

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Пермский государственный медицинский университет
имени академика Е.А. Вагнера»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

МИФТАХОВА

Альбина Мавлетьяновна

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ
СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ КАК ОСНОВА РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ПОДХОДОВ
К ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3 Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук,
доцент Гуляева Инна Леонидовна
доктор медицинских наук,
доцент Булатова Ирина Анатольевна

Пермь – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ | 17 |
| 1.1 Этиологические факторы и механизмы развития неалкогольного стеатоза печени | 17 |
| 1.2 Особенности развития вторичного стеатоза при вирусных поражениях печени | 26 |
| 1.3 Современные возможности диагностики стеатоза печени | 28 |
| 1.4 Обзор значимых в развитии стеатоза печени полиморфизмов генов.... | 31 |
| 1.5 Возможности экспериментально исследования механизмов развития стеатоза печени и поиска эффективных гепатопротекторов | 33 |
| 1.5.1 Экспериментальные модели неалкогольной жировой болезни печени | 33 |
| 1.5.2 Перспективы изучения в эксперименте Джинуры Прокумбенс в качестве гепатопротекторного средства при стеатозе печени | 38 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 43 |
| 2.1 Дизайн экспериментально-клинического исследования..... | 43 |
| 2.2 Экспериментальное исследование..... | 44 |
| 2.2.1 Характеристика лабораторных животных, условия их содержания, описание экспериментальных групп | 44 |
| 2.2.2 Характеристика экспериментальной модели фруктозоиндуцированного стеатоза печени | 47 |
| 2.2.3 Тактика применения и состав исследуемого препарата | 48 |

| | | |
|--|---|----|
| 2.2.4 | Лабораторное и гистологическое обследование экспериментальных животных | 50 |
| 2.3 | Клиническое исследование | 55 |
| 2.3.1 | Объем наблюдений. Клинические модели | 55 |
| 2.3.2 | Общеклиническое обследование | 59 |
| 2.3.3 | Методы лабораторного, генетического и инструментального обследования | 59 |
| 2.3.4 | Расчетные индексы стеатоза и фиброза..... | 63 |
| 2.4 | Методы статистической обработки полученных результатов | 64 |
| Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ И ОБОСНОВАНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКЦИИ В ЭТИХ УСЛОВИЯХ | | |
| 3.1 | Летальность экспериментальных животных, результаты исследования массового коэффициента печени и массы тела | 68 |
| 3.2 | Результаты гистологического исследования печеночной ткани у экспериментальных животных | 70 |
| 3.3 | Результаты биохимических печеночных тестов, метаболические показатели и уровень интерлейкина-6 у животных с экспериментальным стеатозом и влияние на них экстракта листьев Джинуры Прокумбенс | 76 |
| 3.4 | Результаты исследования состояния гемостаза у животных с экспериментальным стеатозом печени и влияния на эту систему экстракта листьев Джинуры Прокумбенс | 78 |
| 3.5 | Взаимосвязи показателей гемостаза, биохимических показателей и липидного спектра в группе животных «Стеатоз». Особенности патогенеза неалкогольного стеатоза печени без ожирения по результатам экспериментального исследования | 81 |

| | |
|---|-----|
| Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОЗОМ ПЕЧЕНИ НА ФОНЕ ОЖИРЕНИЯ И ВТОРИЧНЫМ СТЕАТОЗОМ С ВИРУСНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ | 84 |
| 4.1 Клиническая характеристика больных, включенных в исследование .. | 84 |
| 4.2 Биохимические и метаболические показатели у пациентов с неалкогольным и вторичным стеатозом печени в сравнительном аспекте | 86 |
| 4.3 Индексы стеатоза и фиброза в исследуемых группах | 89 |
| 4.4 Состояние системы гемостаза у исследуемых пациентов..... | 90 |
| 4.5 Исследование сывороточной концентрации цитокинов на клинических моделях стеатоза печени..... | 93 |
| 4.6 Взаимосвязи патогенетических параметров в исследуемых группах ... | 94 |
| 4.7 Сравнительная оценка результатов экспериментальной и клинической части исследования | 97 |
| 4.8 Диагностическое значение индекса стеатоза на модели больных неалкогольным стеатозом печени | 99 |
| Глава 5. АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TNFA (G308A), IL6 (C174G) И VEGFA (G634C) С РАЗВИТИЕМ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ У ЛИЦ С ОЖИРЕНИЕМ В ПЕРМСКОМ КРАЕ..... | 107 |
| 5.1 Исследование комбинаций аллельных вариантов исследуемых генов в группах здоровых лиц и больных неалкогольным стеатозом печени в Пермском крае..... | 107 |
| 5.2 Анализ ассоциации аллельных вариаций генов с выработкой патогенетически значимых факторов | 110 |
| 5.3 Оценка генетического профиля | 111 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 114 |
| ВЫВОДЫ..... | 131 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ..... | 132 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 134 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 136 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В структуре хронических заболеваний печени основная доля приходится на неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП), которая по разным данным встречается у 20-33% людей в мире, составляет более 40% среди населения развитых стран и занимает первое место среди заболеваний печени – 71,6% [28, 36, 51, 98, 129, 217, 218]. Согласно протоколу DIREG2, распространенность НАЖБП в Российской Федерации составляет 37,3%, причем 70,4% случаев приходится на долю стеатоза, 24,6% - стеатогепатита и 5% на долю ЦП (цирроза печени) [29].

Наличие НАЖБП возможно также у лиц с нормальным весом. Данные о распространенности НАЖБП без ожирения в разных странах достаточно вариабельны и составляют от 3 до 30% [123, 141, 146, 193, 194].

Патогенез НАЖБП многофакторный, многоэтапный, пусковыми точками которого являются ИР (инсулинорезистентность) и изменение профиля гормонов - регуляторов жирового обмена. В разное время было предложено несколько теорий и концепций развития НАЖБП. В настоящее время этиопатогенез НАЖБП рассматривают, как сложные взаимодействия множественных генетических, средовых, адаптационных факторов и гормональных особенностей [13, 36, 45, 46, 51, 185]. В качестве факторов риска развития НАЖБП без ожирения рассматриваются экзогенные (избыточное потребление холестерина и быстроусваиваемой фруктозы) и генетически детерминированные [12]. Однако по выраженности и взаимосвязям некоторых механизмов развития НАЖБП, в частности активности цитокинов, эндотелиальной дисфункции (ЭД) и нарушениям со стороны системы гемостаза в литературе имеются разнонаправленные данные, особенно на стадии стеатоза, как у лиц с ожирением, так и без него, что требует дальнейшего уточнения.

В последние годы активно обсуждаются вопросы сочетанного вирусного и метаболического повреждений печени, а также роли нарушений углеводного и липидного обменов в патогенезе вирусных гепатитов. Доказано, что частота встречаемости стеатоза печени (СП) у больных ХГС (хроническим вирусным гепатитом С) колеблется от 30 до 80%, чаще ассоциирована с 3 генотипом вируса и не сопровождается общим ожирением [2, 15, 75, 106, 178]. Остается дискуссионным вопрос, является ли накопление жира в печени ответственным за последующее воспаление или же вирус-индуцированное приводит к дисфункции гепатоцитов с развитием стеатоза.

Диагностика НАСП (неалкогольный стеатоз печени) до сих пор является не до конца разрешенной задачей. Клинико-лабораторная картина при СП, как правило, скудная. Методы диагностики НАЖБП включают оценку клинико-лабораторных показателей, неинвазивные инструментальные методы (УЗИ, эластография/эластометрия, КТ, МРТ), инвазивные (пункционная биопсия печени) и малоинвазивные методы – расчетные индексы стеатоза (ИС) и фиброза (ИФ) [20, 31, 36, 45, 51, 216].

Однако инструментальные методы не всегда дают четкое представление об активности процесса, наличия и степени выраженности фиброза печени (ФП). Применение инвазивных методов ограничено в связи с наличием противопоказаний и риском осложнений. Часть существующих панелей запатентованы, выполняются с определенными реактивами, либо включают большой перечень лабораторных тестов. В связи с этим актуален дальнейший поиск неинвазивных доступных маркеров СП, позволяющих реализовать их в общеклинической практике.

Проблема наследственной предрасположенности к формированию НАЖБП также весьма актуальна. К значимому аспекту следует отнести наличие полиморфизма генов, регулирующих иммуновоспалительные процессы. Количество исследований, направленных на изучение связи полиморфизма генов цитокинов с развитием НАЖБП, невелико, а результаты порой противоречивы. По мнению ряда исследователей, определение региональных особенностей

генетических мутаций при оценке риска развития НАЖБП имеет значение для отечественной популяции в целом [30, 39, 44, 65].

Таким образом, многообразие фенотипов НАЖБП, распространенность этой нозологии у лиц с нормальным весом, влияние генетических факторов развития и прогрессирования стеатоза, недостаточная изученность механизмов вторичного накопления жира при вирусных поражениях печени и трудности диагностики обуславливают необходимость более глубокого изучения СП.

В изучении этиологии и патогенеза НАЖБП ключевая роль принадлежит адекватным экспериментальным моделям [10, 55, 203]. Выявление закономерностей патогенеза стеатоза у лабораторных животных при моделировании НАЖБП могут быть использованы для доклинической оценки механизмов саногенетического действия лекарственных средств. Диет-индуцированные модели широко применяются с целью экспериментального моделирования НАЖБП [8, 38, 131, 135, 182], при этом используются различные ключевые факторы моделирования патологии: метионин-холин-дефицитная диета [47], высокожировой рациона питания [8, 152, 182], высокожировая диета с добавлением холестерина [55, 131, 142]; модели, сочетающие высокое содержание жира и углеводов [38, 135, 171]. Один из наиболее часто используемых принципов, лежащих в основе моделирования стеатоза, – использование высокоуглеводных диет и, прежде всего, введение в рацион питания животных фруктозы [10, 90, 165, 195, 203].

Современный арсенал лекарственных средств, обладающих саногенетическим действием на печень при НАЖБ, включает как препараты растительного происхождения, так и синтетические лекарственные средства. Однако недостаточная эффективность одних препаратов и ряд ограничений, свойственных другим, делает проблему поиска потенциально эффективных новых гепатопротекторов чрезвычайно актуальной. Лекарственное растение Джинура Прокумбенс из семейства астровых является потенциальным природным источником соединений с различными фармакологическими эффектами [26, 132, 198]. Доказано, что это растение обладает высоким терапевтическим потенциалом

для лечения различных заболеваний, проявляет антиоксидантное, антигипергликемическое, антигиперлипидемическое, противовоспалительное действие [26, 62, 126, 132, 154, 197]. В этой связи представляет интерес изучение гепатопротекторного действия при СП растения Джинуры Прокумбенс.

Цель исследования

Уточнить патофизиологические механизмы и генетические риски разных форм СП для обоснования новых подходов к диагностике и гепатопротекции.

Задачи исследования

Уточнить патофизиологические механизмы на модели фруктозоиндуцированного СП у лабораторных животных.

Обосновать гепатопротекторный эффект экстракта листьев Джинуры Прокумбенс на модели фруктозоиндуцированного стеатоза у лабораторных животных.

Оценить выраженность метаболических нарушений, ДЭ (дисфункции эндотелия), концентрации провоспалительных цитокинов и состояния системы гемостаза при СП разного генеза.

Оценить ассоциации лабораторных и инструментальных показателей и установить лабораторные маркеры, имеющие диагностическое значение для верификации НАСП.

Изучить особенности встречаемости аллельных пар по полиморфным локусам генов ФНО- α (фактора некроза опухоли альфа) TNF- α (G308A), интерлейкина-6 IL-6 (C174G) и ВЭФР (васкулоэндотелиального фактора роста) VEGFA (G634C) у пациентов с НАСП и ожирением в сравнении с практически здоровыми жителями г. Перми.

Новизна исследования

Новизна исследования определяется комплексной оценкой механизмов стеатогенеза и патогенетически значимых маркеров на экспериментальной модели (фруктозоиндуцированный стеатоз без ожирения) и клинических моделях (неалкогольный стеатоз у лиц с ожирением и вторичный вирус-ассоциированный стеатоз) с использованием общего лабораторного алгоритма.

По результатам экспериментально-клинического исследования уточнены особенности патогенеза стеатоза печени без ожирения, у лиц с ожирением и вторичного вирус-ассоциированного стеатоза.

Выявлено, что в экспериментальной и клинической моделях СП имеются сходные изменения липидного спектра и нарушение показателей коагуляционного звена гемостаза.

Впервые проанализировано влияние экстракта листьев Джинуры Прокумбенс при курсовом введении у лабораторных животных с экспериментальным стеатозом на биометрические и морфофункциональные характеристики печени.

В эксперименте на модели фруктозоиндуцированного стеатоза установлен гепатопротекторный эффект курсового применения экстракта листьев Джинуры Прокумбенс в виде улучшения биометрических и морфологических характеристик печени. Дано патогенетическое обоснование возможности применения экстракта Джинуры Прокумбенс при СП.

При комплексном исследовании на клинических моделях пациентов с неалкогольным стеатозом при ожирении и вторичным вирус-индуцированным стеатозом печени проанализированы и сопоставлены особенности лабораторных маркеров, отражающих основные механизмы повреждения печени, выделены наиболее значимые для верификации СП.

Впервые разработан и предложен неинвазивный способ диагностики НАСП с расчетом ИС (решение о выдаче патента от 05.08.2021 г. по заявке №2021106422/14(013887).

Впервые установлено, что дополнительным фактором риска развития НАСП у лиц с ожирением в Пермском крае является носительство генотипа АА гена TNF- α -308G/A и генотипа СС гена VEGFA -634G/C.

Теоретическая и практическая значимость

В экспериментальной и клинических моделях СП установлены сходные изменения липидного спектра и нарушение показателей коагуляционного звена гемостаза.

На модели фруктозоиндуцированного НАСП у лабораторных животных показано, что использование курса введения экстракта Джинуры Прокумбенс оказывает гепатопротекторный эффект в виде улучшения биометрических и морфологических характеристик печени; дано патогенетическое обоснование возможности применения экстракта Джинуры Прокумбенс при СП.

Установлены биометрические и лабораторные маркеры, имеющие диагностическое значение для верификации НАСП: ИМТ (индекс массы тела), ГГТП (гамма-глутамилтранспептидаза), ВЭФР и ИЛ-6 (интерлейкин-6).

Предложен метод диагностики НАСП с расчетом ИС.

Показано, что анализ индивидуального генетического профиля по генам TNF- α в регионе -308G/A и VEGFA в регионе -634G/C позволяет выявить риск развития НАСП у здоровых и определить риск возможного прогрессирования заболевания у пациентов.

Положения, выносимые на защиту

Фруктозоиндуцированный СП у лабораторных животных характеризуется нарушением липидного спектра сыворотки крови, патологическими сдвигами показателей гемостаза, гепатомегалией и формированием морфологических изменений в печени без развития общего ожирения. Экстракт листьев Джинуры Прокумбенс препятствует формированию гепатомегалии и характерных для стеатоза морфологических изменений в ткани печени.

Для стеатоза печени характерны метаболические нарушения, изменения в системе гемостаза, развитие ЭД и повышение концентрации провоспалительных цитокинов, особенности которых зависят от формы стеатоза.

Для диагностики НАСП может эффективно использоваться расчет ИС, включающий ИМТ, ГГТП, ВЭФР и ИЛ-6.

Риск развития и прогрессирования НАСП у лиц с ожирением ассоциирован с носительством генотипа АА гена TNF- α -308G/A и генотипа СС гена VEGFA -634G/C.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности полученных результатов и обоснованность выводов базируется на адекватности экспериментальной модели, достаточном объеме выборки пациентов в клинической части, использовании сертифицированного оборудования и реактивов, современных методов исследования; актами внедрения результатов работы и проверке первичной документации; адекватной статистической обработке результатов.

Соответствие паспорту специальности

Областью диссертационного исследования является изучение патофизиологических механизмов развития НАСП, половых различий и эффективности терапии (содержание пунктов 2, 4, 6, 9, 10). Указанная область и способы исследования соответствуют специальности 3.3.3 – патологическая физиология (медицинские науки).

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах патологической физиологии (акт от 15.09.2021г.), факультетской терапии №1 (акт от 05.09.2021г.), факультетской терапии №2, профессиональной патологии и клинической лабораторной диагностики (акт от 10.09.2021г.) и кафедре общественного здоровья и здравоохранения №2 с курсом информатизации здравоохранения (акт от 15.09.2021) ФГБОУ ВО ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России. Также результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре патологической физиологии (акт от 15.09.2021г.) ФГБОУ ВО КГМУ.

Результаты исследования внедрены в работу лабораторных подразделений ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (акт от 10.10.2021г.), ГБУЗ ПК "Городская клиническая больница №2 им. Ф.Х. Граля" (акт от 05.10.2021г.), ООО «МедЛабЭкспересс» (акт от 25.09.2021г.).

Личный вклад автора

Содержащиеся в работе результаты получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах выполняемой работы. Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научными руководителями д.м.н., доцентом Гуляевой И.Л. и д.м.н., доцентом Булатовой И.А. Автором самостоятельно проведены изучение отечественной и зарубежной литературы, постановка экспериментальных исследований, набор клинического материала, создание электронной базы данных, статистическая обработка, оценка и анализ полученных результатов, написание статей, оформление диссертационной работы.

Апробация работы и публикации

Выводы и результаты исследования были представлены и обсуждены на I Международном междисциплинарном форуме молодых ученых «Приоритетные направления развития науки, технологий, техники» – 10 июня 2017 г. (г. Новосибирск); итоговой научно-практической конференции ПГМУ с заседаниями на иностранных языках – 12 апреля 2018 г. (г. Пермь); на Объединенном международном конгрессе «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-й Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии» 4-6 октября 2018 г. (г. Санкт-Петербург); на Третьей международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия» 20-21 декабря 2018 года (г. Смоленск); на Межвузовском международном конгрессе «Высшая школа: научные исследования» 5 августа 2021 г. (г. Москва); на Международном научном форуме "Наука и инновации: современные концепции" 13 августа 2021 г. (г. Москва).

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 4 – в изданиях, включенных в «Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёных степеней доктора и кандидата наук», 3 работы опубликованы в материалах конференции. Получен 1 патент на изобретение: «Способ диагностики неалкогольного стеатоза печени» (№ 2755974 Российская Федерация, опубликовано 23.09.2021).

Апробация работы проведена на заседании научной проблемной комиссии по молекулярной биологии, фармакологии, нормальной физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (протокол заседания №1 от 11.09.2021 г.)

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа написана на русском языке объемом 163 страницы компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения с обсуждением полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, раздела перспектив дальнейшей разработки темы.

Список литературы содержит 222 наименований работ, их которых – 87 отечественных и 135 иностранных источников. Текст диссертации иллюстрирован 26 рисунками и содержит 25 таблиц.

Диссертация выполнена на кафедре патологической физиологии ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России (и.о. ректора – профессор Н.В. Минаева). Работа была выполнена в соответствии с Хельсинской декларацией на проведение научного исследования с участием человека (Хельсинки, Финляндия 1964 г.) и одобрена Этическим комитетом ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера (разрешение этического комитета от 31.08.2021 г.). От

каждого пациента получено добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Животные содержались в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 года Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ПГМУ (протокол №8 от 31.08.21г). При выполнении работы, написании статей и изобретений конфликта интересов не возникало.

Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ

1.1 Этиологические факторы и механизмы развития неалкогольного стеатоза печени

С современных позиций НАЖБП рассматривается как важный компонент МС (метаболического синдрома) – комплекса метаболических, гормональных и клинических нарушений. По сути НАЖБП является определенным фенотипом, который объединяет целый ряд подтипов, которые отличаются выраженностью клинических проявлений, быстрым и медленным прогрессированием фиброза [156, 175]. В современной клинической практике принято выделять три основные клинико-морфологические формы НАЖБП: СП, НАСГ (неалкогольный стеатогепатит) (без фиброза или с фиброзом печени) и ЦП в исходе НАСГ. До 80 – 90% пациентов с НАЖБП имеют изолированный СП, отличающийся преимущественно доброкачественным течением. Однако, у 10 – 30% пациентов развивается НАСГ, прогрессирующая форма НАЖБП, сопровождающаяся гепатоцеллюлярным повреждением и воспалением, у 25 – 40% из которых впоследствии развивается ФП, постепенно ведущий к циррозу органа в 20 – 30% случаев. Ключевой гистологический признак НАЖБП – СП [51]. Разнообразие клинических проявлений, механизмов развития и исходов НАЖБП обусловлены множеством факторов: возрастных, гендерных, генетических и этнических, употребления алкоголя, характера питания, гормонального статуса, особенностей микробиоты, коморбидных состояний и метаболического статуса [20, 45, 51, 185].

Частота встречаемости НАЖБП и клинической формы СП увеличивается с возрастом (особенно у женщин), что обусловлено тем, что с возрастом в печени снижением печеночного кровотока в печени с возрастом, нарушением клеточного цикла, увеличением секреции провоспалительных цитокинов. Исследования, проведенные в эксперименте и клинике, доказали влияние процесса старения на

развитие СП, НАСГ и ФП [155]. По данным И.В. Маева (2020) наиболее высокая распространенность стеатоза отмечается в возрастной группе 70 – 80 лет (34,26%) [51].

