 типа и группой контроля, что свидетельствует о преобладании транс-сигналинга. В подтверждение, у всех больных НАЖБП с СД 2 типа была найдена взаимосвязь между увеличением количества лимфоцитов в печени и уменьшением плазменных уровней gp130/sIL-6Rb и sIL-6R α ($r=-0,33$ и $r=-0,29$, $p<0,05$, соответственно). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² площадь жировых включений была взаимосвязана с уровнями IL-6 ($r=0,38$, $p<0,05$), gp130/sIL-6Rb ($r=0,55$, $p<0,05$) и sIL-6R α ($r=0,63$, $p<0,05$) в крови. Также у больных НАЖБП с СД 2 типа / без него с ИМТ <40 кг/м² были выявлены взаимосвязи между плазменными цитокинами gp130/sIL-6Rb и IL-10 ($r=0,79$ и $r=0,62$, $p<0,05$, соответственно). Таким образом, мы предполагаем, что у больных НАЖБП без СД 2 типа воспалительные реакции сдерживаются за счет высокого уровня gp130/sIL-6Rb в крови, способствуя подавлению транс-сигналинга IL-6 и усиливая классический путь IL-6, что повышает продукцию противовоспалительного IL-10 и регенерацию печени. Соответственно, при развитии инсулинорезистентности, воспаление в печени увеличивается за счет транс-сигналинга IL-6 и уменьшения плазменного gp130/sIL-6Rb (Рисунок 12).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе были изучены общие закономерности и особенности структурно-функциональных нарушений митохондрий в патогенезе НАЖБП, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа и без него. Нами выявлено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м², низкая лимфоцитарная инфильтрация в печени была ассоциирована с ростом содержания белка NF-κB/p65 (компонента неканонической активации сигнального пути NF-κB), на фоне низкого уровня экспрессии гена *NF-κB1*, что может свидетельствовать о возможных протекторных функциях неканонического NF-κB/p65 в отношении воспаления у больных НАЖБП без СД 2 типа.

Выявлено, что при увеличении ИМТ более 40 кг/м², происходит снижение уровня экспрессии гена *SOD1*, что препятствует адекватной утилизации/нейтрализации высокого уровня АФК и способствует разрушению мтДНК в печени. Выявленное нами подавление экспрессии гена проапоптотического белка *BAX* в печени приводит к снижению митохондриального пути апоптоза и увеличению площади стеатоза в органе. Однако, при развитии ИР у больных НАЖБП наблюдалось увеличение содержания белка *BAX* в печени, что, вероятно, способствует распространению воспаления. Таким образом, у пациентов с НАЖБП с ИМТ более 40 кг/м² снижен уровень экспрессии генов компонентов антиоксидантной защиты и апоптоза, что может свидетельствовать об истощении компенсаторных механизмов в печени при морбидном ожирении, независимо от развития ИР.

Резюмируя полученные данные, развитие митохондриальной дисфункции клеток печени играет важную роль в патогенезе ожирения и инсулинорезистентности. Выявлено, что при ожирении в печени увеличивается экспрессия гена *MT-ND4*, что связано с избыточным поступлением СЖК в гепатоциты. При этом нами были выявлены низкие значения числа копий мтДНК (относительно контроля), что сопровождалось тенденцией к уменьшению экспрессии гена *TFAM*. У больных НАЖБП и СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² выявлено снижение экспрессии *DMN1L* и белка *DRP1*, ответственного за деление митохондрий, при этом экспрессия гена *MFN2* и содержание белка *MFN2* (участвующего в процессе слияния митохондрий) имели тенденцию к уменьшению у всех больных НАЖБП с ожирением, вне зависимости от состояния углеводного обмена.

Все вышеперечисленные факторы позволяют говорить о критическом разобщении биогенеза и динамики митохондрий при НАЖБП у пациентов с ожирением.

В данном исследовании был изучен вклад некоторых представителей семейства IL-6, а также противовоспалительных факторов IL-10 и sLIGHT/TNFSF14 в изменение биогенеза и динамики митохондрий печени при ожирении и инсулинорезистентности. Установлено, что у больных ожирением без нарушений углеводного обмена, IL-6 оказывает протекторное действие посредством классического сигнального пути, за счет образования комплексов gp130/IL-6Ra/IL-6 (ингибирующие транс-сигналинг). Активация путей передачи сигналов JAK/STAT, ERK и PI3K посредством sIL-6 может приводить к фосфорилированию белка DRP1, поддерживая, тем самым, компенсаторное деление митохондрий в условиях избыточного поступления СЖК. Подтверждением вышесказанному явилось отсутствие изменений в динамике митохондрий у больных ожирением без СД 2 типа.

Вклад в поддержание митохондриального гомеостаза у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа вносит также высокий уровень IL-10, который запускает p38MAPK, опосредуя фосфорилирование DRP1. Кроме того, выявленный у данной категории пациентов высокий уровень sTNFSF14/LIGHT, влияет на функции митохондрий через экспрессию *MT-ND4* и *DNM1L*. Таким образом, высокие уровни IL-10 и sTNFSF14/LIGHT в крови, а также активация классического пути передачи сигналов IL-6, поддерживают жизнедеятельность митохондрий, что сдерживает повреждение печени от избытка поступающих липидов.

При развитии СД 2 типа у больных НАЖБП обнаружены низкие уровни исследуемых цитокинов в крови: sTNFSF14/LIGHT, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra, что сопровождалось прогрессированием стеатоза и стеатогепатита в печени. Низкий уровень sTNFSF14/LIGHT при СД 2 типа способен вносить вклад в развитие резистентности к инсулину, так как в норме он ингибирует JNK (активированное высоким АФК). Снижение концентрации IL-6 и его растворимых рецепторов (gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra), приводит к активации транс-сигналинга, который опосредует активацию провоспалительных реакций, что усугубляет течение стеатоза и воспаления печени.