В отношении факторов риска развития НАЖБП в литературе встречаются разные данные. По результатам Всероссийского исследования DIREG 1, которое включало 30754 человек, самыми часто встречающимися факторами риска развития НАЖБП были дислипидемия (2-го типа по Фридриксену) – у 75,9% пациентов, артериальная гипертензия – у 69,9% и гиперхолестеринемия – у 68,8% [29]. По другим данным факторами риска развития НАЖБП являлись: мужской пол, возраст от 30 до 59 лет, избыточная масса тела и ожирение — ИМТ более 25 кг/м², гипергликемия, гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия. Согласно метаанализу Younossi Z.M. и соавторов (2016) с НАЖБП чаще всего ассоциированы такие метаболические нарушения, как ожирение, сахарный диабет второго типа, гиперлипидемия, АГ и МС [218]. В другой метааналитической работе Lu F.B. и соавторов (2018) было отмечено, что ожирение является фактором риска прогрессирования ФП у пациентов с НАЖБП [158]. У 90% пациентов с НАЖБП выявляется один компонент МС и более, а у 30% – все составляющие МС. Согласно результатам различных исследований, у 70 – 100% больных ожирением и сахарным диабетом второго типа выявляется НАЖБП, при этом гипертриглицеридемия регистрируется у 20 – 92% [45]. Влияние диетического фактора на риск развития НАЖБП связывают с высоким потреблением насыщенных жиров, холестерина и фруктозы [12].

К эндогенным факторам риска развития НАЖБП относятся: несбалансированное питание с пере- или недоеданием, низкая физическая активность, синдром избыточного бактериального роста с гиперэндотоксинемией, обуславливающий повышенную проницаемость кишечного слизистотканевого барьера, нарушение энтерогепатической циркуляции желчных кислот [114, 183]. Метаанализ 10 исследований показал высокую связь между синдромом избыточного бактериального роста в тонкой кишке и НАЖБП [212].

На сегодняшний день многие авторы выделяют понятия НАЖБП худых (lean NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), non-overweight NAFLD) и НАЖБП без ожирения (non-obese NAFLD); последний термин объединяет лиц с нормальной (ИМТ 18,5 – 24,9 кг/м²) и повышенной (ИМТ 25,0 – 29,9 кг/м²) массой тела [12]. При нормальном ИМТ возможна манифестация одного или нескольких компонентов МС [12, 140].

Следует отметить, что распространенность НАЖБП у лиц без ожирения также неуклонно растет в популяции и составляет по разным данным от 3 до 30% [123, 141, 146, 194]. Так, согласно последнему метаанализу Shi Y. и соавторов (2019), распространенность НАЖБП у лиц без ожирения составляет 15,7% [193].

В качестве факторов риска развития НАЖБП без ожирения сегодня рассматриваются как экзогенные (избыточное потребление холестерина и быстроусваиваемой фруктозы – фруктоголизм), так и генетически детерминированные (аллельные варианты генов, кодирующих адипонутрин, белок-переносчик эфиров холестерина, стеролрегулирующий элементсвязывающий фактор-2) [12, 140].

Фруктоголизм и фруктозная болезнь печени – новые термины, обозначающие зависимость от продуктов, содержащих быстроусваиваемую фруктозу, и метаболическую НАЖБП вследствие избыточного употребления таких продуктов, соответственно [114, 183]. Метаболизм фруктозы в печени по гликолитическому пути происходит гораздо быстрее, чем глюкозы, так как фруктоза минует стадию, характерную для метаболизма глюкозы, катализируемую фосфофруктокиназой, что позволяет фруктозе интенсифицировать в печени биохимические процессы, ведущие к синтезу жирных кислот и секрецию липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Помимо липогенного эффекта, избыточное потребление быстроусваиваемой фруктозы по некоторым данным может также запускать процессы печеночного воспаления через окислительный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума [136, 137].

По мнению ряда исследователей, метаболические факторы, ассоциированные с НАЖБП у лиц без ожирения практически идентичны таковым НАЖБП с ожирением: возраст, мужской пол, объем талии, ИМТ > 23-25 кг/м², повышенное содержание висцерального жира, артериальную гипертензию, ИР, гипергликемию натощак, сахарный диабет, гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, низкий уровень холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), повышенную активность аланиновой трансаминазы, полиморфизм адипонутрина [141, 194, 211]. Более того, по мнению отдельных авторов, ассоциация с компонентами МС у пациентов с НАЖБП без ожирения даже более сильная [146, 194].

Генез НАЖБП мультифакторный. Сегодня большинство исследователей рассматривают этиопатогенез НАЖБП с позиции сложных взаимодействий между генетическими предпосылками, факторами внешней среды (характер питания и величина физической активности), гормональными расстройствами и пр. Пусковыми точками развития стеатоза являются ИР и изменение профиля гормонов - регуляторов жирового обмена [45, 51, 185]. В основе развития метаболических проблем у людей с ожирением рассматривают два феномена: ИР и липотоксичность [4, 24].

Воспаление с развитием «цитокинового взрыва» по мнению многих исследователей является важным компонентом сложного патогенеза развития и прогрессирования НАЖБП [13, 32, 36, 41, 48, 49, 67, 92, 102]. Вместе с тем в литературе приводятся достаточно противоречивые данные по концентрации цитокинов при этой нозологии. В одном из исследований у больных НАСП статистически значимо повышались уровни интерферона альфа и гамма, а также ИЛ-8 относительно контрольной группы. При этом повышение ФНО- α и ИЛ-6 было не значимым. По другим данным имелась прямая корреляция между ФНО- α с лабораторными параметрами цитолиза и холестаза. Также была выявлена значимая корреляция между концентрацией ИЛ-6 и ХС (общий холестерин) [3, 52, 124].

Гейвандова Н.И. с соавторами изучали взаимосвязь между уровнями ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-10 в крови пациентов с НАСП и печеночными пробами, а также выраженностью морфологических изменений в печени. Предполагается, что уровень ФНО- α может отражать активность стеатогепатита. Кроме этого выявлена прямая зависимость между уровнем ФНО- α и уровнем инсулина в крови натощак [23, 61].

У больных с выраженным стеатозом (2 и 3 степени) содержание ФНО- α было выше, чем при первой степени стеатоза. Это подтверждает данные о том, что жировая ткань может сама продуцировать ФНО- α , выступая в роли одного из компонентов иммунной системы. Также для стеатоза 2 и 3 степени характерно повышение ИЛ-6 и ИЛ-10. Установлена положительная корреляция между ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-10 и индексом гистологической активности. Предлагается использовать эти показатели как неинвазивные маркеры стеатоза и активности воспаления в печени при НАЖБП. Однако авторы не указывают конкретные значения цитокинов, которые бы точно соответствовали той или иной степени стеатоза [23, 220].

В другом исследовании было установлено, что при НАСП уровни ФНО- α и ИФН- γ , а также ИЛ-4 и ИЛ-10 практически не отличались от здоровых людей. При развитии воспаления в печеночной ткани значительно повышался уровень ФНО- α и ИФН- γ в сыворотке крови, при этом уровень ИЛ-6 увеличивался незначительно [68]. S. Coulon с соавторами [111] установили, что ФНО- α был значимо выше при НАСГ относительно контроля, при СП ФНО- α также были выше, чем у здоровых людей, однако разница была статистически не значимой. Также не было выявлено значимого различия между СП и НАСГ. Уровни ИЛ-6 были выше при НАСГ и при СП относительно контроля. Однако особых различий по уровню ИЛ-6 при НАСГ и СП выявлено не было.

В другом исследовании при НАЖБП выявлено статистически значимое повышение концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , коррелирующие с тяжестью болезни, со степенью ожирения, величиной индекса НОМА и степенью ЭД. [21, 63]. В исследовании на пациентах со стеатогепатитом также подтверждена

взаимосвязь цитокинов с ЭД путем их влияния на экспрессию и активность Eno3 [173]. Есть мнение, что продуцируемые адипоцитами ИЛ-6 и ФНО- α инициируют сосудистое воспаление и запускают синтез С-реактивного белка гепатоцитами [28].

Таким образом, большинство исследователей сходятся во мнении, что НАСГ сопровождается повышением уровней ФНО- α и ИЛ-6. Однако данные литературы по анализу цитокинового спектра при НАСП не всегда однозначны, что требует дополнительного уточнения.

В экспериментах на животных было доказано, что при НАЖБП развивается ДЭ с дисбалансом ферментативной системы оксида азота, которая может быть связана с накоплением липидов, нарушением толерантности к глюкозе и повреждением печени [18, 25, 127, 173, 189]. На экспериментальных моделях стеатоза у животных было доказано, что NO участвует в модуляции микроциркуляторной перфузии и оксигенации печени [101]. В исследованиях на клинических моделях было получено статистически значимое увеличение содержания метаболитов оксида азота у больных НАСГ по сравнению со СП и контролем [53].

Концентрация ВЭФР при НАСП была значимо выше относительно контроля, при НАСГ относительно контроля разница по уровню ВЭФР приближалась к статистически значимой. При этом отличий по ВЭФР между больными с СП и НАСГ не было выявлено [111]. В другом исследовании показатели ЭД в группе больных со стеатозом не отличались от контроля, а в крови больных НАСГ превышало показатели пациентов с НАСП и коррелировали с НОМА-индексом, что демонстрирует роль ЭД в эволюции стеатоза в стеатогепатит [22].

Таким образом, большинство исследователей сходятся во мнении, что ЭД определенно имеет место при стеатогепатите. При НАСП статистически значимое повышение маркеров ЭД подтверждено только в части исследований, в то время, как в других исследованиях сообщается об отсутствии различий между

пациентами с НАСП и здоровыми людьми, что служит поводом для дальнейшего изучения этой темы.

Известно, что печень является одним из ключевых органов, обеспечивающих стабильную работу системы гемостаза. Главная роль в регуляции функционирования этой системы принадлежит гепатоцитам. Развитие СП характеризуется накоплением жировых включений в ее клетках. С точки зрения патологии этот процесс является дистрофией, которая характеризуется следующим механизмом развития: нарушение метаболизма приводит к повреждению клеток, нарушению их структуры и, как следствие, функциональным изменениям. Это позволило многим ученым предположить, что при СП возможно развитие нарушений в системе гемостаза. Есть данные о том, что фиброгенез в печени может поддерживаться чрезмерной активацией гемостаза [104, 208].

Предполагается, что снижение антитромбогенного потенциала сосудистой стенки влечет за собой усиление фиброгенеза при НАЖБП. Было установлено, что стеатоз может приводить к дисбалансу в системе гемостаза в течение трех месяцев [143]. Есть факты, что НАСП сопровождается повышенной активацией ТР (тромбоцитов) и способствует развитию протромботического состояния у пациентов [66, 108, 134, 159, 170, 192]. Вероятно, это связано с нарушением биофизического состояния мембран ТР, что вызывает их активацию и дегрануляцию [176, 201]. ЭД и гипертриглицеридемия также могут быть триггерами активации ТР [11]. В литературе встречаются работы, которые изучали связь количества ТР со стадией НАЖБП, с развитием фиброза и прогнозом НАЖБП [119].

В ряде научных исследований проводилась оценка спонтанной и агонист-индуцированной агрегации ТР. В исследовании Н.М. Баженовой было установлено, что спонтанная агрегация ТР при НАЖБП была в 4,2 раза выше, чем в контрольной группе, а АДФ (аденозиндифосфат) – индуцированная агрегация ТР возрастала на 71,7% [7]. Однако в статье Potze W. с соавторами (2016) сообщается, что спонтанная активация ТР у пациентов с НАСП и ожирением

значимо не отличалась от обследуемых с нормальным ИМТ и ожирением без стеатоза и не коррелировала с параметрами МС [179]. В статье Malehmir M. с соавторами (2019) также говорится об отсутствии значимых изменений в количестве, активации и агрегации ТР при НАСП [160].

При этом в других исследованиях указывается, что НАЖБП ассоциирована с развитием тромбоцитопении [181, 205]. Учитывая разнонаправленность данных в литературе по уровню агонист-индуцированной агрегации ТР при НАЖБП необходимы дальнейшие исследования в этом направлении, особенно на стадии стеатоза.

Есть данные о повышении содержания ФВ (фактор Виллебранда) при НАСП, что может быть следствием повреждения эндотелия [99, 207]. При этом в ряде работ было показано, что уровень ФВ в крови коррелирует с выраженностью гистологических изменений в печени [169, 199]. Однако A. Verrijken с соавторами (2014) не нашли корреляцию ФВ с результатами гистологии [207]. У крыс с НАЖБП также было отмечено повышение ФВ, агрегации ТР, фибриногена, продуктов деградации фибрина, а также уменьшение времени свертывания и кровотечения [186].

Также представляют интерес исследования, посвященные оценке системы коагуляционного гемостаза при СП, по которым в литературе неоднозначные данные. Есть сведения, что тесты АПТВ и ПТВ у пациентов с НАСП значимо не отличаются от контрольной группы [179]. В других исследованиях сообщается, что у больных НАСП наблюдаются высокие уровни фибриногена и факторов VII и VIII при понижении концентрации антитромбина [169, 199, 207]. Есть мнение, что ИР является первоочередной причиной увеличения активности циркулирующего фактора свертывания крови и снижения фибринолитического потенциала плазмы у пациентов с НАЖБП [147, 179].

Риск развития тромбоза при НАЖБП по одним данным связан с угнетением фибринолиза [207], по другим с увеличением концентрации провоспалительных цитокинов, способствующих прямой активации тромбина и формированию тромбов в микроциркуляторном русле [153]. Выявлено, что

эндогенный потенциал тромбина при СП повышается независимо от наличия МС, что свидетельствует о активации коагуляционного гемостаза [187], которое по мнению некоторых исследователей может играть центральную роль в патогенезе НАЖБП [144].

Однако, в одном из недавних исследований авторы пришли к выводу, что состояние гемостаза при НАСП практически ничем не отличается от здоровых людей [179]. Возможно разнонаправленность результатов исследования системы гемостаза при НАЖБП обусловлено небольшими выборками и лабораторными особенностями проведения тестов, поэтому исследования в этой области далеки от завершения.

В экспериментах при НАСП у мышей наблюдалась активация тромбин-антитромбинового комплекс как в печени, так и в крови [172]. Гистологическое исследование у мышей и людей с НАЖБП и ожирением продемонстрировало отложение фибрина в печени и жировой ткани. Также было показано, что развитие стеатоза и воспаления в печени зависит от фибрин-опосредованного привлечения воспалительных клеток [138]. Есть сведения, что дефицит тканевого фактора в кроветворных клетках резко снижает образование тромбина и развитие НАЖБП у мышей с гиперхолестеринемией [144].

Механизм развития НАЖБП у лиц без ожирения до конца не изучен. Проблема осложняется тем, что такие пациенты практически не имеют жалоб, особенно на стадии стеатоза и чаще всего НАЖБП является случайной находкой при УЗИ (ультразвуковое исследование). При этом процесс неуклонно прогрессирует.

В патогенезе НАЖБП у лиц без ожирения метаболизм холестерина, по-видимому, играет более важную роль по сравнению с НАЖБП при ожирении. Теоретическое обоснование роли холестерина в патогенезе НАЖБП-БО базируется на стимуляции холестерина липогенеза посредством повышения экспрессии печеночного X-рецептора-а и активации синтеза жирных кислот [116, 213].

Ведущим фактором, определяющим прогрессирование НАЖБП, является ФП. Триггерным механизмом этого процесса является трансформация звездчатых клеток Ито в фибробласты. Исследования в этой области далеки от завершения, что не позволяет с уверенностью перейти к определенным стратегиям лечения и профилактики СП [91, 210].

1.2 Особенности развития вторичного стеатоза при вирусных поражениях печени

По данным Ткаченко Л.И. (2016) СП с одинаковой частотой встречается у больных ХГС (39,5%) и В (37,3%) [75]. Ряд исследователей при гепатите С выделяют две формы СП: метаболический и вирус-индуцированный. Метаболический стеатоз может встречаться при всех генотипах вируса и способствовать более быстрой прогрессии вирусиндуцированного фиброза [100, 133]. Остается дискуссионным вопрос, является ли накопление жира в печени ответственным за последующее воспаление или же воспаление, вызванное какой-либо причиной, приводит к дисфункции гепатоцитов с развитием стеатоза.

У большого количества пациентов с гепатитом С выявляется СП, не сопровождающийся общим ожирением и сахарным диабетом. При этом повышение ИМТ и гипертриглицеридемия на фоне даже незначительного стеатоза по мнению некоторых исследователей способствуют прогрессированию фиброза, что позволяет предполагать стеатогенную роль вируса [121]. Есть мнение, что вирус оказывает прямое цитопатическое действие на внутриклеточный инсулиновый сигнальный каскад, что увеличивает риск ИР и развития стеатоза [89, 139, 168].

По данным разных авторов у 20 – 80% больных вирусными гепатитами выявляются увеличение концентрации ТГ (триглицеридов) в крови, качественное изменение липопротеинового спектра, повышение уровня инсулина, индекса НОМА-IR, С-пептида и лептина [15, 70, 75, 150]. При этом небольшое

превышение ИМТ отмечается лишь у 12% пациентов с гепатитом С [15]. Ряд исследователей находили корреляцию стеатоза с уровнем вирусемии и стадией ФП, что свидетельствует в пользу вирус-индуцированного механизма метаболических нарушений [15, 166, 174].

Ряд авторов выявили взаимосвязь HCV-3 со стеатозом и дислипидемией (гиперхолестеринемией) [95, 122]. По другим данным дислипидемия у пациентов с 1 генотипом ассоциирована с высокими значениями ЛПНП (липопротеины низкой плотности), с 3 генотипом – с гипертриглицеридемией, частота встречаемости стеатоза при 3-м генотипе составляет 54,9% [75]. Есть работы, которые демонстрируют сходные изменения метаболических тестов у пациентов с разными генотипами, но отмечают более значимые гиперхолестеринемию и ЛПНП-емию у пациентов с 1-м генотипом, а более выраженные метаболические нарушения маркируют переход в цирроз [15].

В доступной литературе встречается немало исследований, посвященных оценке цитокинового статуса при вирусных поражениях печени. Однако данных об активности цитокинов при вирус-ассоциированном стеатозе недостаточно. Избыточная масса тела при вирусном поражении печени по мнению некоторых исследователей является причиной дополнительной перегрузки гепатоцитов жирными кислотами, а таком состоянии паренхима печени становится более чувствительной к оксидативному стрессу, приводящему к запуску процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), что в свою очередь ведет к повреждению гепатоцитов, воспалению и прогрессированию фиброза [120, 162]. Есть предположение о влиянии провоспалительных цитокинов на инсулярный аппарат, снижение катаболизма инсулина и захвата глюкозой печеночной паренхимой [200].

Нарушения внутрипеченочной гемодинамики и прогрессирование фиброза при вирусном поражении печени нередко связывают с повреждением эндотелиальной выстилки синусоидов. В группах наблюдения у лиц с вирусным гепатитом ЭД встречалась у 62% [78].

Было установлено, что при поражении печени вирусного генеза происходит уменьшение количества ТР с активацией их агрегационной способности [33, 79, 82, 149]. Повышение спонтанной агрегации ТР и тромбоцитоспецифических пептидов может свидетельствовать о длительно текущем процессе внутрисосудистого свертывания, обусловленном активирующим влиянием провоспалительных цитокинов и вируса на систему гемостаза [87]. Было показано, что антикоагуляция уменьшает прогрессирование фиброза у мышей с токсическим гепатитом и фиброзом [153]. Недавняя работа указывает на то, что фибрин способствует регенерации печени, способствуя накоплению внутripеченочных ТР [125].

По мнению ряда исследователей, изменение параметров гемостаза коррелирует с ухудшением течения заболевания [17, 164, 188]. Однако была предложена концепция, согласно которой у пациентов с патологией печени может наступить коагуляционное равновесие за счет уменьшения свертывающих и противосвертывающих факторов [9].

Таким образом, механизм развития стеатоза, характер и выраженность метаболических нарушений, активность цитокинов, степень повреждения эндотелия и нарушений гемостаза при вирусных поражениях печени остается, по нашему мнению, дискуссионным.

1.3 Современные возможности диагностики стеатоза печени

На сегодняшний день диагностика НАЖБП существенно затруднена, что обусловлено необходимостью исключения других заболеваний печени и применения инвазивных методов исследования. До сих пор нет «золотого стандарта» неинвазивной диагностики НАЖБП [177, 217].

Скрининговыми методами диагностики НАЖБП являются УЗИ, определение уровня печеночных трансаминаз, показателей липидного спектра, углеводного обмена, ИР. Рекомендуются также определение показателей,

отражающих функциональное состояние печени: количество ТР, общего белка, альбумина, билирубина, характер коагулограммы [36, 45, 51, 115].