Резюмируя вышесказанное, для больных НАЖБП без СД 2 типа характерна активация протекторных механизмов, таких как: переключение на неканонический путь NF- κ B, активация классического сигналинга IL-6, высокая продукция IL-10 и

sTNFSF14/LIGHT. При этом митохондрии клеток печени начинают активно утилизировать избыточные СЖК. Также были выявлены общие закономерности у больных НАЖБП при ИМТ более 40 кг/м², независимо от наличия/отсутствия СД 2 типа, а именно снижение экспрессии генов *SOD1* и *BAX*. При развитии СД 2 типа перечисленные выше защитные механизмы снижаются, что связано с изменением динамики митохондрий в сторону снижения деления.

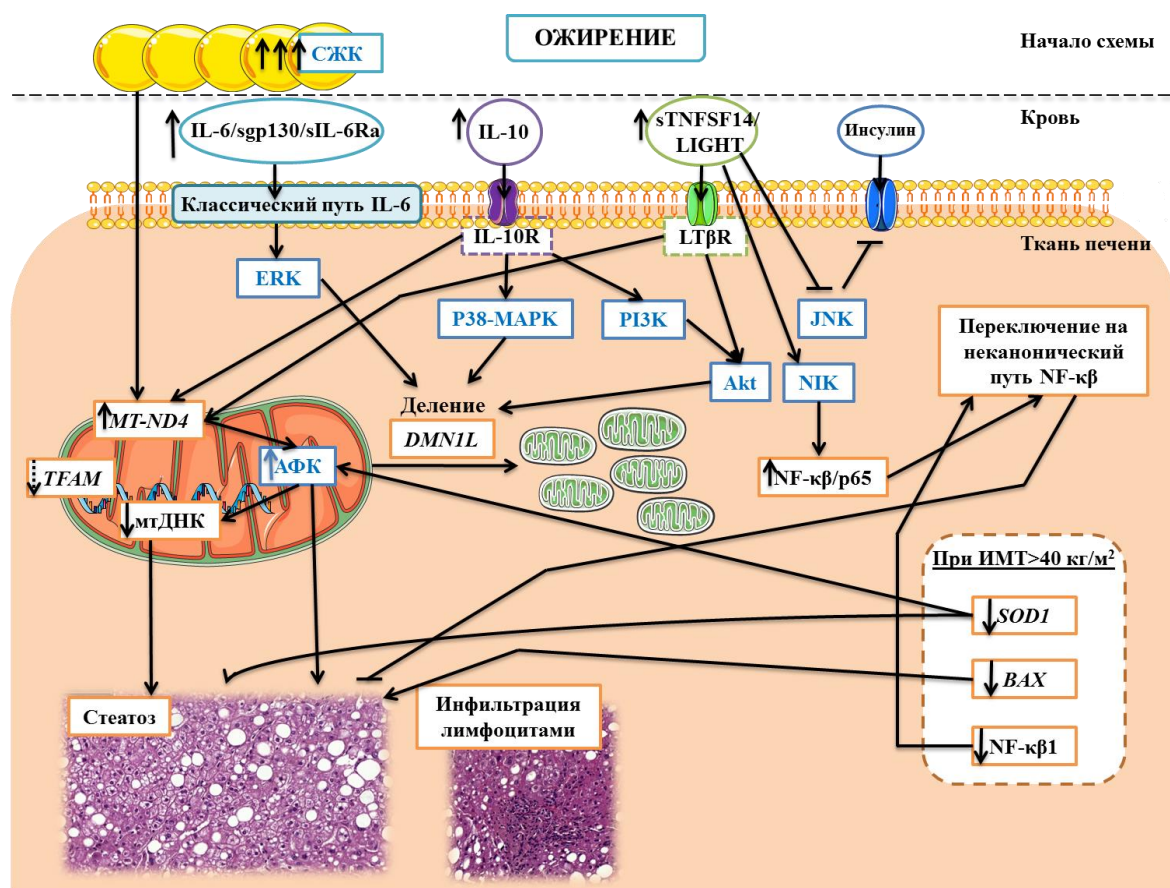


Рисунок 11. Схема, отражающая роль структурно-функциональных нарушений митохондрий клеток печени в механизмах формирования неалкогольной жировой болезни печени у больных ожирением без сахарного диабета 2 типа. Черным обозначены стрелки, отражающие результаты работы, синим контуром - данные литературы.

Так, высокие значения площади стеатоза и инфильтрация лимфоцитами в печени связаны с развитием толерантности к глюкозе. В связи с тем, что митохондриальные процессы зависят от плазменных факторов, регуляция их содержания может быть способом предотвращения развития патологических реакций при ожирении.