Клиническая картина при НАСП достаточно скудная, у многих пациентов стеатоз протекает бессимптомно. Лабораторная диагностика не всегда позволяет дифференцировать форму НАЖБП. Около 75% пациентов со стойким повышением уровня АЛТ (аланинаминотрансферазы), при отсутствии других явных причин, имеют НАЖБП. Ведущим отличием НАСП от НАСГ является наличие и выраженность синдрома цитолиза. Признаки цитолиза определяются у 50-90% пациентов с НАСГ. При этом трансаминазы не превышают 2–4 верхние границы референтного интервала. Для отличия гистологически верифицированного НАСГ от стеатоза были предложены пороговые значения показателей АЛТ (> 60 ЕД/л) и АСТ ($> 35,2$ ЕД/л). При этом от 30 до 60% пациентов с доказанным биопсией НАСГ может иметь нормальный уровень трансаминаз, что подчеркивает необходимость разработки эффективных маркеров НАЖБП в группах высокого риска [1, 40]. У больных с НАЖБП примерно в 90% случаев уже на стадии стеатоза выявляется повышение уровня ГГТП в среднем до уровня 3–4 верхних пределов нормы. Высокий уровень ГГТП является предиктором выраженного ФП у пациентов с НАЖБП. Дислипидемия выявляется у 55 – 80% больных НАЖБП, у 75% пациентов отмечается повышение уровня глюкозы натощак, изменение глюкозотолерантного теста, повышение инсулина и С-пептида [45, 51, 64].

При форме НАЖБП без ожирения у пациентов также может обнаруживаться дислипидемия, ИР и гипергликемия натощак [141, 194, 211]. При вторичных стеатозах на фоне вирусного поражения печени качественного изменения липопротеинового спектра, гиперинсулинемия, повышение С-пептида и лептина отмечаются по разным данным у 20 – 80% больных [15, 70, 75, 150].

Согласно рекомендациям Европейской ассоциации по изучению заболеваний печени (2016), УЗИ является методом выбора при скрининге стеатоза печени, его чувствительность составляет 60 – 94%, а специфичность 66 – 97%. Однако у пациентов с морбидным ожирением (2–4 степень) эти показатели

снижаются [36, 45, 51]. Методы фиброэластометрия и фиброэластография дают возможность оценить наличие и степень ФП, состояния эластики / плотности печени, а также оценить стадию прогрессирования заболевания [57, 60, 97]. Однако процедура сильно зависит от ИМТ, что ограничивает ее применение при НАЖБП у лиц с ожирением [35, 36, 51, 57].

Морфологическое исследование биоптатов печени дает возможность дифференцировать стеатоз и стеатогепатит, оценить стадию фиброза, а также исключить другие причины поражения печени. Диагноз стеатоза печени верифицируется при наличии в биоптате более 5% печеночных клеток, содержащих депозиты липидов [45, 185]. Биопсия печени рекомендуется в качестве дополняющего неинвазивные исследования метода [36, 45, 51].

В последние годы для диагностики СП был предложен ряд интегральных тестов/индексов/калькуляторов, основанных на моделях соотношения биометрических, клинических и лабораторных показателей: тест NLFS (NAFLD liver fat score), значение которого $> -0,640$ свидетельствует в пользу НАЖБП с чувствительностью 86% и специфичностью 71%, индекс HSI (Hepatic steatosis index), пороговое значение $HSI > 36,0$ свидетельствует в пользу наличия СП у пациента с чувствительностью 93,1% и специфичностью 92,4%, индекс FLI (Fatty Liver Index, «жировой индекс печени»), тест SteatoScreen, включающий 10 маркеров крови, возраст, пол и ИМТ [14, 45, 50, 51, 54, 81, 96, 105, 180, 204, 215].

В рамках диагностики ФП также предложено несколько прогностических моделей и индексов, позволяющих выделить пациентов с выраженным фиброзом и циррозом, в том числе и при НАЖБП: индекс APRI (aspartate aminotransferase to platelet ratio index), индекс AAR (AST/ALT ratio), индекс FIB-4, FibroIndex, Фиброметр (FibroMeter), Фибротест (FibroTest), индекс фиброза (ИФ). В группе пациентов с НАЖБП валидными индексами для выявления ФП являются APRI, BARD, NFS и FIB-4 [45, 51, 87].

Данные индексы рекомендуется использовать в качестве вспомогательных для диагностики СП. Однако часть существующих панелей и расчетных индексов запатентованы, дороги, выполняются с определенными реактивами, либо

включают большой перечень лабораторных тестов и подробный сбор анамнестических данных, что приводит к удлинению времени для постановки диагноза и не позволяет использовать их для широкого скрининга. В связи с этим дальнейшая разработка малоинвазивных общедоступных маркеров стеатоза, позволяющих реализовать их у широкого круга пациентов в настоящее время продолжается.

1.4 Обзор значимых в развитии стеатоза печени полиморфизмов генов

В последние годы повышается интерес исследователей к оценке роли генетических факторов и выявлению генетических детерминант развития и прогрессирования заболеваний. По мнению ряда ученых, эпигенетические особенности могут определять взаимодействие между генами и окружающей средой, оказывать патогенетическое влияние на развитие НАЖБП, играют важную роль в фетальном программировании жировой ткани печени и способствовать увеличению риска развития НАЖБП у потомства [94, 112, 128, 196]. Активное изучение генетических закономерностей возможно позволит в будущем выявлять на доклиническом этапе группы риска развития НАЖБП пациентов и проводить первичную профилактику.

СП является наследуемым признаком [157]. В 27% случаев НАЖБП характерна семейная кластеризация. Результаты исследования, включавшего пробанды с НАЖБП – ЦП и их родственников, показали, что риск прогрессирования фиброза среди родственников первой линии у больных ЦП составляет 18%, что значительно выше, чем риск ЦП в общей популяции [107].

Полногеномный поиск позволил идентифицировать некоторые локусы, ассоциированные с НАЖБП. Доказано ОНП (однонуклеотидный полиморфизм генов) rs738409 (I 148M) гена PLPLA3, кодирующего белок адипонутрин, ассоциирован с увеличением риска развития стеатоза, стеатогепатита и ФП. Показано, что TM6SF2 – 2-й член 6-го трансмембранного суперсемейства (E167K)

и регуляторный белок глюкокиназы (AGCKR) влияют на тяжесть поражения печени, концентрацию ТГ и уровень глюкозы в крови [117, 190].

В последние годы интенсивно изучаются молекулярно-клеточные механизмы развития НАЖБП, связанные с функциональной активностью печеночных рецепторов, в частности, фарнезоидного α -рецептора (FXR) желчных кислот и α -рецепторов α и β (LXR α , LXR β) [1, 34, 103, 149, 214, 219, 221]. Есть данные об ассоциации аллелей и генотипов полиморфного маркера гена адипонектина-1 (ADIPOR1) у пациентов с НАЖБП, свидетельствующие о влиянии данного полиморфизма на содержание жира в печени, развитие ИР и высокие уровни гликозилированного гемоглобина [5, 56, 61].

К значимому аспекту следует отнести наличие полиморфизма генов, регулирующих иммунновоспалительные процессы. Гены цитокинов высокополиморфны. Количество исследований, направленных на изучение связи полиморфизма генов TNF- α и IL6 с развитием НАЖБП, невелико, а результаты порой противоречивы.

Так, например, соотношение частот аллелей (А к G) по -308G> А полиморфному маркеру гена TNF у населения Азиатско-Тихоокеанского региона составляет 1,2 – 7%, у здоровых жителей Китая – около 3,3%, а в других популяциях находится в пределах от 12 до 24% [222]. По данным Курбатовой и соавторов (2016) носительство аллеля С по -174G> С полиморфизма гена IL6 ассоциируется с развитием НАСГ в российской популяции. Однако в другом исследовании корреляции данного полиморфизма с развитием патологии печени выявлено не было [109]. Есть данные, что полиморфизм генов ДЭ определяет характер течения заболеваний печени [74]. Выявлена ассоциация носительства аллели С в локусе гена VEGFA (G-634C) с хронизацией гепатита вирусного генеза [59, 83, 145].

Известно, что проявление эффектов полиморфных вариантов генов может зависеть от пола, возраста и этнической принадлежности их носителей. Популяционные, расовые и региональные особенности распределения генотипов, разные методические подходы при анализе ассоциаций заболеваний с

полиморфными маркерами могут обуславливать противоречивость полученных результатов [42, 65, 191].

По мнению ряда ученых, определение региональных особенностей генетических мутаций при оценке риска развития НАЖБП имеет значение для отечественной популяции в целом [30, 40, 44, 65].

1.5 Возможности экспериментально исследования механизмов развития стеатоза печени и поиска эффективных гепатопротекторов

1.5.1 Экспериментальные модели неалкогольной жировой болезни печени

В настоящее время нет четкого понимания причин и механизмов развития НАЖБП, в связи с чем отсутствуют и эффективные методы терапии и профилактики этого заболевания. В изучении этиологии и патогенеза НАЖБП ключевая роль принадлежит адекватным экспериментальным моделям. В современной литературе описан целый ряд алиментарно-индуцированного экспериментального моделирования СП у лабораторных крыс и мышей. До недавнего времени было широко распространено мнение, что воспроизведение патогенетических особенностей НАЖБП на животных затруднено или невозможно без использования гепатотоксинов, диет с недостаточным содержанием питательных веществ (например, диеты с дефицитом метионина и холина) или определенных макроэлементов, что часто несопоставимо с рационом человека. Так, Н.М. Макарова и соавторы (2018) предложили моделировать НАЖБП у мышей с применением метионин-холин-дефицитной диеты в течение 4-х недель. К концу этого срока формируется тяжелая форма стеатогепатита (при гистологическом исследовании обнаруживается жировая, баллонная дистрофия гепатоцитов, воспалительная инфильтрация печени), развивается синдром

цитолиза (повышается активность печеночных трансаминаз), повышается концентрация провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО-альфа). Эта модель основывается на нарушении обмена фосфатидилхолина, что приводит к нарушению структуры мембраны гепатоцитов [47]. Недостатками этого метода является высокая смертность животных, а также тот факт, что большинство патогенетических аспектов формирования НАЖБП отличаются от классического течения: отсутствует ИР, происходит значительная потеря мышечной массы, что существенно ограничивает возможность применения данной модели.

В последнее время возобновился интерес к созданию диетических моделей НАЖБП с более высоким сходством с диетами человека. Новые диетические протоколы часто содержат высокий уровень фруктозы или сахарозы, высокое содержание насыщенных жиров и холестерина.

Существуют модели формирования НАЖБП при помощи высокожирового рациона питания (диапазон содержания жира от 32 % до 60 %). Необходимо отметить значительную неоднородность в отношении типа используемого жира. Часто как базовый источник жира используется сало (в основном насыщенный животный жир), нередко в сочетании с соевым маслом, смесью насыщенных и ненасыщенных липидов [182]. Добавление соевого масла, по-видимому, усиливает опосредованное холестерином повреждение функции митохондрий, усиливая окислительный стресс, воспаление и фиброз в печени [131]. В.Н. Байматов и соавторы для моделирования СП использовали кукурузное масло (40% жира от общей калорийности рациона), в результате на 22-е сутки формировался стеатоз, сопровождающийся ожирением [8].

В работе 2018 года описывается модель НАЖБП с введением в рацион 10% сала и 2% холестерина. Патогенные питательные вещества, как правило, оказывают синергическое действие. Добавление холестерина способствует более быстрому формированию стеатогепатита и фиброза, повышает уровень ТГ и холестерина в сыворотке крови, а также увеличивает рост гепатоцитов и концентрацию TNF в печени, что указывает на выраженное ее повреждение [152].

В современной литературе часто обсуждаются модели диет для грызунов, сочетающие высокое содержание жира и углеводов (фруктозы и сахарозы). Так, О.В. Корнюшин и соавторы (2019) для моделирования НАЖБП предлагают использовать в течение 60-ти дней высококалорийную диету, содержащую 22% жиров, 48% углеводов и 20 % белков [38].

В качестве примера можно также привести диету с высоким содержанием жиров в сочетании с фруктозой, предложенную S.K. Ranchor и соавторами (2012), включающую сгущенное молоко, говяжий жир и фруктозу. Через 16 недель у животных формируется НАЖБП, сопровождающаяся увеличением массы тела, гепатомегалией, гиперхолестеринемией, гипертриглицеридемией, гипергликемией, увеличением концентрации печеночных трансаминаз и щелочной фосфатазы, воспалительной и жировой инфильтрацией гепатоцитов, фиброзом [171]. Включение в рацион умеренного количества холестерина (0,2 %) в сочетании с высоким содержанием жира и фруктозы усугубляет стеатоз, способствует развитию воспаления в печеночной ткани, повышает уровень глюкозы в крови и формирует резистентность к инсулину через 14 недель [142]. Аналогичные метаболические изменения и жировую инфильтрацию печени отмечают С.В. Оковитый и соавторы (2018) при моделировании стеатоза с использованием смеси 63 % стандартного корма, 19% животного жира, 10% сахарозы, 2 % холестерина и 8% изолированного соевого белка [55].

Общепризнано, что сахара, являясь важным источником энергии, могут оказывать пагубное воздействие на печень. Резкое увеличение распространенности ожирения, МС и НАЖБП многие ученые связывают с значительным возрастанием потребления сахарозы (столовый сахар, состоящий из одной молекулы глюкозы и одной молекулы фруктозы) и собственно фруктозы. Фруктоза широко применяется в напитках (газированных, спортивных и т.д.), десертах, выпечке, шоколаде, конфетах, молочных продуктах. В США потребление фруктозы за последние три десятилетия выросло более чем вдвое, при этом в среднем 6,5 % от общего количества ежедневных калорий приходится на подслащенные напитки [184]. Чрезмерное потребление продуктов питания,

содержащих большое количество фруктозы, связывают с возросшей заболеваемостью НАЖБП и развитием более тяжелых ее форм [110].

Фруктоза широко изучалась в контексте заболеваний печени, ожирения и диабета на протяжении многих десятилетий. Она, как известно, способствует липогенезу *de novo* в печени, накоплению липидов и резистентности к инсулину [93, 137]. В отличие от глюкозы, фруктоза почти полностью выводится из циркуляции печенью через транспортер GLUT5, довольно быстро образуется большое количество ацетил-КоА, часть которого используется для производства АТФ в цикле лимонной кислоты; однако этот цикл быстро перегружается, и оставшийся ацетил-КоА направляется в пути липогенеза *de novo* [113].

В метаанализе, проведенном С.Р. Тоор и S. Gentili (2016), описано 26 исследований продолжительностью от 3 до 38 недель, в которых изучалось влияние пищевой фруктозы на грызунов. Установлено, что концентрации от 10 % до 21 % жидкой фруктозы связаны с увеличением набора веса, уровня глюкозы в крови, уровня инсулина и уровня ТГ в плазме [203]. Ученые также приходят к выводу, что жидкой фруктозы в указанных концентрациях достаточно для индуцирования признаков МС и СП; при этом экспериментальная модель с использованием жидкой формы является более подходящим вариантом, чем модель с твердой кристаллической фруктозой (содержание >60 %), т.к. жидкая фруктоза позволяет избежать использования нереально высокого количества фруктозы в твердой форме, что не соответствует рациону питания человека. Кроме того, доказано, что твердая форма в большей степени, чем жидкая фруктоза стимулирует развитие НАСГ, тогда как жидкая прежде всего способствует накоплению липидов в печени [203]. Существуют доказательства того, что жидкие и твердые сахара метаболизируются по-разному и вызывают разные физиологические и патологические реакции [163].

Фруктоза, глюкоза и сахароза являются наиболее потребляемыми сахарами; но только в последнее время появились исследования, показывающие, как эти сахара соотносятся с их гепатотоксическими свойствами.

Сравнивая результаты употребления 30 % водного раствора фруктозы и 30 % водного раствора глюкозы животными в эксперименте, S. Softic и соавторы (2017) установили, что каждый моносахарид по-разному влияет на увеличение веса, метаболический фенотип и экспрессию генов [195].

К. Mock и соавторы (2017) выявили, что у крыс, в диету которых был включен кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы, наблюдался высокий уровень липогенеза *de novo* в печени и развитие стеатоза. Эти исследования также предполагают, что комбинация фруктозы и глюкозы может быть более гепатотоксичной, чем одна фруктоза [165].

Доказано, что смесь моносахаридов глюкозы и фруктозы ускоряет попадание фруктозы в печень после перорального приема. Это позволяет предположить, что глюкоза усиливает гепатотоксические эффекты фруктозы [90]. Эти результаты подчеркивают различия в физиологической реакции на пищевые сахара и указывают на то, что не все диеты с высоким содержанием сахара эквивалентны.

В диссертационном исследовании Т.В. Брус (2018) представлена модель с применением рациона, содержащего 60% фруктозы. В результате в течение 5 недель у крыс сформировался стеатогепатит, при этом на 37-е сутки была зафиксирована 30%-ная летальность. В этой же работе автор для моделирования СП использовал 10%-й раствор фруктозы вместо питьевой воды на протяжении всего эксперимента (37 суток). Добавление в питьевую воду фруктозы (10%-й раствор) вызывает умеренные изменения метаболизма животных, не приводящие к формированию воспаления и фиброза в ткани печени, что соответствует особенностям патогенеза стеатоза [10].

Таким образом, на сегодняшний день существует целый ряд подходов к моделированию НАЖБ у экспериментальных животных. Выбор модели должен базироваться на поставленной цели и задачах конкретного исследования.

В своей работе мы опирались на следующие критерии выбора экспериментальной модели стеатоза: она должна быть наиболее физиологически ревалентна стеатозу высокоуглеводной диете с применением 15%-го раствора

фруктозы вместо питьевой воды с формированием метаболических, гистологических и морфометрических изменений, характерных для данной патологии; обеспечивать максимальную возможность экстраполяции полученных данных на человеческий организм, возможность сформировать стеатоз в наиболее короткие сроки; немаловажными критериями также являются легкая воспроизводимость и финансовая доступность.

После проведения сравнительного анализа экспериментальных моделей СП мы остановили свой выбор на высокоуглеводной диете с применением 15%-го раствора фруктозы вместо питьевой воды (моделирование стеатоза печени по Т.В. Брус (2018) в нашей модификации) [10].

1.5.2 Перспективы изучения в эксперименте Джинуры Прокумбенс в качестве гепатопротекторного средства при стеатозе печени

На сегодняшний день, в практической медицине нет стандартизированных схем лечения НАЖБП [118]. Эффективность многих препаратов не подтверждена клиническими исследованиями, и продолжаются обсуждения по применению тех или иных лекарственных препаратов. Первоначальными целями терапии НАЖБП являются предотвращение прогрессирования стеатоза в стеатогепатит, фиброз и цирроз, и снижение рисков сердечно-сосудистых осложнений [206].

Существующие алгоритмы консервативного лечения включают низкокалорийную диету (средиземноморская диета, ограничение потребления жиров до 25% от суточной калорийности) и физические упражнения [27].

Безусловно, пациентам с ожирением и с НАЖБП необходимо поддержание здорового образа жизни, однако при лечении НАЖБП требуется фармакотерапия. В современной медицине в качестве медикаментозной терапии НАЖБП применяют ряд нестандартизированных средств, используемых в основном для лечения заболеваний иных нозологий. К примеру, препараты для лечения сахарного диабета 2 типа (бигуаниды, ингибиторы дипептидил-

пептидазы-4), лекарства из группы препаратов, позволяющих снизить массу тела (агонисты рецептора глюкагоноподобного пептида-1, липаз), и препараты, способствующие растворению холестериновых желчных камней (урсодезоксихолевая кислота). Ни один из препаратов не показал высокой лабораторно-клинической эффективности, и первые две группы представленных препаратов рекомендовано применять с ограничением связи с побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта. Остается актуальной проблема разработки медикаментозного лечения НАЖБП.

В последние десятилетия в литературе появились данные о лекарственном растении Джинура Прокумбенс и эффективности его применения при целом ряде заболеваний. Джинура Прокумбенс носит официальное международное название *Gynura Procumbens*, растение из сложноцветного семейства астровых. Оно изначально произрастало в тропических лесах, в основном в западной части Африки, юго-восточной части Азии и на острове Новая Гвинея. Со временем география распространения расширилась, и сегодня Джинуру Прокумбенс выращивают в целом ряде стран – Таиланд, Кипр и др. В местах произрастания Джинура Прокумбенс с давних времен прославилась своими лечебными свойствами. В рамках данной диссертации для нас актуален гепатопротективный эффект Джинуры Прокумбенс [126].

Недавно были проведены экспериментальные исследования учеными из Японии, Китая, Таиланда и Сингапура, которые были направлены на изучение компонентного состава и лечебных эффектов растения. Авторы, изучавшие химико-лабораторный состав растения, установили, что все его части содержат множество биологически активных веществ. С медицинской точки зрения основной интерес привлекает большое процентное содержание клетчатки, растительного белка, каротиноидов, флавоноидов, алкалоидов и эфирных масел, оказывающих лечебно-профилактические эффекты и, прежде всего, за счет расщепления до мономерных соединений. Наиболее изученными соединениями считаются димеры хлорогеновой кислоты, цинарин, полифенолы, миракулин, тауматиноподобные белки и смесь бета-стиролов. Данные соединения оказывают

гипотензивный, антиканцерогенный, антигипергликемический, антигиперлипидемический и антиоксидантные эффекты. Среди эфирных масел терапевтическими свойствами обладают смеси β -ситостерина и стигмастерола, β -ситостерила и стигмастерилгликозидов [26]. В нескольких исследованиях были подтверждены антиоксидантные свойства β -ситостеринов, которые в эксперименте на бета-клетках поджелудочной железы крыс показали протективный эффект. Растительные стерины увеличивают секрецию инсулина, повышают жизнеспособность клеток, подавляют уровень α -гликозидазы, снижают уровень ПОЛ и увеличивают синтез мышечного гликогена в организме. На этом механизме основываются гипогликемические и антиоксидантные свойства растения Джинуры Прокумбенс. На основании полученных данных исследователи пришли к выводу о положительном влиянии β -ситостеринов при МС у пациентов с ожирением [19, 37, 62, 126, 154, 197]. По данным литературы экстракт из стеблей Джинуры Прокумбенс снижает уровень АЛТ и накопление липидов в печеночной ткани [132].

Таким образом, на сегодня актуальны исследования, направленные на изучение гепатопротекторных свойств Джнуры Прокумбенс при СП с целью возможного ее применения в качестве фитотерапии НАЖБП.

Резюме

Неалкогольная жировая болезнь печени — одно из самых распространенных хронических заболеваний печени в мире и носит сегодня характер пандемии. Начинаясь бессимптомно со стеатоза печени, она постепенно может прогрессировать до воспалительных изменений — стеатогепатит, а затем до ФП и ЦП. Помимо классической формы НАЖБП у лиц с ожирением стали выделять НАЖБП худых и НАЖБП у лиц без ожирения (с нормальным и повышенным ИМТ), которые также неуклонно растут в популяции и составляют

до 30%. Распространенность вторичного стеатоза у больных вирусными поражениями печени колеблется от 30 до 80%.

Учитывая скудность клинико-лабораторной картины СП, актуальным является разработка малоинвазивных и доступных методов его верификации.

Однонуклеотидные замены в локусах генов приводят к изменениям в структуре белка и могут оказывать влияние на развитие патологических изменений в печени. Изучение генетических закономерностей возможно позволит в будущем выявлять на доклиническом этапе группы риска развития стеатоза и проводить первичную профилактику, а зная генетический профиль пациентов по полиморфным локусам генов, можно будет прогнозировать развитие заболевания и индивидуализировать терапию.

Исследование патогенетических и саногенетических аспектов СП необходимо проводить с использованием адекватных экспериментальных моделей, преимущество которых является возможность изучить морфофункциональные изменения этого органа, сходные с таковыми у человека, но формирующиеся за более короткое время. Они также незаменимы для исследования эффективных методов терапии и профилактики этого заболевания. У животных СП может быть воспроизведен разными способами. В последнее время возобновился интерес к созданию диетических моделей НАЖБП с более высоким сходством с диетами человека (высокожировой рацион питания, введение в рацион холестерина, высококалорийные диеты с сочетанием жира и углеводов, использование избыточного количества сахаров). Проанализировав достоинства и недостатки различных методов моделирования СП, мы остановили свой выбор на высокоуглеводной модели с применением 15%-го раствора фруктозы вместо питьевой воды как на более релевантной стеатозу у человека, легковоспроизводимой и финансово доступной.

Лекарственное растение Джинура Прокумбенс из семейства астровых является потенциальным природным источником соединений с различными фармакологическими эффектами и обладает высоким терапевтическим потенциалом для лечения различных заболеваний. В связи с этим представляет

интерес изучение гепатопротекторных свойств растения Джинуры Прокумбенс при СП с целью его применения в качестве средства для фитотерапии и профилактики НАЖБП.

В этой связи нам представляется актуальной задача комплексного изучения механизмов стеатогенеза в клинике и в эксперименте, разработка общедоступных и эффективных маркеров их верификации, определение генетических рисков развития и прогрессирования СП и методов его профилактики и лечения.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн экспериментально-клинического исследования

Схема дизайна экспериментально-клинического исследования представлена на рисунке 1.

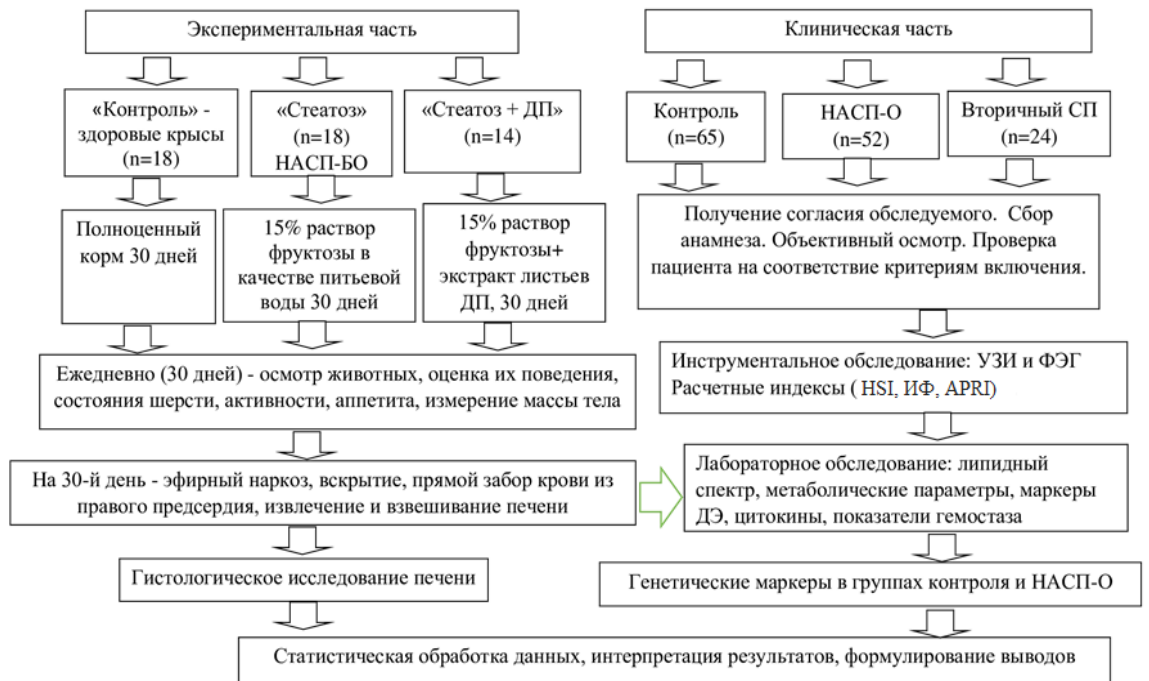


Рисунок 1 – Дизайн экспериментально-клинического исследования

2.2 Экспериментальное исследование

2.2.1 Характеристика лабораторных животных, условия их содержания, описание экспериментальных групп

Исследование проводилось на 50-ти неинбредных половозрелых белых крысах-самцах. Учитывая, что наибольшему риску развития НАЖБП подвержены люди в возрасте 40–60 лет, в эксперименте были использованы животные в возрасте 8–9 месяцев, массой тела 400–530 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария ЦНИЛ ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России в соответствии с Директивой № 63 от 22 сентября 2010 года Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ПГМУ.

Животные содержались в стандартных клетках, предназначенных для содержания грызунов, по 4–5 особей в клетке при температуре 20–22оС. Оборудование клеток включало решетчатые крышки из нержавеющей стали с углублениями для установки флакона поилки объемом 500 мл и секции для корма (рис. 2). Доступ к пище и воде не ограничивался. Подстилочный материал – опилки из лиственных пород деревьев, подвергавшиеся предварительной стерилизации.



Рисунок 2 – Содержание лабораторных животных

Световой режим соответствовал схеме: с 08:00. до 20:00 (12 часов) – свет («день»); с 20:00 до 08:00 (12 часов) – темнота («ночь»).

Ежедневно производились осмотр животных, оценка их поведения, состояния шерсти, активности, аппетита; осуществлялось измерение массы тела.

В конце эксперимента, на 30-й день, крыс подвергали эфирному наркозу путем их помещения в эксикатор с парами эфира, производили вскрытие и прямой забор крови из правого предсердия для лабораторных исследований (рис. 3), извлечение печени (рис. 4), взвешивание (рис. 5) и гистологическое исследование.



Рисунок 3 – Забор крови из правого предсердия



Рисунок 4 – Извлечение печени у лабораторных животных



Рисунок 5 – Взвешивание печени лабораторных животных

Для реализации поставленных в работе задач были сформированы 3 группы животных.

Группа 1 – «Контроль» (n=18) – здоровые, интактные животные. Для кормления этой группы использовался полноценный сбалансированный

стандартный гранулированный корм, одобренный для лабораторных животных (крыс и мышей) (ООО «Лабораторкорм», Россия).

Группа 2 – «Стеатоз» (n=18). Кормление осуществляли аналогично животным первой группы с использованием 15%-ного раствора фруктозы в качестве питьевой воды.

Группа 3 – «Стеатоз + ДП (Джинура Прокумбенс)» (n=14) – крысы, у которых моделировали стеатоз аналогично тому, как это осуществлялось в группе «Стеатоз печени». Одновременно, с первого дня исследования, проводили ежедневное интрагастральное введение экстракта листьев Джинуры Прокумбенс (производство Via Vitae Estate, Кипр) с помощью зонда, из расчета 0,5 г на 1 кг веса животного в день, однократно, на протяжении 30 суток [130].

В связи с большим объемом лабораторных исследований и необходимостью получения достаточного количества крови животных в каждой группе случайным образом делили на две подгруппы. У крыс первой подгруппы забирали кровь для биохимических исследований и определения ИЛ-6 и ФВ, второй подгруппы – для изучения показателей гемостаза. У всех животных забирали печень для морфометрических и гистологических исследований.

2.2.2 Характеристика экспериментальной модели фруктозоиндуцированного стеатоза печени

Моделирование СП проводили путем использования в качестве питьевой воды 15%-го раствора фруктозы на протяжении всего эксперимента. Раствор готовился ежедневно с использованием твердой кристаллической фруктозы и чистой питьевой воды, помещался в поилки и находился в свободном доступе для животных. Данная модель была предложена Т.В. Брус (2018) [10]. После проведения сравнительного анализа экспериментальных моделей СП, наиболее часто применяющихся в современных исследованиях, мы остановились на этой, как на наиболее ревалентной стеатозу у человека с формированием

метаболических, гистологических и морфометрических изменений, характерных для данной патологии. Эта модель не приводит к формированию воспаления и фиброза в ткани печени, легко воспроизводима и финансово доступна. С целью более быстрого моделирования стеатоза мы модифицировали данную модель: использовали 15%-й раствор фруктозы (вместо 10%-го, предложенного автором) и сократили сроки эксперимента до 30 дней (вместо 37).

2.2.3 Тактика применения и состав исследуемого препарата

Введение экстракта *Gynura Procumbens* осуществляли с первого дня исследования, через один час после начала светового периода. Проводили ежедневное внутрижелудочное введение экстракта листьев Джинуры Прокумбенс (производство Via Vitae Estate, Кипр) с помощью зонда, из расчета 0,5 г на 1 кг веса животного в день, однократно, на протяжении 30 суток (рис. 6, 7). Данная дозировка экстракта Джинуры Прокумбенс была предложена Z. Nassan и соавторами (2010) в экспериментальном исследовании, посвященном изучению антидиабетического эффекта этого растения [130].



Рисунок 6 – Взвешивание экстракта Джинуры Прокумбенс



Рисунок 7 – Интрагастральное введение экстракта Джинуры Прокумбенс

По данным производителя экстракт листьев Джинуры Прокумбенс содержит: белок – 1,24 г/100 г, углеводы – 1,5 г/100 г, жиры – 0,79 г/100 г, пищевые волокна – 2,4 г/100 г, витамин С – 11,2 мг/100 г, астрагалозид – 0,013 мг/100 г, флавоноиды (общее количество) – 5г/100 г, кемпферол – 0,034 мг/100 г, апигенин – 0,056 мг/100 г, лютеолин – 0,024 мг/100 г, кверцетин – 0,021 мг/100 г, а также кофеилхиновые кислоты, стероиды, каратиноиды, эфирные масла, сапонины, дубильные вещества и терпеноиды, 14 аминокислот (пролин, лейцин, цистеин, аргинин, таурин и др.), органические кислоты (яблочная, лимонная, янтарная, масляная, фумаровая); микро- и макроэлементы (мкг/кг): С, В, Na, Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Fe, Br, Pt, Au, Ag, I.

2.2.4 Лабораторное и гистологическое обследование экспериментальных животных

Кровь у лабораторных животных забирали из правого предсердия с помощью вакуумных систем. Лабораторное обследование экспериментальных животных включало в себя определение следующих биохимических показателей: АЛТ, АСТ (аспартатаминотрансфераза), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего белка, альбумина, глюкозы, ХС, ТГ, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП. Эти параметры исследовали в сыворотке крови на автоматическом анализаторе «Mindray» (Китай) с использованием реагентов этой же фирмы.

Концентрацию (ИЛ-6) определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) на аппарате Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с использованием набора «High Sensitive ELISA Kit for Interleukin 6 (IL6)» фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай).

Количественное определение функциональной активности ФВ в плазме крови проводилась на агрегометре модели 230LA НПФ БИОЛА (г. Москва). Построение калибровки и последующий расчет активности ФВ в исследуемой плазме осуществлялся с помощью программы AGGRWB (рис. 8).

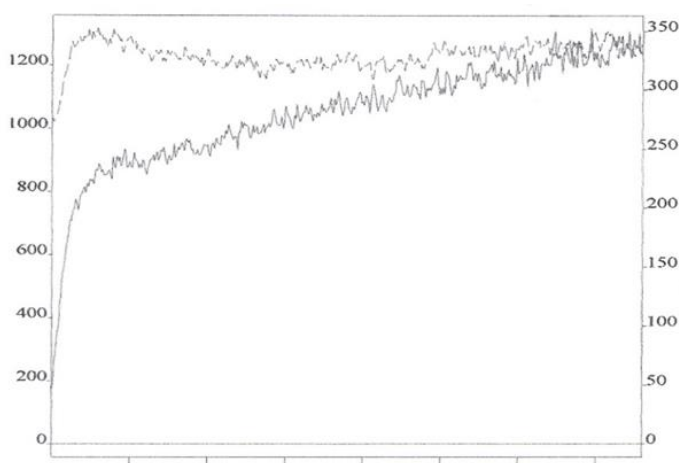


Рисунок 8 – Кривая измерения функциональной активности фактора Виллебранда в исследуемой плазме крови лабораторных животных

Оценка агрегационной активности ТР осуществлялась в образце обогащенной ТР плазме, стабилизированной антикоагулянтом цитратом натрия

турбидиметрическим методом и методом, основанным на оценке среднего размера агрегатов в реальном времени на агрегометре модели 230LA НПФ БИОЛА (г. Москва). В качестве индукторов/агонистов агрегации применяли АДФ производства НПО «РЕНАМ» (г. Москва).

На рисунке 9 представлен пример записи агрегатограммы с агонистом АДФ и пример нарушения агрегации.

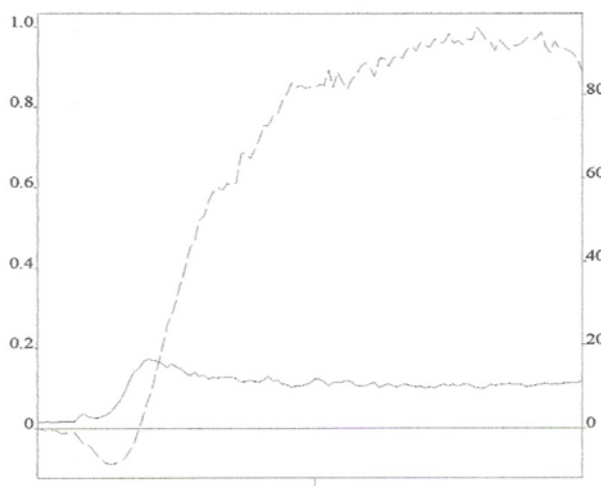


Рисунок 9 – Запись агрегатограммы с агонистом АДФ

Определение показателей коагуляционного гемостаза: протромбинового времени (ПВ), тромбинового времени (ТВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), фибриногена и Хагеман-зависимого фибринолиза (ХЗФ) проводилось на оптико-механическом коагулометре «АПГ-4-02» («ЭМКО», Россия, г. Москва) наборами фирмы «Технология-стандарт» (Россия, г. Барнаул).

По окончании опыта сразу после взятия крови вскрывали брюшную полость, извлекали печень, определяли массу печени и массовый коэффициент (МК), который рассчитывали по формуле: $МК = \frac{\text{масса печени (г)}}{\text{масса тела (г)}} * 100\%$.

Для гистологического исследования забирали центральную часть левой боковой доли печени. Для окраски срезов тканей гематоксином и эозином

фрагменты ткани печени помещали в 10% забуференный нейтральный формалин, для использования окраски срезов суданом III – в физиологический раствор.

Гистологическое исследование проводили с окраской срезов тканей гематоксилином и эозином и суданом III по Герксгеймеру. Для подтверждения наличия нейтральных липидов в цитоплазме гепатоцитов и уточнения степени стеатоза в группе «Стеатоз» пять образцов были исследованы с помощью окраски замороженных срезов суданом III, без докраски гематоксилином и эозином. При микроскопии оценивали наличие признаков стеатоза – число гепатоцитов с включениями липидов, наличие скоплений клеток воспалительного инфильтрата и баллонной дистрофии, определяли процент гепатоцитов со стеатозом и индекс (степень) стеатоза; наличие признаков воспаления и фиброза (по Kleiner, 2005) [51]. Диагноз СП верифицировался при наличии в биоптате более 5% печеночных клеток, содержащих депозиты липидов [185].

Градация индекса (степени) стеатоза по Kleiner:

0 – менее 5% гепатоцитов в состоянии жировой дистрофии

1 – 5–33% гепатоцитов в состоянии жировой дистрофии

2 – 34–66% гепатоцитов в состоянии жировой дистрофии

3 – более 66% гепатоцитов в состоянии жировой дистрофии

Стадии воспаления по Kleiner:

0 – очагов нет

1 – менее 2-х очагов на 200 полей зрения

2 – 2-4 очага на 200 полей зрения

3 – более 4-х очагов на 200 полей зрения

Стадии фиброза по Kleiner:

0 – фиброза нет

1 – перисинусоидальный/перипортальный фиброз

1A – начальный, 3 зоны, перисинусоидальный

1B – умеренный, 3 зоны, перисинусоидальный

1C – портальный/перипортальный фиброз

2 – выраженный фиброз

4 – цирроз

Методика окраски гематоксилином и эозином

Фрагменты ткани печени 1x1x0,4 см, помещенные в гистологические кассеты, фиксировали в 10% забуференном формалине на протяжении 48 часов. Фрагменты органов обезвоживали путем проводки в изопропиловом спирте, затем заливали в гистологический парафин. Из полученных парафиновых блоков на роторном микротоме изготавливали гистологические срезы с последующим помещением их на покровное стекло. Для окраски гистологических срезов гематоксилином и эозином использовали «Набор готовых растворов для проведения основной окраски гистологического материала», включающий гематоксиллин Майера, эозин спиртовой и эозин водный (производство «Биовитрум», арт. 07-006). После депарафинизации и регидратации на гистологические срезы наносили гематоксиллин Майера (время экспозиции – 1 минута), затем промывали в проточной воде (5 минут). После этого срезы обрабатывали водным эозином (время экспозиции – 10 секунд), далее промывали в дистиллированной воде (5 минут). Окрашенные срезы покрывали средой для заключения гистологических препаратов Био Маунт и покровным стеклом.

В гистологических препаратах печени при окраске гематоксилином и эозином определяются гепатоциты с признаками мелко- и крупнокапельной жировой дистрофии в виде оптически пустых вакуолей в цитоплазме клеток, распространенной преимущественно центрлобулярно и на периферии печеночных долек (рис. 10).

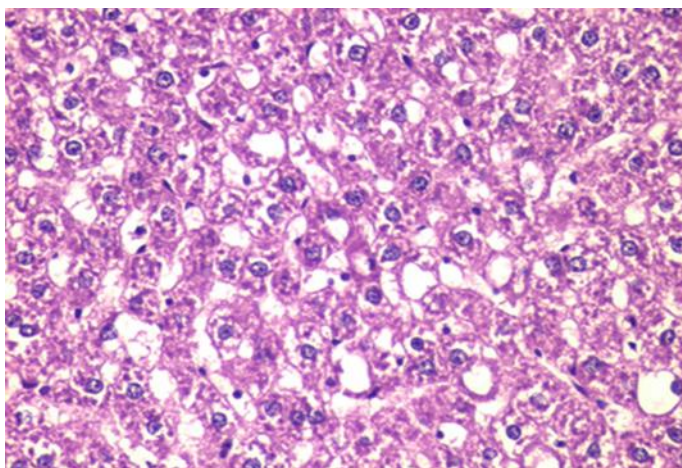


Рисунок 10 – Изменения в ткани печени у животных с характерными признаками стеатоза, гистологические срезы (окраска гематоксилином и эозином), увеличение - x400

Методика окраски суданом III по Герксгеймеру

После вскрытия печень лабораторных животных помещали в физиологический раствор, доставляли в гистологическую лабораторию для проведения исследования (время хранения органов в растворе не более 1 часа). Для окраски гистологических срезов использовали окраску суданом III по Герксгеймеру (производство «Биовитрум», арт. 20-065). Срезы, полученные на замораживающем микротоме, на предметном стекле переносили в 95% этанол, далее помещали в раствор судана III на 10 минут, далее быстро промывали в 95% этаноле и дистиллированной воде. Окрашенные срезы заключали в водную монтирующую среду и покрывали покровным стеклом (рис. 11).