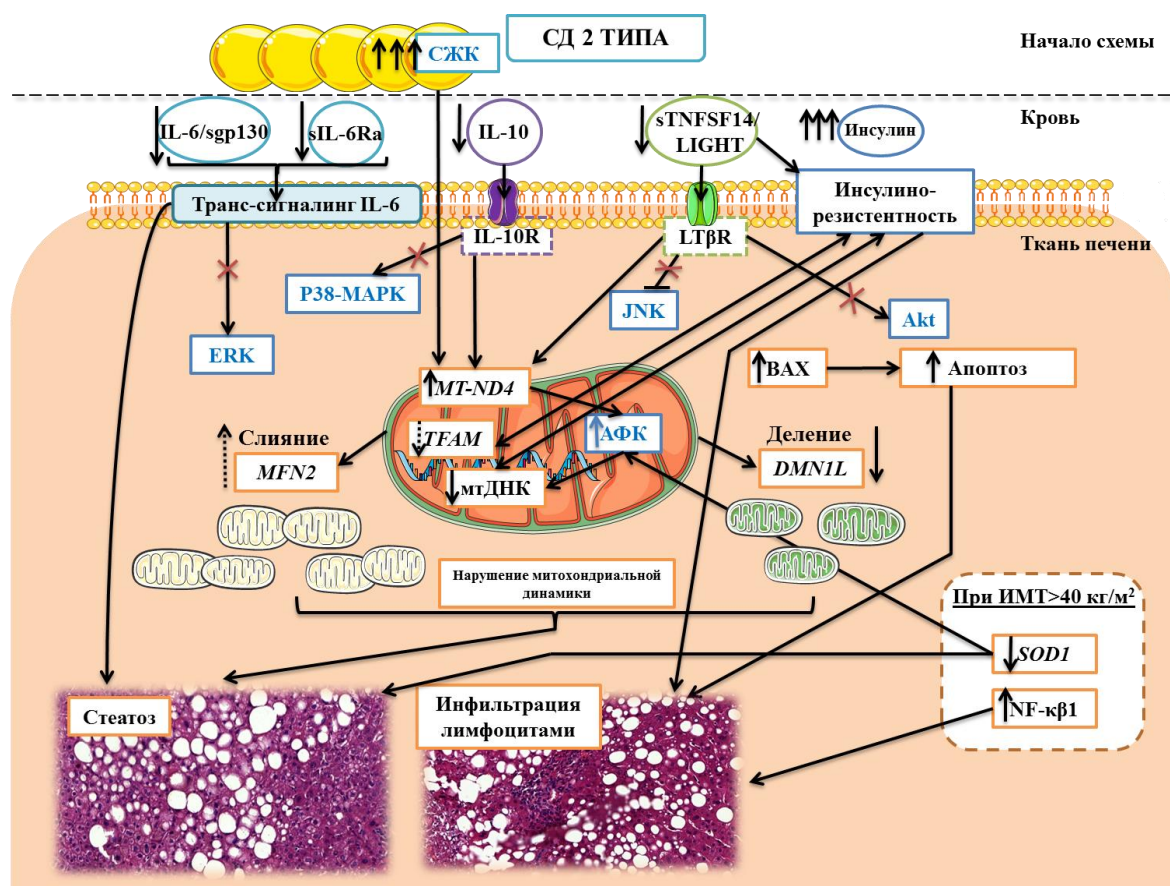


Рисунок 12. Схема, отражающая роль структурно-функциональных нарушений митохондрий клеток печени в механизмах формирования неалкогольной жировой болезни печени у больных ожирением и сахарным диабетом 2 типа. Черным обозначены стрелки, отражающие результаты работы, синим контуром - данные литературы.

ВЫВОДЫ

1. У больных неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) с ожирением и сахарным диабетом (СД) 2 типа высокая экспрессия гена *MT-ND4* (кодирует комплекс I дыхательной цепи), низкая экспрессия гена *DNM1L* (кодирует деление митохондрий) и гипопродукция белка DRP1, наряду с уменьшением числа копий мтДНК в ткани печени, сочетаются с увеличением площади стеатоза в гепатоцитах.
2. У больных НАЖБП с индексом массы тела (ИМТ) более 40 кг/м² независимо от наличия СД 2 типа увеличение площади стеатоза в гепатоцитах коррелирует с низким уровнем экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в ткани печени.
3. У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа показатели площади стеатоза и лимфоцитарной инфильтрации коррелируют с высоким содержанием белка NF- κ B/p65 и низкой экспрессией генов *NF- κ B1* и *BAX* в печени и менее выражены, чем у больных СД 2 типа.
4. Высокое содержание плазменных факторов gp130/sIL-6Rb, IL-6, IL-6RA, sTNFSF14/LIGHT и IL-10 в крови у больных НАЖБП без СД 2 типа ассоциировано с экспрессией гена *DNM1L* и содержанием белка DRP1, обеспечивающими процесс деления митохондрий.
5. У больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа низкая концентрация sTNFSF14/LIGHT в крови (по сравнению с таковой у группы контроля и больных НАЖБП без СД 2 типа) сочетается со снижением экспрессии гена *DMN1L* (кодирует деление митохондрий) и увеличением экспрессии гена *MT-ND4* (кодирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий) в ткани печени.
6. У больных ожирением нарушения структурно-функционального состояния митохондрий в клетках печени, проявляющиеся снижением экспрессии гена антиоксидантной защиты (*SOD1*), гена деления митохондрий (*DMN1L*) и копийности мтДНК в печени, увеличением экспрессии гена комплекса I дыхательной цепи (*MT-ND4*), а также низкое содержание плазменных факторов gp130/sIL-6Rb, IL-6, IL-6RA, sTNFSF14/LIGHT и IL-10 играют негативную роль в патогенезе НАЖБП, ассоциированной с СД 2 типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) [Электронный ресурс] / D. Tholey // Справочник MSD. – 2019. - Режим доступа: <https://www.msdmanuals.com>.
2. Неалкогольная жировая болезнь печени: клиника, диагностика и лечение | #02/08 | «Лечащий врач» – профессиональное медицинское издание для врачей. Научные статьи [Электронный ресурс] / С. Н. Мехтиев, В. Б. Гриневич, Ю. А. Кравчук и др. // Лежачий врач. – 2008. - Режим доступа: <https://www.lvrach.ru/2008/02/4829117>.
3. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени у пациентов амбулаторно-поликлинической практики в Российской Федерации: результаты исследования DIREG 2 / В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина, И. В. Маев и др. // Российский Журнал Гастроэнтерологии Гепатологии Колопроктологии. - 2015. - V. 25. № 6.
4. Северин, Е.С.. Биологическая химия. Учебник / Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов, С.А. Силаева. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2008. – 361 с.
5. A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance / G. Sabio, M. Das, A. Mora, et al. // Science. - 2008. - V. 322, № 5907. - P. 1539–1543.
6. Abdul-Ghani M. A. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle / M. A. Abdul-Ghani, R. A. DeFronzo. // J. Biomed. Biotechnol. - 2010. - V. 2010. - P. 476279.
7. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes / J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, et al. // Genome Biol. – 2002. – V. 3, № 7. – P. RESEARCH0034.
8. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis / C. Koliaki, J. Szendroedi, K. Kaul, et al. // Cell Metab. – 2015. – V. 21, №5. – P. 739-746.
9. Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis / C. Koliaki, J. Szendroedi, K. Kaul, et al // Cell Metab. - 2015. - V. 21, № 5. - P. 739–746.
10. Adaptation of Mitochondrial Substrate Flux in a Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease / P. Staňková, O. Kučera, E. Peterová, et al. // Int. J. Mol. Sci. - 2020. - V. 21, № 3. - P. 1101.

11. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation / S. M. Reilly, A. R. Saltiel. // *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2017. - V. 13, № 11. - P. 633–643.
12. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease / S. Stojšavljević, M. Gomerčić Palčić, L. Virović Jukić, et al. // *World J. Gastroenterol. WJG.* - 2014. - V. 20, № 48. - P. 18070–18091.
13. Akazawa Y. To die or not to die: death signaling in nonalcoholic fatty liver disease / Y. Akazawa, K. J. Nakao. // *Gastroenterol.* - 2018. - V. 53, № 8. - P. 893–906.
14. Apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease: diagnostic and therapeutic implications / N. Alkhouri, C. Carter-Kent, A. E. Feldstein. // *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* - 2011. - V. 5, № 2. - P. 201–212.
15. A β -Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis / D. I. Kim, K. H. Lee, A. A. Gabr, et al // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2016. - V. 1863, № 11. - P. 2820–2834.
16. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease / S. Bellentani. // *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* - 2017. - V. 37 Suppl 1. - P. 81–84.
17. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis / M. Blüher. // *Nat. Rev. Endocrinol.* - 2019. - V. 15, № 5. - P. 288–298.
18. Bournat J.C. Mitochondrial dysfunction in obesity / J.C. Bournat, C.W. Brown // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* – 2010. – V. 17, №5. – P. 446-452.
19. Chapter Seven - Role of mitochondria in diabetic peripheral neuropathy: Influencing the NAD⁺-dependent SIRT1–PGC-1 α –TFAM pathway / K. Chandrasekaran, M. Anjaneyulu, J. Choi, et al. // *International Review of Neurobiology Mitochondrial Dysfunction in Neurodegeneration and Peripheral Neuropathies.* - 2019. - P. 177–209.
20. Chronic Inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies / C. Luci, M. Bourinet, P. S. Leclère, et al. // *Front. Endocrinol.* - 2020. - V. 11. - P. 939.
21. Clinical and economic burden of nonalcoholic steatohepatitis in Saudi Arabia, United Arab Emirates and Kuwait / F. M. Sanai, A. Al Khathlan, A. Al Fadhli, et al. // *Hepatol. Int.* - 2021. - V. 15, № 4. - P. 912–921.
22. Clinical Model for NASH and Advanced Fibrosis in Adult Patients With Diabetes and NAFLD: Guidelines for Referral in NAFLD / J. Bazick, M. Donithan, B. A. Neuschwander-Tetri, et al. // *Diabetes Care.* - 2015. - V. 38, № 7. - P. 1347–1355.

23. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action / C. M. Taniguchi, B. Emanuelli, C. R. Kahn. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2006. - V. 7, № 2. - P. 85–96.
24. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease / D. E. Kleiner, E. M. Brunt, M. Van Natta, et al. // *Hepatology*. Baltim. Md. - 2005. - V. 41, № 6. - P. 1313–1321.
25. Distinct structural features of TFAM drive mitochondrial DNA packaging versus transcriptional activation / H. B. Ngo, G. A. Lovely, R. Phillips, et al. // *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5. - P. 3077.
26. Downregulation of TFAM inhibits the tumorigenesis of non-small cell lung cancer by activating ROS-mediated JNK/p38MAPK signaling and reducing cellular bioenergetics / D. Xie, X. Wu, L. Lan, et al. // *Oncotarget*. - 2016. - V. 7, № 10. - P. 11609–11624.
27. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease / European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). // *J. Hepatology*. - 2016. - V. 64, № 6. - P. 1388–1402.
28. Effects of melatonin on fatty liver disease: The role of NR4A1/DNA-PKcs/p53 pathway, mitochondrial fission, and mitophagy / H. Zhou, W. Du, Y. Li, et al. // *J. Pineal Res.* - 2018. - V. 64, № 1. – P. 10.1111/jpi.12450.
29. Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression / W. E. Zahran, K. A. Salah El-Dien, P. G. Kamel, et al. // *Indian J. Clin. Biochem.* - 2013. - V. 28, № 2. - P. 141–146.
30. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss / J. P. Bastard, C. Jardel, E. Bruckert, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2000. - V. 85, № 9. - P. 3338–3342.
31. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice / M. A. den Boer, P. J. Voshol, J. P. Schröder-van der Elst, et al. // *Endocrinology*. - 2006. - V. 147 № 10. - P. 4553–4558.
32. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease / S. K. Satapathy, A. J. Sanyal. // *Metabolism*. - 2016. - V. 65, № 8. - P. 1017–1025.
33. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World / M. Sayiner, A. Koenig, L. Henry, et al. // *Clin. Liver Dis.* - 2016. - V. 20, № 2. - P. 205–214.

34. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle : Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor α and Interleukin-6 / D. Bach, D. Naon, S. Pich, et al. // Diabetes. - 2005. - V. 54, № 9. - P. 2685–2693.
35. Extracellular vesicles in liver pathobiology: Small particles with big impact / P. Hirsova, S. H. Ibrahim, V. K. Verma // Hepatol. Baltim. Md. - 2016. - V. 64, № 6. - P. 2219–2233.
36. Fatty Acid and Endotoxin Activate Inflammasomes in Mouse Hepatocytes that Release Danger Signals to Stimulate Immune Cells / T. Csak, M. Ganz, J. Pespisa. // Hepatol. Baltim. Md. - 2011. - V. 54, № 1. - P. 133–144.
37. Fatty liver is associated with impaired activity of PPAR γ -coactivator 1 α (PGC1 α) and mitochondrial biogenesis in mice / M. Aharoni-Simon, M. Hann-Obercyger, S. Pen, et al. // Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. - 2011. - V. 91, № 7. - P. 1018–1028.
38. Fontes-Cal T. C. M. и др. Crosstalk Between Plasma Cytokines, Inflammation, and Liver Damage as a New Strategy to Monitoring NAFLD Progression / H. Wang, W. Mehal, L. E. Nagy, et al. // Front. Immunol. - 2021. - V. 12. - P. 3246.
39. Fukui T. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases / T. Fukui, M. Ushio-Fukai. // Antioxid. Redox Signal. - 2011. - V. 15, № 6. - P. 1583–1606.
40. Genetic inactivation of the LIGHT (TNFSF14) cytokine in mice restores glucose homeostasis and diminishes hepatic steatosis / A. Herrero-Cervera, Á. Vinué, D. J. Burks, H. González-Navarro // Diabetologia. - 2019. - V. 62, № 11. - P. 2143–2157.
41. Ginkgolide A ameliorates non-alcoholic fatty liver diseases on high fat diet mice / H. S. Jeong, K. H. Kim, I. S. Lee // Biomed. Pharmacother. - 2017. - V. 88. - P. 625–634.
42. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes / S. Tenhumberg, B. Schuster, L. Zhu, et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2006. - V. 346, № 3. - P. 649–657.
43. Gut metabolites and inflammation factors in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis / X. Pan, S. W. Wen, A. C. Kaminga, et al. // Sci Rep. - 2020. - V. 10, № 1. - P. 8848.
44. Gut microbiota influence in type 2 diabetes mellitus (T2DM) / A. L. Cunningham, J. W. Stephens, D. A. Harris. // Gut Pathog. - 2021. - V. 13, № 1. - P. 50.

45. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease / R. Meshkani, K. Adeli // *Clin. Biochem.* - 2009. - V. 42, № 13. - P. 1331–1346.
46. Hepatic Mitochondrial Defects in a Nonalcoholic Fatty Liver Disease Mouse Model Are Associated with Increased Degradation of Oxidative Phosphorylation Subunits / K. Lee, A. Haddad, A. Osme, et al. // *Mol. Cell. Proteomics MCP.* - 2018. - V. 17, № 12. - P. 2371–2386.
47. Hepatic steatosis associated with decreased β -oxidation and mitochondrial function contributes to cell damage in obese mice after thermal injury / L. Diao, C. Auger, H. Konoeda, et al. // *Cell Death Dis.* – 2018. – V. 9. – P. 530.
48. HFD and HFD-provoked hepatic hypoxia act as reciprocal causation for NAFLD via HIF-independent signaling / X. Zhang, C. Huang, X. Li, et al. // *BMC Gastroenterol.* - 2020. - V. 20, № 1. - P. 366.
49. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression / B. Keith, R. S. Johnson, M. C. Simon // *Nat. Rev. Cancer.* - 2011. - V. 12, № 1. - P. 9–22.
50. Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children / D. E. Kleiner, H. R. Makhlof // *Clin. Liver Dis.* - 2016. - V. 20, № 2. - P. 293–312.
51. Hypoxia exacerbates nonalcoholic fatty liver disease via the HIF-2 α /PPAR α pathway / J. Chen, H. Fu, Y. Li, et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* - 2019. - V. 317, № 4. - P. E710–E722.
52. Hypoxia-inducible factor 2 α drives nonalcoholic fatty liver progression by triggering hepatocyte release of histidine-rich glycoprotein / E. Morello, S. Sutti, B. Foglia, et al. // *Hepatology*. Baltim. Md. - 2018. - V. 67, № 6. - P. 2196–2214.
53. IL-6 in diabetes and cardiovascular complications / D. Qu, J. Liu, C. W. Lau, et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 2014. - V. 171, № 15. - P. 3595–3603.
54. Immunity as a link between obesity and insulin resistance / N. S. Kalupahana, N. Moustaid-Moussa, K. J. Claycombe // *Mol. Aspects Med.* - 2012. - V. 33, № 1. - P. 26–34.
55. Increased Adipocyte O₂ Consumption Triggers HIF-1 α Causing Inflammation and Insulin Resistance in Obesity / K. Lee, A. Haddad, A. Osme, et al. // *Cell.* - 2014. - V. 157, № 6. - P. 1339–1352.