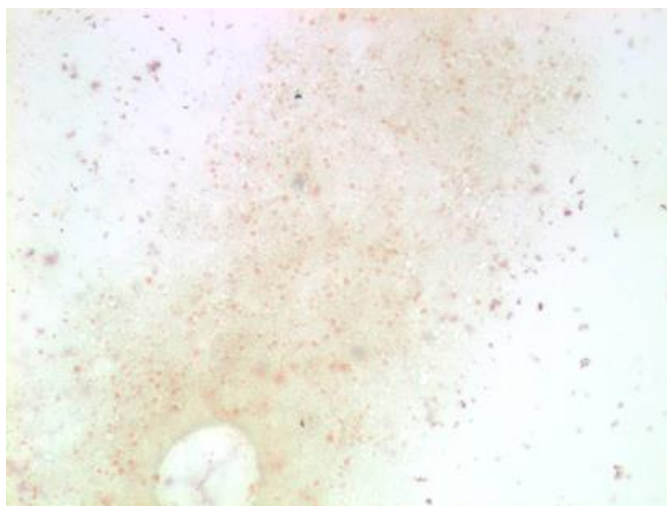


Рисунок 11 – Окраска суданом III, увеличение - х400

2.3 Клиническое исследование

2.3.1 Объем наблюдений. Клинические модели

Исследование проводилось на протяжении 2016-2021 гг. Набор пациентов осуществлялся на базах клинической медико-санитарной части № 1 г. Перми (гастроэнтерологическое и эндокринологическое отделения), ГБУЗ ПК "Городская клиническая больница №2 им. Ф.Х. Грааля" (гастроэнтерологическое отделение) и ГБУЗ ПК «Клиническая инфекционная больница (гепатологический центр). Все участники исследования давали письменное информированное добровольное согласие. Исследование проводилось с соблюдением требований приказа №163 (ОСТ 91500.14.0001-2002) Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также Хельсинской декларации всемирной медицинской ассоциации (Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования, 1993). Также было получено согласие локального этического комитета.

При подборе пациентов использовались следующие критерии включения:

1. Мужчины и женщины в возрасте 18 лет и старше.

2. Письменное согласие пациента на участие в исследовании.
3. Соответствие диагностическим критериям, позволяющее включить больного в одну из двух изучаемых групп (неалкогольный стеатоз печени на фоне ожирения, вторичный стеатоз печени на фоне ХГС).

Пациент не участвовал в исследовании при выявлении хотя бы одного из критериев исключения:

1. Прием алкоголя (для мужчин – более 30 г/день, для женщин – более 20 г/день).
2. Беременность и лактация.
3. Хронические сопутствующие заболевания в стадии обострения или декомпенсации.
4. Фиброзирующий процесс в других органах.
5. Злокачественные новообразования.
6. Аутоиммунные заболевания.
7. Острое воспаление или оперативное вмешательство в предшествующий месяц.
8. Инфекционные заболевания, за исключением вирусного гепатита С.
9. Гепатотропная терапия в предшествующие три месяца.
10. Противовирусная терапия в предшествующий год.
11. Другая хроническая патология печени (аутоиммунный и алкогольный гепатит, первичный склерозирующий холангит, желчнокаменная болезнь, ЦП, болезнь Вильсона, гемохроматоз, очаговые образования в печени, гепатоцеллюлярная карцинома);

Общее количество обследованных составило 141 человек: 76 пациентов с хроническими заболеваниями печени и 65 практически здоровых лиц (группа контроля). Все пациенты были разделены на две группы в зависимости от этиологии заболевания: НАЖБП на фоне ожирения (клиническая форма НАСП-О), вторичный вирус-индуцированный СП (по этиологии – вирус гепатита С).

В первую группу вошли 52 человека с НАСП-О, в том числе 17 мужчин (33%) и 35 женщин (67%). Средний возраст пациентов составил $43,0 \pm 11,1$ лет. В таблице 1 представлены характеристики данной группы.

Таблица 1 – Характеристика группы НАСП-О

| Характеристика | Значение |
|----------------|-----------------|
| Возраст, лет | $43,0 \pm 11,1$ |
| min-max, лет | 25-67 |
| Мужчины, n (%) | 17 (33%) |
| Женщины, n (%) | 35 (67%) |
| ИМТ | $37,2 \pm 2,6$ |

Согласно определению ВОЗ, нормальной массой тела считается значение ИМТ от 18,5 до 24,9 кг/м², повышенной – от 25,0 до 29,9 кг/м², ожирение – более 29,9 кг/м² [12].

В группу НАСП-О включались пациенты с ожирением (ИМТ $29,9$ кг/м²), признаками СП по данным УЗИ, не имеющие синдром цитолиза, а также не менее чем два из нижеследующих критериев [35, 36].

- 1) нарушение обмена углеводов: сахарный диабет 2 типа, нарушение толерантности к глюкозе или нарушенная гликемия натощак;
- 2) увеличение сывороточной концентрации ТГ более 1,7 ммоль/л;
- 3) увеличение сывороточной концентрации ЛПНП более 3,0 ммоль/л;
- 4) снижение концентрации ЛПВП менее 1,0 ммоль/л у мужчин и менее 1,2 ммоль/л у женщин;
- 5) установленный диагноз артериальной гипертензии.

В анамнезе у всех пациентов с НАСП-О было гиперкалорийное питание на протяжении длительного периода времени, но, в то же время, отсутствовало чрезмерное употребление алкоголя (безопасная доза алкоголя (в пересчете на этанол) для мужчин составляет менее 30 г/день, для женщин – менее 20 г/день),

прием лекарственных препаратов и вредные производственные факторы, способные вызвать развитие СП.

Вторую группу составили 24 пациента с вторичным СП на фоне вирусного гепатита С, среди которых было 11 (46%) мужчин и 13 (54%) женщин средним возрастом $37,6 \pm 4,3$ лет. Половозрастной состав и антропометрические характеристики группы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика группы вторичного СП на фоне гепатита С

| Характеристика | Значение |
|----------------|----------------|
| Возраст, лет | $37,6 \pm 4,3$ |
| min-max, лет | 25-65 |
| Мужчины, n (%) | 11 (46%) |
| Женщины, n (%) | 13 (54%) |
| ИМТ | $25,5 \pm 2,5$ |

В группу вторичного вирус-ассоциированного СП включались пациенты с диагнозом ХГС в фазе ремиссии и признаками СП по данным УЗИ, не имеющие в анамнезе НАЖБП. Диагноз вирусного гепатита С был подтвержден обнаружением РНК возбудителя с установлением генотипа и определением уровня вирусной нагрузки в крови больного методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) и серологических маркеров иммуноглобулинов G и M к HCV методом ИФА. Наличие и степень ФП устанавливали методом эластографии.

В контрольную группу вошли 65 практически здоровых лиц средним возрастом $42,3 \pm 7,0$ года без патологии печени (табл. 3).

Таблица 3 – Характеристика группы контроля

| Характеристика | Значение |
|----------------|----------------|
| Возраст, лет | $42,3 \pm 7,0$ |
| min-max, лет | 25-52 |
| Мужчины, n (%) | 30 (46%) |

| | |
|----------------|----------|
| Женщины, n (%) | 35 (54%) |
| ИМТ | 20,7±1,0 |

2.3.2 Общеклиническое обследование

Все участники исследования проходили общеклиническое обследование, включавшее в себя сбор анамнеза, жалоб и уточнению таких факторов, как длительный прием лекарственных препаратов, употребление алкоголя, оперативные вмешательства и гемотрансфузии в прошлом, наличие профессиональной вредности. Оценивалась сопутствующая патология каждого пациента. Измерялся рост и вес пациента. Рассчитывался ИМТ как отношение массы тела, выраженной в килограммах, к квадрату роста, выраженного в метрах [36].

Лабораторные и инструментальные методы диагностики включали в себя общий анализ крови, общий анализ мочи, биохимический анализ крови, флюорографию грудной клетки, электрокардиограмму и УЗИ органов пищеварения. У пациентов с второй группы с вторичным СП оценивались результаты ПЦР, подтверждающие наличие РНК вируса гепатита С и серологические маркеры методом ИФА, а также эластографию печени с целью верификации стадии фиброза. После комплексного обследования каждый потенциальный участник исследования проверялся на соответствие критериям исключения.

2.3.3 Методы лабораторного, генетического и инструментального обследования

Проведено лабораторное обследование 52 пациентов с НАСП-О, 24 больных с вторичным СП и 20 человек группы контроля, включавшее в себя

определение биохимических параметров: АЛТ, АСТ, ГГТП, ЩФ, фракции билирубина, общий белок и альбумин; метаболических показателей (глюкоза, липидный спектр, инсулин, лептин, С-пептид, НОМА-IR); концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6; маркеры повреждения эндотелия – активность ФВ и концентрация ВЭФР; параметры гемостаза – коагулограмма (ТВ, ПВ, АЧТВ, ХЗФ, фибриноген), уровень ТР и агрегатограмма (индуцированная агрегация с индукторами АДФ, коллагеном, адреналином и ристоцетином); концентрация АФП (альфа-фетопротеин) и расчет ИС и ФП (HSI, ИФ, APRI).

Исследовали кровь, взятую из периферической вены локтевого сустава в утренние часы (с 8.00 до 10.00). Взятие венозной крови осуществляли после 15-минутного отдыха обследуемых. Исключался прием алкоголя (за 2 дня), пищи (за 12 часов) и курение (за 2 часа) до взятия крови. Забор венозной крови производили из локтевой вены в вакуумные пробирки.

Биохимические показатели ГГТП (референсные значения 12–64 Ед/л) и альбумин (референсные значения 36–55 г/л) определяли с помощью наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), трансаминазы АЛТ (референсные значения 0–55 Ед/л) и АСТ (референсные значения 5–34 Ед/л), ЩФ (референсные значения 40–150 Ед/л), билирубин общий (референсные значения 8,6–20,4 мкмоль/л), билирубин прямой (референсные значения 0–5,0 мкмоль/л), общий белок (референсные значения 68–83 г/л), глюкозу (референсные значения 3,9–6,1 ммоль/л), ТГ (референсные значения 0–1,69 ммоль/л), ХС (референсные значения 2,4–5,18 ммоль/л), ЛПВП (референсные значения 0,8–1,9 ммоль/л) и ЛПНП (референсные значения 2,59–4,11 ммоль/л) реактивами фирмы «Abbott» (США) на автоматическом биохимическом анализаторе «Architect-4000» (США).

ЛПОНП рассчитывали по формуле: $TG/2,2$, индекс атерогенности (ИА) по формуле - $(ХС-ЛПВП)/ЛПВП$. Концентрацию лептина в сыворотке крови определяли с помощью набора «DSL» (США), инсулина в плазме локтевого сустава - с помощью набора «MONOBIND» (США) методом ИФА на аппарате «Stat-Fax-2100» (Awareness Technology, США). Уровень С-пептида (референсные значения 0,9–6,9 нг/мл), инсулина (референсные значения 1–28 мкМЕ/мл), лептина

(референсные значения 2,05–11,0 нг/мл) и АФП (референсные значения 0–5 МЕ/мл) в сыворотке крови исследовали иммунохемилюминисцентным методом с помощью наборов фирмы Siemens (Германия) на анализаторе «Immulaite-1000» (Германия). Индекс ИР НОМА-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) – показатель, предложенный D.R. Matthews et al. (1985), связан с разработкой математической гомеостатической модели для оценки резистентности к инсулину. Индекс НОМА-IR рассчитывали по формуле: $\text{НОМА-IR} = \text{глюкоза натощак (ммоль/л)} \times \text{инсулин натощак (мкЕд/мл)} / 22,5$ [51].

Концентрацию ФНО- α (диапазон значений для лиц региона Западной Сибири 0–6 пг/мл), ИЛ-6 (диапазон значений для лиц региона Западной Сибири 0–246 пг/мл) и ВЭФР (диапазон значений для лиц региона Западной Сибири 0–10 пг/мл, средняя концентрация 127 пг/мл) в сыворотке крови проводили методом ИФА с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) на планшетном фотометре «Stat-Fax-2100» (США).

Количество ТР определяли в цельной крови на автоматическом гематологическом анализаторе Medonic M20 (BOULE MEDICAL AB, Швеция). Для изучения агрегации ТР и функциональной активности ФВ использовали реактивы «АГРЕНАМ» фирмы НПО «РЕНАМ» (Россия, г. Москва). Исследование проводилось на лазерном оптическом агрегометре «Биола-230LA» НПФ БИОЛА (Россия, г. Москва) с регистрацией изменения пропускания света через кювету с обогащенной ТР плазмой в процессе агрегации ТР под действием индуктора агрегации. По данным производителя НПО «РЕНАМ» в обогащенной ТР плазме здоровых доноров агрегационная активность ТР с АДФ составляет 50–80%, с коллагеном – 50–80% и ристоцетином – 55–90%, функциональная активность ФВ – 50–150%.

Систему плазменного гемостаза и фибринолиз оценивали с помощью наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия, г. Барнаул) на коагулометре «АПГ-4-02» (Россия). Референтные интервалы, указанные в наборах фирмы «Технология-Стандарт» составили для теста ПВ (12–19 сек), АЧТВ (24–38 сек), ТВ (11–14 сек), фибриногена (2–4 г/л), РФМК (до 4,0 мг/мл), ХЗФ (4–12 мин).

Генетическое исследование включало определение ОНП ФНО- α TNF- α (G-308A), интерлейкина-6 IL6 (G-174C) и ВЭФР VEGFA (G-634C) у 52 пациентов с НАСП и 65 здоровых доноров в г. Перми с использованием аллель-специфической ПЦР "SNP-Скрин" ЗАО «Синтол» (г. Москва) с детекцией продуктов в режиме реального времени на амплификаторе «CFX-96» Bio-Rad Laboratories, Inc. (США).

Оценка индивидуального генетического профиля доноров и пациентов с НАСП проводилась с использованием балльной шкалы со следующими значениями:

0 – по трем полиморфизмам пациент гомозиготен по протективным аллелям;

1 – гетерозиготен по одному из двух генов;

2 – гетерозиготен по двум генам;

3 – обследуемый имеет обе аллели риска по одному гену, гомозиготен по протективным аллелям по другому гену;

4 – по одному гену у обследуемого имеются обе аллели риска, по другому гену обследуемый гетерозиготен;

5 – обследуемый по обоим генам гомозиготен по аллелям риска *TNF- α* (AA) / *VEGFA* (CC)

По предложенной шкале при наличии у здоровых доноров 0-1 балла риск развития НАСП оценивается как низкий, 2-3 балла – умеренный, 4-5 баллов – высокий. При выявлении у пациентов 0-1 балла, риск прогрессирования НАСП оценивается как низкий, 2-3 балла – умеренный, 4-5 баллов – высокий.

Показатель, лежащий в референсном интервале, не всегда может считаться нормальным, поскольку диапазон многих из них довольно широк. Влияние возраста, пола, популяционных и региональных особенностей на диапазон референсных значений является значимым для многих лабораторных тестов. Диапазоны референсных величин для одного и того же лабораторного теста могут варьировать по данным разных диагностических лабораторий, поэтому понятия «единого» референсного диапазона не существует. Оценивая результаты

лабораторных исследований, необходимо прежде всего, обращаться к диапазону референсных значений той лаборатории, в которой выполнялся анализ.

Инструментальное обследование включало в себя УЗИ органов брюшной полости и печени у пациентов с НАСП-О и вторичным СП и ультразвуковую эластографию печени у больных СП на фоне гепатита С.

СП определяли на основании УЗИ с использованием аппарата – стационарный ультразвуковой сканер Medison CO, LTD, датчики с частотой 5–7,5 МГц, по традиционной методике при наличии следующих признаков: диффузная гиперэхогенность печени, увеличение эхогенности печени по сравнению с почками, дистальное затухание эхосигнала, обеднение сосудистого рисунка [35, 51].

Оценку выраженности ФП проводили с помощью ультразвуковой эластографии на аппарате Fibroscan 502 (Echosens, Франция). Для оценки стадии ФП у исследуемых лиц методом эластографии были использованы пороговые значения, предлагаемые отечественными гепатологами В.Т. Ивашкиным и Ч.С. Павловым [57].

Пороговые значения плотности печени по данным эластографии:

F0 (фиброз отсутствует) < 5, 8 кПа;

F1 (минимальный фиброз) 5, 9-7, 1 кПа;

F2 (умеренный фиброз) 7, 2-9, 5 кПа;

F3 (выраженный фиброз) 9, 6-12, 5 кПа;

F4 (цирроз) > 12, 5 кПа.

2.3.4 Расчетные индексы стеатоза и фиброза

HSI рассчитывали по формуле: $HSI = 8 \times (АЛТ/АСТ) + ИМТ$ (+2, если женщина; +2, если диабет), где ИМТ – индекс массы тела (ИМТ=масса тела/рост²). При HSI <30.0 СП исключается, при HSI > 36.0 подтверждает СП.

Чувствительность данного метода составляет 93,1%, специфичность – 92,4% [148].

ИФ рассчитывали по формуле: $ИФ = 3,79 - 0,0056 \cdot TP + 0,0855 \cdot ФНО - \alpha - 0,0352 \cdot АЛЬБУМИН$. При его значении от 0 до 0,5 определяют отсутствие фиброза, от 0,6 до 2,5 соответствует умеренной стадии фиброза 1-2, при ИФ более 2,5 верифицируют выраженный ФП стадий 3-4. Диагностическая чувствительность данного способа составила 93,3%, диагностическая специфичность – 88%, при показателе воспроизводимости – 87,5% и соответствия – 81,4% [84].

Индекс APRI рассчитывали по формуле: $APRI = (ACT / (\text{верхний предел } ACT)) \times 100 / \text{тромбоциты } (10^9/л)$. При значении индекса менее 0,5 – значимый фиброз и цирроз исключается, при цифрах более 1,0 – вероятность данных процессов велика [209].

2.4 Методы статистической обработки полученных результатов

Статистическая обработка полученных данных проводилась на ПК с использованием встроенного пакета анализа табличного процессора Excel® 2016 MSO (© Microsoft, 2016), авторского (© В.С. Шелудько, 2001–2016) пакета прикладных электронных таблиц (ППЭТ) "Stat2015". Отдельные расчёты проводились с помощью статистической программы MedCalc® 15.8 Portable (© MedCalc Software, 1993–2014) [80].

При выборе методов статистической обработки изучался характер распределения признаков, для этого использовали критерий Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50), а также показатели асимметрии и эксцесса.

Для анализа количественных признаков (при нормальном распределении исходных данных) применялись: средняя арифметическая (M) и ошибка репрезентативности (стандартная ошибка) средней арифметической (m). При

отклонении от нормального распределения применялись медиана (Me) и квартили (Q_1, Q_3).

Для анализа качественных признаков применялись абсолютные частоты встречаемости (при необходимости), показатели частоты (на 100, 1 000, 10 000 и т.п.), показатели распределения (%) и стандартная ошибка относительных долей (m). Для определения значимости различия дисперсий признаков применялся критерий Фишера F [3].

При оценке статистической значимости различий (p) в независимых выборках для количественных признаков (при нормальном распределении) использовалось сравнение средних (M) с помощью параметрических критериев – двухвыборочный t -критерий; при отсутствии нормального распределения применялся U -критерий Манна-Уитни (U).

Оценка значимости различий для качественных признаков – сравнение распределений и медиан (Me) с помощью непараметрического критерия Хи-квадрат (χ^2) [3, 80]. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Определение зависимости между изучаемыми количественными признаками проводилось с помощью коэффициента корреляции r . Корреляция считалась статистически значимой при $p < 0,05$. Оценка степени зависимости: при $0,00 \leq |r_{XY}| < 0,30$ – зависимости нет; $0,30 \leq |r_{XY}| < 0,70$ – зависимость умеренная; $0,70 \leq |r_{XY}| < 1,00$ – выраженная (при значимости выборочного r_{XY} $p < 0,05$).

Определение зависимости между качественными признаками проводилось на основе таблиц сопряжённости по критерию Хи-квадрат. Зависимость считалась статистически значимой при $p < 0,05$. Степень зависимости оценивалась с помощью коэффициента сопряжённости (информативности) Пирсона (Ki) [80]. Величина Ki (степень зависимости): при $0,00 \leq Ki < 0,30$ – зависимости нет; $0,30 \leq Ki < 0,70$ – зависимость умеренная; $0,70 \leq Ki < 1,00$ – выраженная (при достоверности выборочного Ki $p < 0,05$).