56. Increased Serum Levels of LIGHT/TNFSF14 in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Possible Role in Hepatic Inflammation / K. Otterdal, J. W. Haukeland, A. Yndestad, et al. // Clin. Transl. Gastroenterol. - 2015. - V. 6, № 7. - P. e95.
57. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B / L. Catrysse, G. van Loo. // Trends Cell Biol. - 2017. - V. 27, № 6. - P. 417–429.
58. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease / E. Bugianesi, S. Moscatiello, M. F. Ciaravella, G. Marchesini. // Curr. Pharm. Des. - 2010. - V. 16, № 17. - P. 1941–1951.
59. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver / D. E. Cintra, J. R. Pauli, E. P. Araújo, et al. // J. Hepatol. - 2008. - V. 48, № 4. - P. 628–637.
60. Lean non-alcoholic fatty liver disease (Lean-NAFLD): a major cause of cryptogenic liver disease / B. Vos, C. Moreno, N. Nagy, et al. // Acta Gastro-Enterol. Belg. - 2011. - V. 74, № 3. - P. 389–394.
61. LIGHT (TNFSF14) Increases the Survival and Proliferation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells / S. K. Heo, E. K. Noh, G. D. Gwon, et al. // PloS One. - 2016. - V. 11, № 11. - P. e0166589.
62. LIGHT is associated with hypertriglyceridemia in obese subjects and increased cytokine secretion from cultured human adipocytes / J. Bassols, J. Moreno-Navarrete, F. Ortega, et al. // Int. J. Obes. - 2010. - V. 34, № 1. - P. 146–156.
63. LIGHT/TNFSF14 signaling attenuates beige fat biogenesis / Y. Kou, Q. Liu, W. Liu, et al. // FASEB J. - 2019. - V. 33, № 2. - P. 1595–1604.
64. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance / M. J. A. Saad, A. Santos, P. O. Prada // Physiol. Bethesda Md. - 2016. - V. 31, № 4. - P. 283–293.
65. Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis / P. Hirsova, S. H. Ibrabim, G. J. Gores, H. Malhi // J. Lipid Res. - 2016. - V. 57, № 10. - P. 1758–1770.
66. Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity / O. K. Kim, W. Jun, J. Lee // Ann. Nutr. Metab. - 2015. - V. 67, № 4. - P. 218–227.

67. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies / S. L. Friedman, B. A. Neuschwander-Tetri, M. Rinella, A. J. Sanyal. // *Nat. Med.* - 2018. - V. 24, № 7. - P. 908–922.
68. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation / S. Giridharan, M. Srinivasan // *J. Inflamm. Res.* - 2018. - V. 11. - P. 407–419.
69. Metabolic Inflammation—A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? / N. Gehrke, J. M. Schattenberg. // *Gastroenterology*. - 2020. - V. 158, № 7. - P. 1929- 1947.e6.
70. Metabolic Regulation of Adipose Tissue Macrophage Function in Obesity and Diabetes / M. Appari, K. M. Channon, E. McNeill. // *Antioxid. Redox Signal.* - 2018. - V. 29, № 3. - P. 297–312.
71. Metabolomic Identification of Subtypes of Nonalcoholic Steatohepatitis / C. Alonso, D. Fernández-Ramos, M. Varela-Rey, et al. // *Gastroenterology*. - 2017. - V. 152, № 6. - P. 1449- 1461.e7.
72. Mitochondria and T2D: Role of Autophagy, ER Stress, and Inflammasome / M. Rocha, N. Apostolova, R. Diaz-Rua, et al. // *Trends Endocrinol Metab.* – 2020. – V. 31, №10. – P. 725-741.
73. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease / I. Simões, A. Fontes, P. Pinton, et al.// *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2018. - V. 95. - P. 93–99.
74. Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease / I.C.M. Simões, A. Fontes, P. Pinton, et al. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2018. – V. 95. – P. 93-99.
75. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet / D. Sergi, N. Naumovski, L. K. Heilbronn, et al. // *Front. Physiol.* - 2019. - V. 10. - P. 532.
76. Mitochondrial Adaptation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Novel Mechanisms and Treatment Strategies / N. E. Sunny, F. Bril, K. Cusi // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2017. - V. 28, № 4. - P. 250–260.
77. Mitochondrial complex I subunits are decreased in murine nonalcoholic fatty liver disease: implication of peroxynitrite / I. García-Ruiz, D. Fernández-Moreira, P. Solís-Muñoz, et al. // *J. Proteome Res.* - 2010. - V. 9, № 5. - P. 2450–2459.

78. Mitochondrial dynamics during cell cycling / R. Horbay, R. Bilyy // *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death.* - 2016. - V. 21, № 12. - P. 1327–1335.
79. Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells / L. Ren, X. Chen, X. Chen, et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2020. - V. 8. - P. 1133.
80. Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease and alcohol related liver disease / P. Prasun, I. Ginevic, K. Oishi // *Transl Gastroenterol Hepatol.* – 2021. – V.6, №4.
81. Mitochondrial dysfunction in obesity / A. H. de Mello, A. B. Costa, J. D. G. Engel, G. T. Rezin. // *Life Sci.* - 2018. - V. 192. - P. 26–32.
82. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis / M. V. Pinti, G. K. Fink, Q. A. Hathaway, et al. // *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* - 2019. - V. 316, № 2. - P. E268–E285.
83. Mitochondrial Dysfunction is a Key Pathway that Links Saturated Fat Intake to the Development and Progression of NAFLD / H. Yki-Järvinen, P. K. Luukkonen, L. Hodson, et al. // *Mol. Nutr. Food Res.* - 2021. - V. 65, № 1. - P. 1900942.
84. Mitochondrial fusion promoter restores mitochondrial dynamics balance and ameliorates diabetic cardiomyopathy in an optic atrophy 1-dependent way / M. Ding, C. Liu, R. Shi, et al. // *Acta Physiol. Oxf. Engl.* - 2020. - V. 229, № 1. - P. e13428.
85. Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver / S. Satapati, B. Kucejova, J. A. Duarte, et al. // *J. Clin. Invest.* - 2015. - V. 125, № 12. - P. 4447–4462.
86. Mitochondrial oxidative function in NAFLD: Friend or foe? / M. Shum, J. Ngo, O. S. Shirihai, et al. // *Mol. Metab.* - 2021. - V. 50. - P. 101134.
87. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions / D. Kang, S. H. Kim, N. Hamasaki // *Mitochondrion.* - 2007. - V. 7, № 1. - P. 39–44.
88. Modulation of Insulin Resistance in Nonalcoholic Fatty Liver Disease / R. S. Khan, F. Bril, K. Cusi, P. N. Newsome // *Hepatology.* - 2019. - V. 70, № 2. - P. 711–724.
89. Molecular biology of Bax and Bak activation and action / D. Westphal, G. Dewson, P. E. Czabotar, et al. // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* - 2011. - V. 1813, № 4. - P. 521–531.

90. Molecular insights into the role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease / J. Lee, J. S. Park, Y. S. Roh, et al. // Arch. Pharm. Res. -2019. - V. 42, № 11. - P. 935–946.
91. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease / D. H. Ipsen, J. Lykkesfeldt, P. Tveden-Nyborg // Cell. Mol. Life Sci. - 2018. - V. 75, № 18. - P. 3313–3327.
92. Morgan M. J. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling / M. J. Morgan, Z. Liu // Cell Res. - 2011. - V. 21, № 1. - P. 103–115.
93. Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism? / D. J. Fazakerley, J. R. Krycer, A. L. Kearney, et al. // J. Lipid Res. - 2019. - V. 60, № 10. - P. 1720–1732.
94. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease / J. Wang, W. He, P.J. Tsai, et al. // *Lipids Health Dis.* – 2020. – V. 19, № 72.
95. NAFLD: a multisystem disease / C. D. Byrne, G. Targher. // J. Hepatol. - 2015. - V. 62, № 1 Suppl. - P. S47-64.
96. NAFLD: Reporting Histologic Findings in Clinical Practice / E. M. Brunt, D. E. Kleiner, D. H. Carpenter, et al. // Hepatol. Baltim. Md. - 2021. - V. 73, № 5. - P. 2028–2038.
97. Nassir F. Role of mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease / F. Nassir, J.A. Ibdah // *Int J Mol Sci.* – 2014. – V.15, №5. – P. 8713-8742.
98. NEFA-induced ROS impaired insulin signalling through the JNK and p38MAPK pathways in non-alcoholic steatohepatitis / W. Gao, X. Du, L. Lei, H. J. Wang, et al. // Cell. Mol. Med. - 2018. - V. 22, № 7. - P. 3408–3422.
99. NF- κ B-inducing kinase (NIK) promotes hyperglycemia and glucose intolerance in obesity by augmenting glucagon action / L. Sheng, Y. Zhou, Z. Chen, et al. // Nat. Med. - 2012. - V. 18, № 6. - P. 943–949.
100. Niederreiter L. Cytokines and fatty liver diseases / L. Niederreiter, H. Tilg // Liver Res. - 2018. - V. 2, № 1. - P. 14–20.
101. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) – pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters / E. Cobbina, F. Akhlaghi. // Drug Metab. Rev. - 2017. - V. 49, № 2. - P. 197–211.

102. Nonalcoholic fatty liver disease / P. Angulo. // *N. Engl. J. Med.* - 2002. - V. 346, № 16. - P. 1221–1231.
103. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations / S. Milić, D. Lulić, D. Štimac // *World J. Gastroenterol. WJG.* - 2014. - V. 20, № 28. - P. 9330–9337.
104. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States / Z. M. Younossi, M. Stepanova, F. Negro, et al. // *Medicine (Baltimore).* - 2012. - V. 91, № 6. - P. 319–327.
105. Non-alcoholic fatty liver disease in mice with hepatocyte-specific deletion of mitochondrial fission factor / Y. Takeichi, T. Miyazawa, S. Sakamoto, et al. // *Diabetologia.* - 2021. – V. 64, № 9. – P. 2092-2107.
106. Nonalcoholic steatohepatitis: histologic features and clinical correlations with 30 blinded biopsy specimens / E. M. Brunt, B. A. Neuschwander-Tetri, D. Oliver, et al. // *Hum. Pathol.* - 2004. - V. 35, № 9. - P. 1070–1082.
107. Noncanonical NF- κ B Signaling Pathway in Liver Diseases / Q. Chen, X. Lu, X. J. Zhang. // *Clin. Transl. Hepatol.* - 2021. - V. 9, № 1. - P. 81–89.
108. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics / S. A. Polyzos, J. Kountouras, C. S. Mantzoros // *Metabolism.* - 2019. - V. 92. - P. 82–97.
109. Obesity and overweight [Electronic resource] // World Health Organization. – 2021. - Mode of access: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
110. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation // *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* - 2000. - V. 894. - P. i–xii, 1–253.
111. Olefsky J. M. Macrophages, inflammation, and insulin resistance / J. M. Olefsky, C. K. Glass // *Annu. Rev. Physiol.* - 2010. - V. 72. - P. 219–246.
112. Pafili K. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans / K. Pafili, M. Roden. // *Mol. Metab.* - 2021. - V. 50. - P. 101122.
113. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: An Overview / G. Parthasarathy, X. Revelo, H. Malhi // *Hepatol. Commun.* - 2020. - V. 4, № 4. - P. 478–492.

114. Petersen M. C. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance / M. C. Petersen, G. I. Shulman // *Physiol. Rev.* - 2018. - V. 98, № 4. - P. 2133–2223.
115. Postic C. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice / C. Postic, J. Girard // *J. Clin. Invest.* - 2008. - V. 118, № 3. - P. 829–838.
116. Regulation of Skeletal Muscle DRP-1 and FIS-1 Protein Expression by IL-6 Signaling / D. K. Fix, B. N. VanderVeen, B. R. Counts, J. A. Carson. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* - 2019. - V. 2019. - P. 8908457.
117. Retinoic acid ameliorates high-fat diet-induced liver steatosis through sirt1 / C. Geng, H. Xu, Y. Zhang, Y. Gao, et al. // *Sci. China Life Sci.* - 2017. - V. 60, № 11. - P. 1234–1241.
118. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease / V. Brauersreuther, G. L. Viviani, F. Mach, F. Montecucco. // *World J. Gastroenterol. WJG.* - 2012. - V. 18, № 8. - P. 727–735.
119. Role of mitochondrial depolarization and disrupted mitochondrial homeostasis in non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice / Y. Krishnasamy, M. Gooz, L. Li, et al. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* - 2019. - V. 11, № 5. - P. 190–204.
120. Role of mitochondrial quality control in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease / R. Li, S. Toan, H. Zhou // *Aging.* - 2020. - V. 12, № 7. - P. 6467–6485.
121. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines / S. Rose-John // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2018. - V. 10, № 2.
122. Santoleri D. Resolving the Paradox of Hepatic Insulin Resistance / D. Santoleri, P. M. Titchenell // *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* - 2019. - P. 7, № 2. - P. 447–456.
123. Schrepfer E. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism / E. Schrepfer, L. Scorrano // *Mol. Cell.* - 2016. - V. 61, № 5. - P. 683–694.
124. Screening for Nonalcoholic Steatohepatitis in Individuals with Type 2 Diabetes: A Cost-Effectiveness Analysis / K. E. Corey, M. J. Klebanoff, A. C. Tramontano, et al. // *Dig. Dis. Sci.* - 2016. - V. 61, № 7. - P. 2108–2117.
125. Shetty A. Health and Economic Burden of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in the United States and Its Impact on Veterans / A. Shetty, W.-K. Syn // *Fed. Pract.* - 2019. - V. 36, № 1. - P. 14–19.