Для оценки корреляции между количественным и качественным признаками количественные признаки преобразовывались в качественные по

принципу: все значения меньше Q_1 обозначались цифрой 1, значения в пределах $Me_{+Q_3}^{-Q_1} - 2$, значения больше $Q_3 - 3$ [80].

При наличии достоверной выраженной зависимости признаков строилось уравнение *множественной регрессии* вида:

$$Y = A_0 + A_1 \cdot X_1 + A_2 \cdot X_2 + \dots + A_n \cdot X_n ,$$

где Y – зависимый (предсказываемый) признак, $X_1 \dots X_n$ – независимые (факторные) признаки, $A_0 \dots A_n$ – числовые коэффициенты. Уравнение регрессии считалось достоверным при оценке с помощью критерия Фишера F при $p < 0,05$. Значение Ry^2 (квадрат коэффициента множественной корреляции), умноженное на 100, позволяло оценить в процентах вклад сочетания факторных признаков $X_1 \dots X_n$ в дисперсию признака Y . Оценка адекватности прогноза проводилась по четырехпольной таблице с расчетом показателей чувствительности и специфичности, а также показателей воспроизводимости и соответствия. Прогноз считался хорошим при чувствительности и специфичности $\geq 90\%$, воспроизводимости $\geq 75\%$, соответствия $\geq 90\%$, удовлетворительным – при чувствительности $\geq 80\%$, специфичности $\geq 75\%$, воспроизводимости $\geq 50\%$, соответствия $\geq 75\%$. Статистическая значимость уравнения регрессии оценивалась по критерию Фишера. Если значимость критерия Фишера была менее 0,05, уравнение считалось статистически значимым. Нулевая гипотеза отвергалась при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Для расчета пороговых значений и диагностической эффективности показателей, имеющих предикторную ценность, проводился ROC-анализ и расчет отношения шансов (QR). Диагностическую значимость и прогностическую ценность каждого параметра оценивали по шкале значений площади под ROC-кривой (Area Under Curve – AUC), которая позволяет выделить отличное, очень хорошее, хорошее, среднее и неудовлетворительное качество моделей. Чем выше показатель AUC, тем большей диагностической и прогностической силой обладает модель.

Результаты статистической обработки данных визуализированы в виде таблиц, рисунков, диаграмм. В тексте и таблицах полученные на выборках средние и относительные величины были представлены (с целью распространения выводов на генеральные совокупности) в виде доверительных (95 %) интервалов: средние величины – $M \pm 2m$ или $Me (x_J - x_K)$, относительные величины – $\% \pm 2m$ (на $100 \pm 2m$).

Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ И ОБОСНОВАНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКЦИИ В ЭТИХ УСЛОВИЯХ

3.1 Летальность экспериментальных животных, результаты исследования массового коэффициента печени и массы тела

При моделировании фруктозоиндуцированного стеатоза печени с использованием вместо питьевой воды 15%-го раствора фруктозы, а также в группе животных, получавших наряду с 15-% раствором фруктозы экстракт Джинуры Прокумбенс, летальности не отмечалось. Эти результаты подтверждают обоснованность выбора применяемой модели.

По окончании опыта и вывода животных из эксперимента определяли массу печени и массовый коэффициент печени (МК). Массовый коэффициент – интегральный показатель, используемый в фармакологических исследованиях для оценки состояния внутренних органов. Массовый коэффициент печени рассчитывали по формуле: $МК = \text{масса печени (г)} / \text{масса тела (г)} * 100\%$. МК был значимо выше в группе «Стеатоз» по сравнению с группой контроля (3,75 (3,38–3,99) и 3,5 (3,3–3,6), соответственно) ($p=0,009$). У животных, получавших ДП, этот показатель был ниже, чем в группе «Стеатоз» и практически не отличался от такового в группе контроля – 3,5 (3,4–3,9) % (рис. 12).

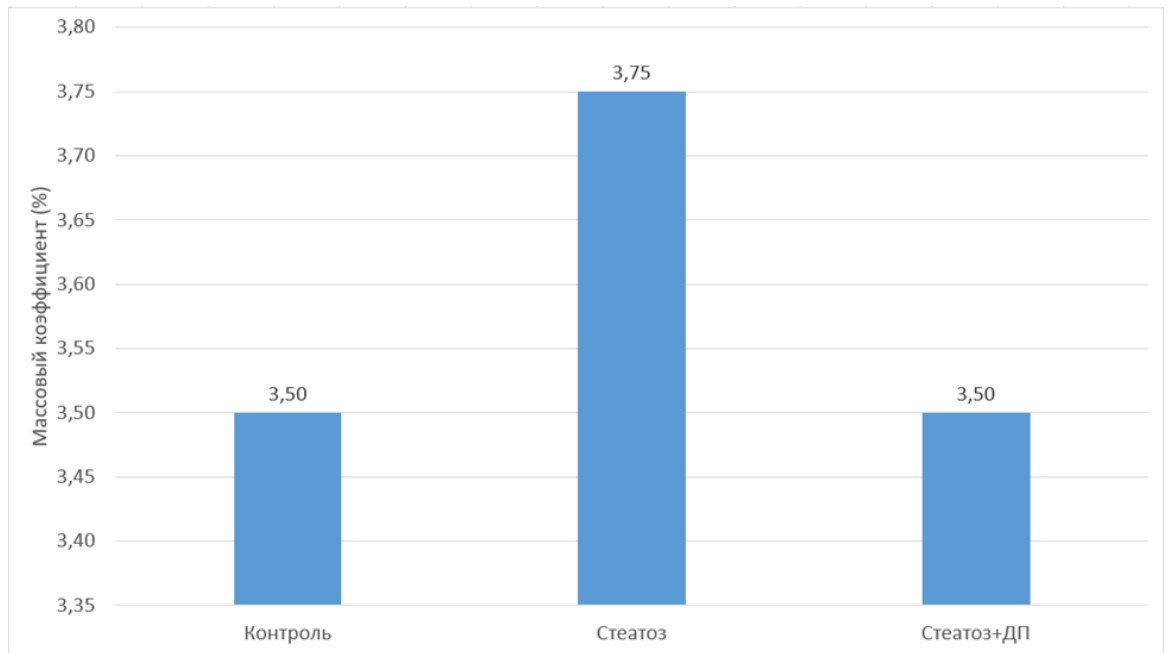


Рисунок 12 – Массовый коэффициент печени в исследуемых группах (%)

При сравнении массы тела до начала эксперимента и по его окончании в каждой группе животных статистически значимых различий не обнаружено, что подтверждает форму НАСП-БО (неалкогольный стеатоз печени без ожирения) в нашей экспериментальной модели (рис. 13).

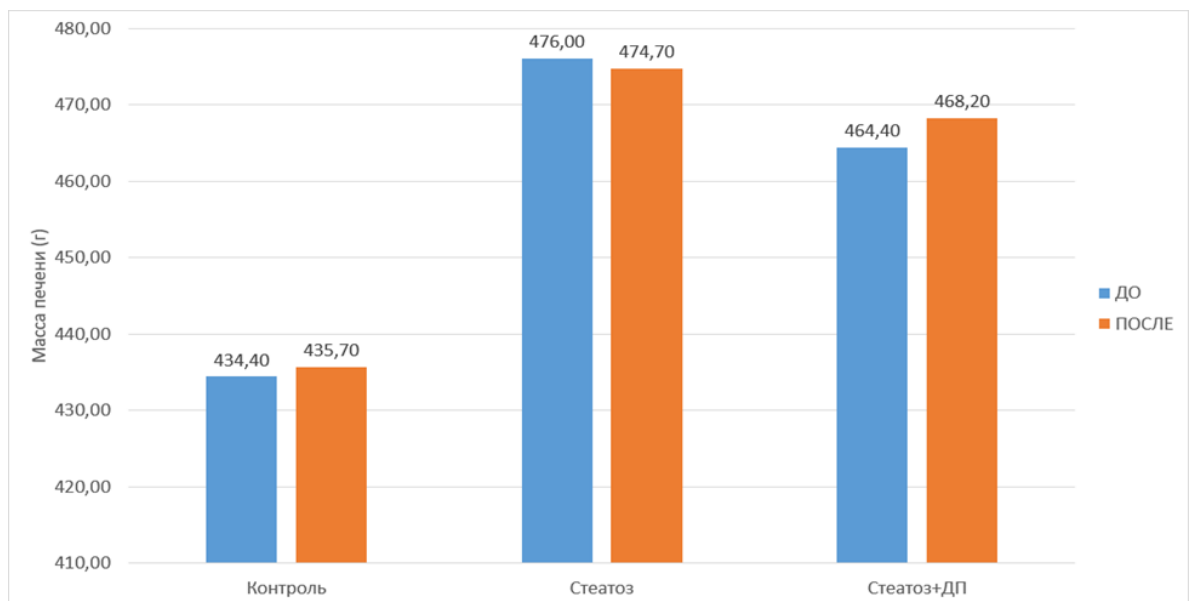


Рисунок 13 – Динамика массы тела животных до и после окончания эксперимента (г)

3.2 Результаты гистологического исследования печеночной ткани у экспериментальных животных

Результаты гистологического исследования показали, что у животных в группе «Стеатоз» при окраске гематоксилином и эозином определяются гепатоциты с признаками мелкокапельной и крупнокапельной жировой дистрофии в виде обильного накопления оптически пустых вакуолей различного размера в цитоплазме клеток, набуханием цитоплазмы, эксцентричным расположением ядер клеток. Указанные изменения более выражены в гепатоцитах на периферии печеночных долек, менее выражены в центролобулярной зоне долек (40-80%, степень стеатоза – II-III). Воспалительно-клеточная инфильтрация в портальных трактах и в толще печеночных долек не выявляется. Фиброз (очаговый портальный и мостовидный) не прослеживается. В гепатоцитах признаки белковой дистрофии (по типу гидропической и гиалиново-капельной) отсутствуют (рис. 14).

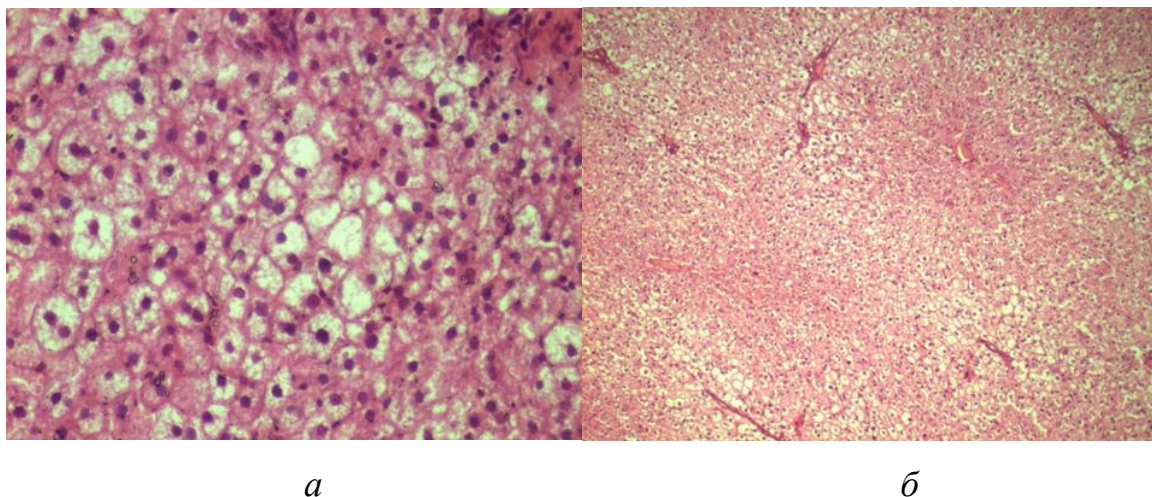


Рисунок 14 – Изменения в ткани печени у животных из группы «Стеатоз», гистологические срезы. Гепатоциты с признаками мелкокапельной и крупнокапельной жировой дистрофии, набуханием цитоплазмы, эксцентричным расположением ядер клеток (80%), степень стеатоза – III. Окраска гематоксилином и эозином (а – увеличение – x400, б – увеличение – x100)

Для подтверждения наличия нейтральных липидов в цитоплазме гепатоцитов и уточнения степени стеатоза в группе «Стеатоз» пять образцов были также исследованы с помощью окраски замороженных срезов суданом III, без докраски гематоксилином и эозином (рис. 15). При этом в цитоплазме гепатоцитов были обнаружены округлые вакуоли различных размеров оранжевато-желтого цвета, соответствующие нейтральным липидам (до 40%-80% объема паренхимы органа, степень стеатоза – II-III). Воспалительно-клеточная инфильтрация в портальных трактах и в толще печеночных долек не выявляется, фиброз (очаговый портальный и мостовидный) не прослеживается, в гепатоцитах признаки белковой дистрофии (по типу гидропической и гиалиново-капельной) отсутствуют.

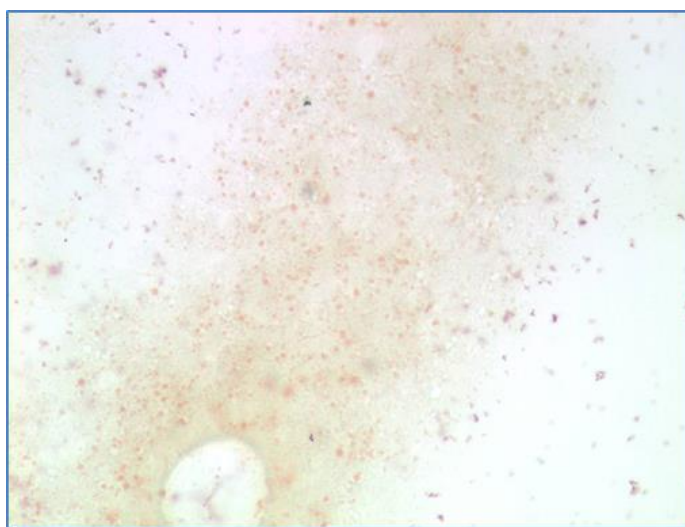
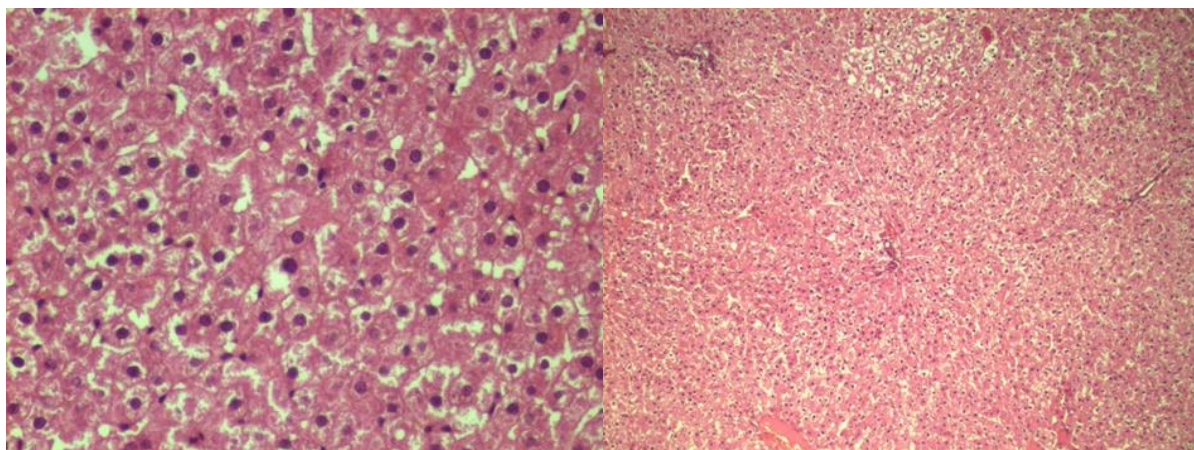


Рисунок 15 – Изменения в ткани печени у животных из группы «Стеатоз», гистологические срезы. В цитоплазме гепатоцитов – округлые вакуоли различных размеров оранжевато-желтого цвета, соответствующие нейтральным липидам.

Окраска суданом III, увеличение – х400

Описанная структурная реорганизация печени подтверждает развитие стеатоза у животных и адекватность использованного способа моделирования данного заболевания.

В печеночной ткани лабораторных животных группы «Стеатоз+ДП» при окраске гематоксилином и эозином также обнаруживаются гепатоциты с признаками мелкокапельной и очаговой крупнокапельной жировой дистрофии в виде накопления оптически пустых вакуолей в цитоплазме клеток, распространенной преимущественно на периферии печеночных долек. Однако процент таких гепатоцитов с признаками стеатоза существенно меньше – 10-50%, соответственно, степень стеатоза – I-II. Воспалительно-клеточная инфильтрация в портальных трактах и в толще печеночных долек не выявляется. Фиброз (очаговый портальный и мостовидный) не прослеживается. В гепатоцитах признаки белковой дистрофии (по типу гидропической и гиалиново-капельной) отсутствуют (рис. 16).



a

б

Рисунок 16 – Изменения в ткани печени у животных из группы «Стеатоз+ДП», гистологические срезы. Гепатоциты с признаками мелкокапельной и крупнокапельной жировой дистрофии (20%), степень стеатоза – I. Окраска гематоксилином и эозином (а – увеличение – x400, б – увеличение – x100)

В контрольных образцах при окраске гематоксилином и эозином определяются гепатоциты с эухромными центрально расположенными ядрами и эозинофильной цитоплазмой. В единичных гепатоцитах (менее 5%) выявляются

интрацитоплазматические оптически пустые вакуоли, более соответствующие нейтральным липидам (степень стеатоза – 0). Признаки воспалительно-клеточной инфильтрации, белковой дистрофии и фиброза отсутствуют (рис. 17).

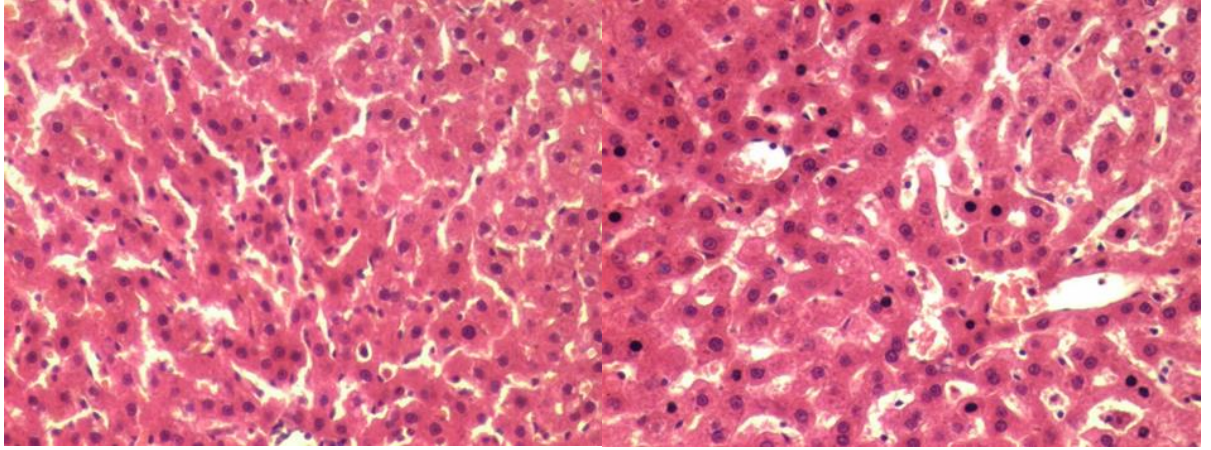


Рисунок 17 – Ткань печени животных контрольной группы.

Интрацитоплазматические оптически пустые вакуоли, соответствующие нейтральным липидам, менее, чем в 5% гепатоцитов. Степень стеатоза – 0).

Окраска гематоксилином и эозином, увеличение – х400

Результаты гистологического исследования, отражающие процент гепатоцитов с стеатозом, степень (индекс) стеатоза, стадию воспаления и стадию фиброза по Kleiner у лабораторных животных контрольной группы, группы «Стеатоз» и группы «Стеатоз+ДП» отражены в таблицах 4, 5 и 6, соответственно. Данные статистического анализа при сравнении количества гепатоцитов с стеатозом у экспериментальных животных отражены в таблице 7.