126. Shining LIGHT on the metabolic role of the cytokine TNFSF14 and the implications on hepatic IL-6 production / B. M. Saunders, C. Rudnicka, A. Filipovska, et al. // *Immunol. Cell Biol.* - 2018. - V. 96, № 1. - P. 41–53.
127. Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: a mini-review / L. Zeng, W. J. Tang, J. J. Yin, et al. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* - 2014. - V. 7, № 7. - P. 1624–1631.
128. Signaling via the NF κ B system / S. Mitchell, J. Vargas, A. Hoffmann // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* - 2016. - V. 8, № 3. - P. 227–241.
129. Sun S.-C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway / S.-C. Sun // *Cell Res.* - 2011. - V. 21, № 1. - P. 71–85.
130. Sun S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation / S.-C. Sun // *Nat. Rev. Immunol.* - 2017. - V. 17, № 9. - P. 545–558.
131. Targeted Deletion of Adipocytes by Apoptosis Leads to Adipose Tissue Recruitment of Alternatively Activated M2 Macrophages / P. Fischer-Posovszky, Q. A. Wang, I. W. Asterholm, et al. // *Endocrinology.* - 2011. - V. 152, № 8. - P. 3074–3081.
132. The association between Metabolic Syndrome and serum levels of lipid peroxidation and interleukin-6 in Gorgan / H. M. Sarbijani, M. Khoshnia, A. Marjani // *Diabetes Metab. Syndr.* - 2016. - V. 10, № 1. - P. S86-89.
133. The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe / Z. M. Younossi, D. Blissett, R. Blissett, et al. // *Hepatology. Baltim. Md.* - 2016. - V. 64, № 5. - P. 1577–1586.
134. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) / E. Buzzetti, M. Pinzani, E. A. Tsochatzis. // *Metabolism.* - 2016. - V. 65, № 8. - P. 1038–1048.
135. The non-canonical NF- κ B pathway and its contribution to β -cell failure in diabetes / K. Meyerovich, F. Ortis, A. K. Cardozo // *J. Mol. Endocrinol.* - 2018. - V. 61, № 2. - P. F1–F6.
136. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 / J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al. // *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* - 2011. - V. 1813, № 5. - P. 878–888.
137. The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis / K. Kazankov, S. M. D. Jørgensen, K. L. Thomsen, et al. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* - 2019. - V. 16, № 3. - P. 145–159.

138. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer / S. Tilborghs, J. Corthouts, Y. Verhoeven, et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* - 2017. - V. 120. - P. 141–150.
139. Therapeutic Strategies for Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Age-Related Metabolic Disorders / J.S. Bhatti, S. Kumar, M. Vijayan, G.K. Bhatti, P.H. Reddy, et al. // *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* – 2017. - V. 146. – 2017. - P. 13-46.
140. Tilg H. NAFLD and diabetes mellitus / H. Tilg, A. R. Moschen, M. Roden // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* - 2017. - V. 14, № 1. - P. 32–42.
141. TNF-Receptor-1 inhibition reduces liver steatosis, hepatocellular injury and fibrosis in NAFLD mice / F. Wandrer, S. Liebig, S. Marhenke, et al. // *Cell Death Dis.* - 2020. - V. 11, № 3. - P. 1–9.
142. Touyz R.M. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress / R.M. Touyz // *Primer on the Autonomic Nervous System.* – 2012. – P.335-338.
143. Trebicka J. Hepatic mitochondrial dysfunction in nonalcoholic steatohepatitis: Read-out or reason? / J. Trebicka, R. Schierwagen // *Hepatology.* – 2016. – V. 63, № 5. – P. 1729-1732.
144. Tsiloulis T. Exercise and the Regulation of Adipose Tissue Metabolism / T. Tsiloulis, M.J. Watt // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2015. – V. 135. – P. 175-201.
145. Tumor Necrosis Factor- α as a Predictor for the Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A 4-Year Follow-Up Study / Y. Y. Seo, Y. K. Cho, J. C. Bae, et al. // *Endocrinol. Metab.* - 2013. - V. 28, № 1. - P. 41–45.
146. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 1997, Geneva: WHO.
147. Wu L. Effect of NF- κ B on the pathogenic course of non-alcoholic fatty liver disease / L. Wu, Y. Xie // *Journal of Central South University. Medical sciences.* - 2017. - V. 42, № 4. - P. 463–467.
148. Yaffe M. Dynamic mitochondria / M. Yaffe // *Nat Cell Biol.* – 1999. – V. 1. – P. 149–150.
149. Yazıcı D. Obesity and Lipotoxicity Advances in Experimental Medicine and Biology / D. Yazıcı, H. Sezer // Springer International Publishing. - 2017. - P. 277–304.