Таблица 4 – Результаты гистологической исследования у лабораторных животных контрольной группы

| Номер животного | Процент гепатоцитов с стеатозом | Степень (индекс) стеатоза по Kleiner | Стадия воспаления по Kleiner | Стадия фиброза по Kleiner |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 4 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | |
|----|---|---|---|---|
| 4 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 4 | 0 | 0 | 0 |

Таблица 5 – Результаты гистологической исследования у лабораторных животных группы «Стеатоз»

| Номер животного | Процент гепатоцитов с стеатозом | Степень (индекс) стеатоза по Kleiner | Стадия воспаления по Kleiner | Стадия фиброза по Kleiner |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | 70 | III | 0 | 0 |
| 2 | 80 | III | 0 | 0 |
| 3 | 50 | II | 0 | 0 |
| 4 | 80 | III | 0 | 0 |
| 5 | 50 | II | 0 | 0 |
| 6 | 80 | III | 0 | 0 |
| 7 | 70 | III | 0 | 0 |
| 8 | 60 | II | 0 | 0 |
| 9 | 80 | III | 0 | 0 |
| 10 | 40 | II | 0 | 0 |
| 11 | 80 | III | 0 | 0 |
| 12 | 50 | II | 0 | 0 |
| 13 | 50 | II | 0 | 0 |
| 14 | 70 | III | 0 | 0 |
| 15 | 60 | II | 0 | 0 |
| 16 | 60 | II | 0 | 0 |
| 17 | 40 | II | 0 | 0 |
| 18 | 70 | III | 0 | 0 |

Таблица 6 – Результаты гистологической исследования у лабораторных животных группы «Стеатоз+ДП»

| Номер животного | Процент гепатоцитов с стеатозом | Степень (индекс) стеатоза по Kleiner | Стадия воспаления по Kleiner | Стадия фиброза по Kleiner |
|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | 40 | II | 0 | 0 |
| 2 | 40 | II | 0 | 0 |
| 3 | 20 | I | 0 | 0 |
| 4 | 20 | I | 0 | 0 |
| 5 | 50 | II | 0 | 0 |
| 6 | 30 | I | 0 | 0 |
| 7 | 40 | II | 0 | 0 |
| 8 | 10 | I | 0 | 0 |
| 9 | 50 | II | 0 | 0 |
| 10 | 20 | I | 0 | 0 |
| 11 | 30 | I | 0 | 0 |
| 12 | 10 | I | 0 | 0 |
| 13 | 50 | II | 0 | 0 |
| 14 | 30 | I | 0 | 0 |

Таблица 7 – Количество гепатоцитов с стеатозом у экспериментальных животных (%)

| Группа | Процент гепатоцитов с стеатозом |
|------------|---------------------------------|
| Контроль | $3,5 \pm 0,3^{1,2}$ |
| Стеатоз | $63,3 \pm 6,5^{1,3}$ |
| Стеатоз+ДП | $31,4 \pm 7,4^{2,3}$ |

Примечание – p – значимость различий; 1 – различия статистически значимы в группах Контроль и Стеатоз; 2 – различия статистически значимы в группах Контроль и Стеатоз+ДП; 3 – различия статистически значимы в группах Стеатоз и Стеатоз+ДП

Полученные данные свидетельствуют о том, что введение животным экстракта листьев Джинуры Покумбенс при моделировании жирового гепатоза замедляет формирование характерных для этого заболевания морфологических изменений в ткани печени.

3.3 Результаты биохимических печеночных тестов, метаболические показатели и уровень интерлейкина-6 у животных с экспериментальным стеатозом и влияние на них экстракта листьев Джинуры Прокумбенс

По данным лабораторного исследования биохимические показатели в группе животных «Стеатоз» не имели значимых различий от группы «Контроль». При этом при интрагастральном введении Джинуры произошло статистически значимое уменьшение показателей АСТ ($p_{2-3}=0,003$), ЩФ ($p_{2-3}=0,002$) и увеличение концентрации общего белка ($p_{2-3}=0,001$) по сравнению с животными из группы «Стеатоз» (табл. 8).

Таблица 8 – Биохимические показатели крови животных в исследуемых группах

| Показатель | Группа 1 (К) n=9 | Группа 2 (С) n=9 | Группа 3 n=7 (С+ДП) | p |
|------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|---|
| АЛТ, Ед/л | 62,1 (51,0–78,6) | 64,80 (53,70–77,50) | 56,8 (36,7–90,3) | $p_{1-2}=0,825$ $p_{1-3}=0,560$ $p_{2-3}=0,427$ |
| АСТ, Ед/л | 114,1 (98,3–165,6) | 140,20 (118,10– 161,30) | 98,9 (85,6–122,9) | $p_{1-2}=0,102$ $p_{1-3}=0,223$ $p_{2-3}=0,003$ |
| ЩФ (Ед/л) | 219,8 (152,9–363,9) | 257,50 (192,50– 332,60) | 134,4 (72,5–179,9) | $p_{1-2}=0,566$ $p_{1-3}=0,007$ $p_{2-3}=0,002$ |

| | | | | |
|----------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---|
| Общий белок (г/л) | 66,3 (64,3–67,7) | 66,70 (61,80–68,90) | 73,8 (71,0–76,4) | $p_{1-2}=0,825$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}=0,001$ |
| Альбумин (г/л) | 30,8 (29,7–32,0) | 31,40 (29,30–32,70) | 31,5 (29,1–34,8) | $p_{1-2}=0,508$ $p_{1-3}=0,397$ $p_{2-3}=0,525$ |
| Глюкоза (ммоль/л) | 17,2 (13,2–20,7) | 20,53 (16,60–25,00) | 21,5 (14,7–25,0) | $p_{1-2}=0,085$ $p_{1-3}=0,125$ $p_{2-3}=0,874$ |

Примечание – p – значимость различий

При сравнительном анализе показателей липидограммы обнаружено, что при формировании стеатоза печени у животных второй группы развивается дислипидемия, проявляющаяся статистически значимо более выраженными триглицеридемией ($p_{1-2}=0,012$), ЛПОНП-емией ($p_{1-2}=0,008$) и статистически значимым снижением концентрации ЛПВП ($p_{1-2}=0,001$).

Курсовое введение экстракта ДП не оказывает существенного влияния на метаболизм липидов. Отмечается лишь тенденция к снижению содержания триглицеридов в плазме крови животных, получавших ДП, по сравнению с группой «Стеатоз» (1,9 (0,7–2,6) и 3,20 (1,86–5,00) ммоль/л, соответственно) ($p_{2-3}=0,064$). Надо отметить, что при применении ДП не произошло нормализации показателя ЛПВП ($p_{2-3}=0,672$) (табл. 9).

Таблица 9 – Показатели липидограммы животных в исследуемых группах

| Показатель | Группа 1 (К) n=9 | Группа 2 (С) n=9 | Группа 3 n=7 (С+ДП) | p |
|------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---|
| ХС, ммоль/л | 2,0 (1,6–2,1) | 1,63 (1,42–2,08) | 1,4 (1,0–1,7) | $p_{1-2}=0,185$ $p_{1-3}=0,004$ $p_{2-3}=0,185$ |
| ТГ, ммоль/л | 1,5 (1,2–2,3) | 3,20 (1,86–5,00) | 1,9 (0,7–2,6) | $p_{1-2}=0,012$ $p_{1-3}=0,711$ $p_{2-3}=0,064$ |
| ЛПНП, ммоль/л | 0,6 (0,5–0,8) | 0,59 (0,51–0,66) | 0,5 (0,4–0,7) | $p_{1-2}=0,270$ $p_{1-3}=0,064$ $p_{2-3}=0,290$ |

| | | | | |
|-------------------|------------------|---------------------|------------------|---|
| ЛПВП, ммоль/л | 1,0 (1,0–1,2) | 0,75 (0,66–0,91) | 0,7 (0,4–1,0) | $p_{1-2}=0,001$ $p_{1-3}=0,002$ $p_{2-3}=0,672$ |
| ЛПОНП, ммоль/л | 0,7 (0,6–1,0) | 1,45 (0,84–2,27) | 0,9 (0,3–1,2) | $p_{1-2}=0,008$ $p_{1-3}=0,459$ $p_{2-3}=0,057$ |

Примечание – p – значимость различий

При проведении сравнительного анализа содержания ИЛ-6 в сыворотке крови животных разных групп установлено, что при моделировании СП концентрация этого цитокина статистически значимо увеличивается по сравнению с контролем ($p = 0,006$), однако уровень этого цитокина оказался ниже уровня чувствительности, указанного в наборе. При этом введение *Gynura Procumbens* не оказало влияния на содержание ИЛ-6.

Таким образом, течение СП в эксперименте у животных сопровождается нарушениями липидного спектра (повышение ТГ и ЛПНП со снижением ЛПВП). *Джинура Прокумбенс* не оказывает существенного влияния на показатели липидного спектра при экспериментальном фруктозоиндуцированном стеатозе печени.

3.4 Результаты исследования состояния гемостаза у животных с экспериментальным стеатозом печени и влияния на эту систему экстракта листьев *Джинуры Прокумбенс*

Развитие жирового гепатоза наряду с формированием характерных для этого заболевания морфологических сдвигов в ткани печени и изменениями липидного спектра подвергает значительной перестройке работу системы гемостаза подопытных животных.

При оценке результатов исследований системы гемостаза у животных группы «Стеатоз» обнаружено статистически значимое изменение показателей, отражающих активность плазменного звена по внешнему механизму свертывания, по сравнению с контролем (табл. 6). Удлинение ПВ ($p_{1-2}=0,034$)

свидетельствуют о снижении активности внешнего механизма свертывания крови, а именно активности факторов протромбинового комплекса (факторов II, VII, X, V), синтезирующихся в печени.

В группе животных, принимавших экстракт листьев ДП, наблюдаются аналогичные изменения этого показателя, при этом статистически значимых различий ПВ у животных 2-й и 3-й групп не обнаружено.

АЧТВ – один из самых информативных скрининговых тестов. Он чувствителен к дефициту всех факторов свертывания крови, кроме фактора VII. Показатель АЧТВ у животных с стеатозом выше, чем в контроле (35,3 (32,4–37,1) и 38,30 (37,92–39,50), соответственно), однако эти изменения статистически не значимы ($p_{1-2}=0,181$). При применении экстракта ДП обнаружено статистически значимое уменьшение АЧТВ по сравнению с группой «Стеатоз» ($p_{2-3}=0,00001$) наряду с отсутствием значимых различий с контролем ($p_{1-3}=0,072$), что, предположительно, может быть обусловлено положительным влиянием ДП на функциональную активность гепатоцитов.

Тромбиновое время (ТВ) – тест, характеризующий конечный этап свертывания крови. Длительность этого теста у животных в группе «Стеатоз» имеет тенденцию к увеличению, хотя статистической значимости различий в сравнении с контролем не наблюдается: 76,10 (67,90–83,12) и 72,8 (67,9–80,1), соответственно; $p_{1-2}=0,364$).

Показатели концентрации фибриногена и ХЗФ не имеют статистически значимых различий при сравнении всех трех групп.

Таблица 10 – Показатели системы гемостаза в исследуемых группах

| Показатель | Группа 1 (К) n=9 | Группа 2 (С) n=9 | Группа 3 (С+ДП) n=7 | p |
|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|---|
| ФВ, % | 57,0 (51,0– 64,0) | 58,00 (51,00– 73,00) | 59,0 (50,0– 67,0) | $p_{1-2}=0,171$ $p_{1-3}=0,907$ $p_{2-3}=0,240$ |

| | | | | |
|-----------------|------------------|---------------------|------------------|---|
| АЧТВ, с | 35,3 (32,4–37,1) | 38,30 (37,92–39,50) | 33,2 (31,3–33,9) | $p_{1-2}=0,181$ $p_{1-3}=0,072$ $p_{2-3}=0,00001$ |
| ПВ, с | 19,8 (19,1–20,4) | 20,90 (20,20–22,10) | 21,9 (21,7–22,9) | $p_{1-2}=0,034$ $p_{1-3}=0,001$ $p_{2-3}=0,239$ |
| ТВ, с | 72,8 (67,9–80,1) | 76,10 (67,90–83,12) | 70,2 (67,1–71,5) | $p_{1-2}=0,364$ $p_{1-3}=0,077$ $p_{2-3}=0,100$ |
| Фибриноген, г/л | 2,7 (1,9–3,5) | 2,96 (2,67–3,26) | 2,9 (2,7–3,4) | $p_{1-2}=0,273$ $p_{1-3}=0,273$ $p_{2-3}=0,821$ |
| ХЗФ, мин | 8,0 (8,0–8,0) | 8,00 (8,00–8,00) | 8,0 (8,0–8,0) | $p_{1-2}=1,000$ $p_{1-3}=1,000$ $p_{2-3}=1,000$ |

Для оценки первичного звена гемостаза нами были использованы тесты индуцированная агрегация ТР с АДФ и активность ФВ.

Изучение агрегации показало, что при стимуляции адреналином статистически значимых различий агрегационной способности тромбоцитов у животных разных групп не обнаружено. Показатели АДФ-агрегации (%) у животных составили: в первой группе – $0,1 \pm 0,1$; во второй – $0,3 \pm 0,2$; в третьей – $0,1 \pm 0,1$. При этом $p_{1-2}=0,572$, $p_{1-3}=0,911$, $p_{2-3}=0,821$.

При оценке активности ФВ (%) различий между группами животных также не наблюдалось (табл. 10).

3.5 Взаимосвязи показателей гемостаза, биохимических показателей и липидного спектра в группе животных «Стеатоз». Особенности патогенеза неалкогольного стеатоза печени без ожирения по результатам экспериментального исследования

Корреляционный анализ лабораторных параметров в группе животных «Стеатоз» показал значимые взаимосвязи биохимических печеночных тестов с метаболическими показателями, корреляции параметров гемостаза с маркерами цитолиза, холестаза и липидного обмена (табл. 11).

Таблица 11 – Взаимосвязи показателей гемостаза, липидограммы и биохимических показателей в группе животных «Стеатоз»

| Показатели | r | p |
|------------------------|--------|-------|
| ИЛ6 и ПВ | 0,887 | 0,001 |
| ИЛ6 и протромбин | -0,762 | 0,017 |
| АЛТ и ФВ | 0,802 | 0,009 |
| АЧТВ и ТГ | -0,855 | 0,003 |
| АЧТВ и ЛПОНП | -0,856 | 0,003 |
| Фибриноген и ЩФ | 0,378 | 0,316 |
| Альбумин и общий белок | 0,792 | 0,011 |
| ТГ и глюкоза | 0,688 | 0,041 |
| ТГ и общий белок | 0,774 | 0,014 |
| ЛПНП и общий белок | 0,792 | 0,011 |
| ЛПНП и альбумин | 0,759 | 0,018 |
| ХС и общий белок | 0,807 | 0,009 |
| ХС и альбумин | 0,707 | 0,033 |
| ЛПОНП и глюкоза | 0,686 | 0,041 |
| ЛПОНП и общий белок | 0,773 | 0,015 |

В результате проведения корреляционного анализа с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена установлена значимая прямая связь между значениями общего белка с ЛПНП ($r=0,792$; $p=0,011$), ЛПОНП ($r=0,773$; $p=0,015$), ТГ ($r=0,774$; $p=0,014$) и уровнем ХС ($r=0,801$; $p=0,009$), а также значениями уровня альбумина с ЛПНП и ХС ($r=0,759$; $p=0,02$ и $r=0,707$; $p=0,033$, соответственно) в группе животных с экспериментальным фруктозоиндуцированным стеатозом.

Следует отметить, что изменение липидного спектра также взаимосвязано с функциональной активностью системы гемостаза. Это подтверждается наличием значимых отрицательных корреляций длительности АЧТВ с уровнем ТГ ($r=-0,855$; $p=0,003$) и концентрацией ЛПОНП ($r=-0,856$; $p=0,003$). Данный факт свидетельствует о том, что на определенном этапе формирования СП, одним из ведущих патофизиологических механизмов которого является нарушение липидного обмена, увеличение концентрации атерогенных липидов может играть ключевую роль в патологической активации системы гемостаза, и, в том числе, внутреннего каскада свертывания крови.

Наличие статистически значимых корреляций уровня глюкозы с такими показателями липидограммы, как концентрация ТГ ($r=0,688$; $p=0,041$) и ЛПОНП ($r=0,686$; $p=0,015$), свидетельствует о том, что нарушение липидного и углеводного обменов при стеатозе тесно взаимосвязаны.

Резюме

Таким образом, на модели фруктозоиндуцированного стеатоза, являющимся эквивалентом формы НАСП-БО, установлено, что ведущими звеньями патогенеза неалкогольного жирового гепатоза являются: нарушение липидного обмена и печеночная коагулопатия. Морфологические изменения печеночной ткани проявляются жировой дистрофией и гепатомегалией. Курсовое внутрижелудочное введение экстракта листьев Джинуры Прокумбенс

экспериментальным животным с стеатозом оказывает гепатопротекторный эффект, препятствуя формированию гепатомегалии и характерных для стеатоза морфологических изменений в ткани печени.

Это позволило нам уточнить особенности патогенеза фруктозоиндуцированного стеатоза печени без общего ожирения и обосновать в эксперименте саногенетический гепатопротекторный эффект ДП (рис. 18).

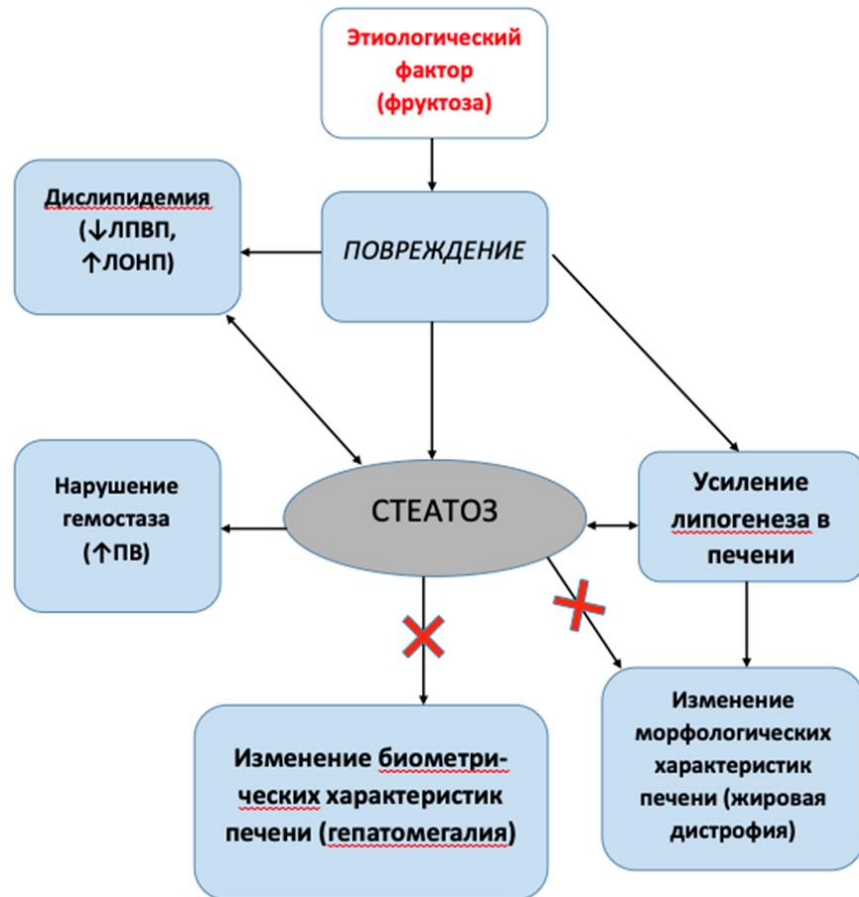


Рисунок 18 – Особенности патогенеза НАСП-БО по результатам экспериментального исследования и точки приложения Джинуры Прокумбенс (X)

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОЗОМ ПЕЧЕНИ НА ФОНЕ ОЖИРЕНИЯ И ВТОРИЧНЫМ СТЕАТОЗОМ С ВИРУСНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

4.1 Клиническая характеристика больных, включенных в исследование

Среди жалоб пациентов с НАСП-О преобладали общая слабость (30%), боли (15%) и тяжесть в правом подреберье (30%), явления диспепсии – отрыжка (30%), тошнота (15%), изжога (10%), метеоризм (10%). Структура жалоб пациентов с НАСП-О представлена в таблице 12.

Таблица 12 – Структура жалоб пациентов с НАСП-О и вторичным СП

| Жалобы | НАСП-О | Вторичный СП |
|--------------------------------|--------|--------------|
| Общая слабость, % | 30 | 40 |
| Боли в животе, % | 15 | 32 |
| Тяжесть в правом подреберье, % | 30 | 25 |
| Тошнота, % | 15 | 10 |
| Изжога, % | 10 | 15 |
| Отрыжка, % | 30 | 20 |
| Метеоризм, % | 10 | 5 |
| Нарушение стула, % | 10 | - |
| Субфебрилитет, % | - | 5 |

Гипертоническая болезнь отмечалась у 56% больных НАСП-О, сахарный диабет 2 типа – у 19%. При объективном осмотре отмечалось повышение артериального давления до 140/90 мм рт. ст. и более (45%), болезненность при

пальпации живота (30%), увеличение ординат Курлова (20%), пастозность голеней и стоп (20%).

Ожирение 1 степени имели 42% пациентов, 11 степени – 35%, 111 степени – 23%. ИМТ пациентов с НАСП составил в среднем $37,2 \pm 2,6$ кг/м² и значительно превышал значения этого показателя практически здоровых лиц $20,7 \pm 1,0$ (p=0,001).

При опросе у пациентов группы с вторичным СП на фоне гепатита С наиболее часто выявлялись следующие жалобы: общая слабость (40%), периодические боли в животе (32%) и тяжесть в правом подреберье (25%). Менее четверти пациентов жаловались на отрыжку (20%), изжогу (15%), тошноту (10%), метеоризм (5%) и повышение температуры до субфебрильных значений (5%) (см. табл. 4.1).

При объективном осмотре выявлялись следующие симптомы: увеличение ординат Курлова (20%), болезненность при поверхностной пальпации живота, преимущественно в правом подреберье (30%), телеангиэктазии (5%), субиктеричность склер (5%). ИМТ пациентов данной группы составил в среднем $25,5 \pm 2,5$ кг/м², что тоже превышало данные контроля (p=0,002). Но стоит отметить, что в этой группе большая часть пациентов (85%) имели показатели ИМТ до 24,9 кг/м², что по ВОЗ соответствует нормальной массе тела. У 15% были повышены значения ИМТ в диапазоне от 24,9 до 29,0 кг/м² без признаков ожирения.

Плотность печени по данным эластографии у больных вторичным стеатозом составила в среднем 6,7 (6,1; 7,3), что соответствует стадии F1-2. У 80% пациентов из этой группы наблюдалась 1 стадия ФП, 20% имели фиброз 2 стадии. Распределение по генотипам вируса в группе с вторичным СП было следующим: 12 лиц (50%) с генотипом HCV-3, 8 человек (33%) имели генотип HCV-1 и 4 пациента (16%) – HCV-2.

При УЗИ у больных обеих исследуемых групп имелись признаки СП: диффузная гиперэхогенность паренхимы печени и неоднородность ее структуры,

нечеткость и/или подчеркнутость сосудистого рисунка, дистальное затухание эхосигнала.

Таким образом, картина клинической симптоматики в обеих группах была схожа. Жалобы предъявляли от 10 до 30% больных. Стоит отметить, что астенический и болевой синдромы чаще регистрировались у пациентов с вторичным СП. По данным инструментальных методов у пациентов обеих групп имелись признаки СП, у больных с вторичным СП регистрировался фиброз 1-2 стадии.

4.2 Биохимические и метаболические показатели у пациентов с неалкогольным и вторичным стеатозом печени в сравнительном аспекте

По данным биохимического исследования у пациентов с НАСП-О уровни трансаминаз не имели значимых различий с контрольной группой, что свидетельствует об отсутствии синдрома цитолиза. Активность ферментов ГГТП и ЩФ у больных с НАСП-О была выше в сравнении с контролем ($p=0,003$ и $p=0,003$ соответственно), но в пределах референсных значений наборов (табл. 13).

Таблица 13 – Биохимические тесты у пациентов с НАСП-О, вторичным СП и в группе контроля

| Показатели | Контроль (К) (n=20) | НАСП-О (n=52) | Вторичный СП (n=24) |
|----------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| АЛТ, Ед/л | 16,4 (14,5-17,8) | 19,0 (14,0-28,8) | 40,2 (30,5-44,8) ^{2,3} |
| АСТ, Ед/л | 19,0 (18,0-26,2) | 20,0 (17,0-26,0) | 30,0 (25,0-33,2) ^{2,3} |
| Общий билир., мкмоль/л | 9,7 (8,4-11,6) | 11,3 (8,6-14,9) | 11,2 (6,9-14,2) |
| Прямой билир., мкмоль/л | 3,1 (2,8-3,4) | 4,2 (2,5-5,4) | 4,4 (3,1-5,6) ² |
| ГГТП, Ед/л | 10,8 (10,0-15,0) | 20,5 (14,8-31,7) ¹ | 34,5 (23,7-64,9) ^{2,3} |
| ЩФ, Ед/л | 56,0 (47,5-63,8) | 109,0 (62-149,0) ^{1,3} | 66,0 (52-82) ² |
| Общий белок, г/л | 74,0 (70,5-78,5) | 73,0 (66,0-74,0) | 76,0 (71,0-78,0) |

| | | | |
|---------------|------------------|------------------|-------------------------------|
| Альбумин, г/л | 50,3 (45,5-50,9) | 45,7 (44,9-48,5) | 46,2 (42,7-49,2) ² |
|---------------|------------------|------------------|-------------------------------|

Примечание – р – значимость различий; ¹ – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; ² – различия статистически значимы в группах контроль и вторичного СП; ³ – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП

В группе с вторичным СП на фоне гепатита С уровни трансаминаз и маркеры холестаза были значимо выше, чем в контроле, но при этом также находились в пределах референсных значений (табл. 13).

В группе с НАСП-О трансаминазы прямо коррелировали между собой ($r=0,458$, $p=0,001$), прямой билирубин с общим ($r=0,891$, $p=0,001$), ГГТП с полом ($r=0,656$, $p=0,001$), альбумин с общим белком ($r=0,764$, $p=0,001$).

В группе с вторичным СП также наблюдались многочисленные значимые прямые взаимосвязи биохимических параметров: АЛТ с АСТ ($r=0,843$, $p=0,001$), прямого билирубина с общим ($r=0,863$, $p=0,001$), ГГТП с АЛТ ($r=0,587$, $p=0,001$) и АСТ ($r=0,556$, $p=0,002$), общего белка с альбумином ($r=0,579$, $p=0,001$),

При анализе метаболических показателей уровень глюкозы у пациентов с НАСП-О и вторичным СП не имел значимых различий от группы здоровых. Однако у отдельных больных НАСП-О, имеющих СД 2 типа этот показатель был выше нормы. Липидный спектр у пациентов обеих исследуемых групп статистически значимо отличался от контроля, регистрировались: гипертриглицеридемия, снижение ЛПВП, повышение ЛПОНП. Более выраженная дислипидемия наблюдалась при НАСП-О в сочетании с гиперинсулинемией, повышением индекса НОМА-IR, уровня лептина и С-пептида (табл. 14).

Таблица 14 – Метаболические показатели у пациентов с НАСП-О, вторичным СП и в группе контроля

| Показатели | Контроль | НАСП-О | Вторичный СП |
|------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| Глюкоза, ммоль/л | 4,7 (4,4-5,1) | 5,0 (4,6-6,0) | 4,8 (4,1-5,4) |
| ХС, ммоль/л | 4,4 (3,4-5,0) | 5,4 (4,7-6,0) ^{1,3} | 4,6 (4,3-5,4) |

| | | | |
|---------------------|---------------|--------------------------------|----------------------------|
| ТГ, ммоль/л | 0,9 (0,8-1,3) | 1,4 (0,8-2,0) ^{1,3} | 1,2 (1,0-1,6) ² |
| ЛПВП, ммоль/л | 1,6 (1,5-1,8) | 1,3 (1,1-1,6) ¹ | 1,3 (1,1-1,6) ² |
| ЛПНП, ммоль/л | 2,8 (2,3-3,2) | 3,3 (2,8-3,8) ^{1,3} | 2,8 (2,4-3,1) |
| ЛПОНП, ммоль/л | 0,4 (0,3-0,6) | 0,9 (0,7-1,0) ^{1,3} | 0,6 (0,5-0,7) ² |
| ИА | 1,8 (1,5-1,9) | 2,9 (2,5-3,4) ^{1,3} | 2,6 (2,1-3,6) ² |
| Инсулин, мкМЕ/мл | 7,7 (6,2-7,8) | 13,3 (9,3-18,0) ^{1,3} | 6,3 (5,1-8,4) |
| НОМА-IR | 1,6 (1,5-1,7) | 3,1 (2,4-4,3) ^{1,3} | 1,93 (1,2-3) ² |
| С-пептид, нг/мл | 1,1 (0,8-1,9) | 2,8 (2,0-3,6) ¹ | 3,1 (2,3-4,3) ² |
| Лептин, нг/мл | 1,8 (1,2-2,8) | 8,8 (6,3-14,1) ^{1,3} | 2,8 (1,5-6,1) |

Примечание – р – значимость различий; ¹ – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; ² – различия статистически значимы в группах контроль и вторичного СП; ³ – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП

В группе с НАСП-О значимых различий метаболических параметров в зависимости от пола не наблюдалось. У женщин с вторичным СП регистрировались более высокие значения ЛПОНП и ИА, чем у мужчин с (р=0,041 и р=0,042 соответственно).

Многочисленные сходные взаимосвязи метаболических показателей в группах с НАСП-О и вторичным стеатозом представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Взаимосвязи метаболических показателей в группах с НАСП-О и вторичным СП

| Корреляции в группе НАСП-О | | | Показатели | r2 | p2 |
|----------------------------|-------|--------|----------------------------------|-------|-------|
| Показатели | r1 | p1 | | | |
| | | | С-пептид и ТГ | 0,542 | 0,001 |
| ЛПВП и ХС | 0,470 | 0,001 | С-пептид и ЛПНП | 0,374 | 0,011 |
| ЛПНП и ТГ | 0,418 | 0,004 | С-пептид и ИА | 0,329 | 0,038 |
| ЛПНП и ХС | 0,845 | <0,001 | Корреляции в группе вторичный СП | | |

| | | | | | |
|--------------------|--------|--------|--------------|--------|-------|
| ТГ и ИА | 0,472 | 0,001 | ЛПВП и ТГ | -0,532 | 0,005 |
| ХС и ИА | 0,321 | 0,029 | ЛПНП и ХС | 0,934 | 0,001 |
| ЛПВП и ИА | -0,538 | <0,001 | ЛПОНП и ТГ | 1,000 | 0,001 |
| ЛПНП и ИА | 0,541 | <0,001 | ЛПОНП и ЛПВП | -0,533 | 0,005 |
| Лептин и ЛПОНП | 0,453 | 0,044 | ТГ и ИА | 0,417 | 0,033 |
| Инсулин и ЛПОНП | 0,569 | 0,008 | ЛПВП и ИА | -0,768 | 0,001 |
| НОМА и инсулин | 0,881 | <0,001 | ЛПНП и ИА | 0,426 | 0,030 |
| С-пептид и глюкоза | 0,641 | <0,001 | ЛПОНП и ИА | 0,418 | 0,033 |

Примечание – r – коэффициент корреляции; p – значимость корреляции

Таким образом, изменения метаболических показателей разной степени выраженности регистрируются у всех пациентов с НАСП-О и у части больных с вторичным вирус-ассоциированным стеатозом. При этом более значимые изменения липидного спектра и метаболических тестов имеют пациенты с НАСП на фоне ожирения.

4.3 Индексы стеатоза и фиброза в исследуемых группах

Маркер регенерации гепатоцитов АФП в крови пациентов с вторичным СП был повышен практически в 2 раза в сравнении с группой контроля ($p=0,004$), но не выходил за пределы референсных значений набора, у больных с НАСП-О не имел значимых различий с практически здоровыми лицами.

Индекс HSI у практически здоровых лиц был менее 30, что исключает стеатоз. В группах с НАСП-О и вторичным СП значения данного показателя превышали 30, что подтверждает наличие стеатоза в обеих группах больных. При этом показатели индекса HSI у пациентов с НАСП-О были выше значений группы с вторичным СП, что свидетельствует о более выраженном жировом поражении печени. Таким образом расчетный индекс HSI показывает наличие СП в обеих

исследуемых группах пациентов, более выраженный у больных НАСП на фоне ожирения.

ИФ в группе контроля варьировал в интервале от 0 до 0,5, что исключает ФП. Значения ИФ у 67% пациентов с НАСП-О были менее 0,5, что свидетельствует об отсутствии признаков ФП. При этом у 23% больных этой группы ИФ был более 0,5 (от 0,56 до 1,2), что соответствовало начальной стадии фиброза. У всех пациентов с вторичным СП данный индекс превышал 0,5 (от 0,6 до 1,5) и соответствовал умеренной стадии фиброза.

У обследуемых всех групп расчетный индекс APRI был менее 0,5, что исключает значимый ФП и ЦП.

Таким образом, расчетные индексы HSI, ИФ и APRI у пациентов с НАСП-О и вторичным СП позволяет исключить или выявить стеатоз, оценить наличие и степень выраженности фиброза, исключить значимый ФП и ЦП.

4.4 Состояние системы гемостаза у исследуемых пациентов

При анализе показателей тромбоцитарно-сосудистого гемостаза группах с НАСП-О и вторичным СП количество ТР значимо не отличались от контроля. В обеих группах пациентов наблюдалось снижение агрегации с коллагеном ($p=0,002$ и $p=0,04$ соответственно) и с АДФ ($p=0,02$ и $p=0,03$ соответственно). При этом агрегация ТР с ристоцетином и функциональная активность ФВ напротив при НАСП-О ($p=0,001$ и $p=0,01$) и вторичном стеатозе ($p=0,001$ и $p=0,001$) была выше, чем в контроле (табл. 16).

Таблица 16 – Состояние системы тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в исследуемых группах

| Показатели | Контроль | НАСП-О | Вторичный СП |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ТР, 10 ⁹ / л | 250,0 (236,0-259,0) | 290,0 (255,0-305,0) | 240,0 (196-300) |
| Агрегация с коллагеном, % | 64,0 (58,8-69,3) | 43,5 (23,5-54,0) ¹ | 42,0 (30,0-62,0) ¹ |
| Агрегация с ристоцетином, % | 69,2 (60,8-75,3) | 74,5 (64,3-81,0) ¹ | 92,1(69,5-96,7) ^{2,3} |
| Агрегация с адреналином, % | 62,5 (58,3-65,8) | 65,1 (60,3-68,0) | 56,0 (40,0-60,0) |
| Агрегация с АДФ, % | 59,4 (47,3-64,0) | 51,0 (37,8-60,8) ¹ | 42,0 (36,0-54,0) ² |
| ФВ, % | 78,1 (55,4-83,8) | 94,0 (75,8-105,8) ¹ | 93,5(72,1-103,5) ² |

Примечание – р – значимость различий; ¹ – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; ² – различия статистически значимы в группах контроль и вторичного СП; ³ – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП

Таким образом при НАСП-О и вторичном стеатозе на фоне вирусного поражения печени наблюдаются сходные изменения тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в виде нарушения агрегации ТР (гипоагрегация с коллагеном и АДФ и гиперагрегация с ристоцетином) и признаки повреждения эндотелия с активацией ФВ.

При анализе показателей коагуляционного гемостаза в группах с НАСП-О и вторичным СП наблюдалось небольшое удлинение АЧТВ в сравнении с контролем (р=0,003 и р=0,002), но при этом не выходило за рамки референсных значений набора (24 – 38 сек). Количество фибриногена в обеих исследуемых группах больных хотя и превышало значения контроля, но также было в пределах нормы (2 – 4 г/л) (табл. 17).

Таблица 17 – Состояние коагуляционного гемостаза и компонентов системы фибринолиза в исследуемых группах

| Показатели | Контроль | НАСП-О | Вторичный СП |
|-----------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| АЧТВ, сек | 28,0 (28,0-29,0) | 30,6 (29,7-31,3) ¹ | 32,6 (30,6-36,0) ² |
| ПВ, сек | 14,0 (13,0-14,7) | 12,7 (12,4-13,8) | 13,1 (12,8-14,2) |
| ТВ, сек | 12,0 (12,0-12,8) | 27,0 (26,3-27,8) ^{1,3} | 19,0 (17,8-19,9) ² |
| Фибриноген, г/л | 2,2 (1,8-2,0) | 2,5 (2,2-2,8) ¹ | 2,9 (1,9-4,1) ^{2,3} |
| ХЗФ, мин | 7,1 (6,8-9,1) | 7,9 (7,1-9,8) | 8,8 (7,6-11,0) |
| РФМК, мг/мл | 3,0 (3,0-3,0) | 3,0 (3,0-3,0) | 3,0 (3,0-3,0) |

Примечание – р – значимость различий; ¹ – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; ² – различия статистически значимы в группах контроль и вторичного СП; ³ – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП

Стоит отметить, что показатель ТВ, характеризующего вторую фазу свертывания крови, был значимо удлинен у пациентов с НАСП-О и вторичным стеатозом в сравнении с практически здоровыми лицами ($p=0,001$ и $p=0,001$ соответственно), что может свидетельствовать о нарушении синтетической функции печени. Статистически значимых гендерных различий параметров гемостаза в обеих исследуемых группах больных не наблюдалось.

Таким образом при НАСП-О и вторичном стеатозе на фоне вирусного поражения печени регистрируются сходные изменения показателей гемостаза в виде нарушения агрегации ТР (гипоагрегация с коллагеном и АДФ и гиперагрегация с ристоцетином), повышение функциональной активности ФВ и удлинение ТВ.

4.5 Исследование сывороточной концентрации цитокинов на клинических моделях стеатоза печени

По результатам ИФА у пациентов обеих исследуемых групп было зарегистрировано повышение сывороточных уровней провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6, а также концентрация ВЭФР в крови, статистически значимо превышающие значения этих показателей в контрольной группе (табл. 18).

Таблица 18 – Концентрации цитокинов в сыворотке крови исследуемых групп

| Показатели | Контроль | НАСП-О | Вторичный СП |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| ФНО- α , пг/мл | 0,0 (0,0-0,0) | 1,1 (0,0-2,1) ¹ | 2,1 (0,9-3,1) ^{2,3} |
| ИЛ-6, пг/мл | 0,0 (0,0-0,0) | 1,0 (0,0-2,2) ¹ | 2,2 (0,4-7,8) ^{2,3} |
| ВЭФР, пг/мл | 86,7 (10,7-175,1) | 184,6 (94,8-291,7) ¹ | 365(232,8-617,3) ^{2,3} |

Примечание – р – значимость различий; ¹ – различия статистически значимы

в группах контроль и НАСП-О; ² – различия статистически значимы в группах контроль и вторичного СП; ³ – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП

У пациентов с вторичным СП сывороточные концентрации ФНО- α , ИЛ-6 и ВЭФР были значимо выше, чем у больных НАСП-О ($p=0,021$, $p=0,039$ и $p=0,002$ соответственно). Таким образом, течение НАСП-О и вторичного СП ассоциировано с гиперпродукцией ВЭФР и провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6, более выраженном при вирус-ассоциированном стеатозе.

В группе пациентов с НАСП-О концентрация ВЭФР прямо коррелировала с уровнем ФВ ($r = 0,624$; $p=0,001$) и индексом стеатоза HSI ($r = 0,368$; $p = 0.015$), а ФНО- α и ИЛ-6 прямо коррелировали друг с другом ($r = 0,510$; $p = 0.004$) и имели прямую взаимосвязь с ИФ ($r = 0,626$; $p=0,001$ и $r = 0,555$; $p=0,001$, соответственно).

У больных с вторичным стеатозом ФНО- α прямо коррелировал с ИЛ-6 ($r = 0,575$; $p=0,001$), а ВЭФР с ИФ ($r = 0,865$; $p=0,001$), что подтверждает увеличение выраженности стеатоза по мере нарастания воспаления и повреждения эндотелия.

При анализе показателей по гендерному признаку у женщин с НАСП-О наблюдалась значимо большая активация выработки ФНО- α и ИЛ-6, чем у мужчин в этой группе ($p=0,029$ и $p=0,005$ соответственно). При этом сывороточная концентрация ВЭФР напротив была значимо выше у мужчин с НАСП-О ($p=0,031$). В группе с вирус-ассоциированным стеатозом значимых различий цитокинового статуса по полу не было выявлено.

Таким образом, НАСП у лиц с ожирением и вирус-ассоциированный стеатоз характеризуются развитием воспалительного синдрома и повреждением эндотелия, ассоциированными с увеличением выработки провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6 и гиперпродукцией ВЭФР, более активными при вторичном стеатозе. Выраженность процессов стеатоза в печени нарастает по мере активации механизмов воспаления и повреждения эндотелия.

4.6 Взаимосвязи патогенетических параметров в исследуемых группах

Корреляционный анализ биометрических, лабораторных и расчетных параметров в группе с НАСП-О показал значимые взаимосвязи биохимических параметров с метаболическими показателями и расчетными индексами HSI, ИФ и APRI, корреляции показателей гемостаза с маркерами цитолиза, ЭД, холестаза и липидного обмена (табл. 19).

Таблица 19 – Взаимосвязи патогенетических тестов в группе с НАСП-О

| Показатели | r | p | Показатели | r | p |
|------------|-------|--------|----------------|-------|-------|
| ГГТП и АЛТ | 0,611 | <0,001 | АЧТВ и глюкоза | 0,314 | 0,033 |
| ЩФ и ИМТ | 0,575 | 0,001 | АЧТВ и ГГТП | 0,844 | 0,001 |

| | | | | | |
|-----------------|--------|--------|-------------------------------------|--------|-------|
| Белок и ИМТ | 0,510 | 0,004 | АЧТВ и ТГ | 0,666 | 0,001 |
| ГГТП и ИА | 0,436 | 0,020 | АЧТВ и лептин | 0,881 | 0,001 |
| ТГ и глюкоза | 0,742 | <0,001 | ТВ и АЛТ | 0,539 | 0,001 |
| ТГ и белок | 0,508 | 0,004 | ТВ и ГГТП | 0,428 | 0,023 |
| ХС и глюкоза | 0,372 | 0,010 | ТВ и ТГ | 0,302 | 0,043 |
| ХС и ГГТП | 0,431 | 0,022 | ТВ и лептин | 0,787 | 0,001 |
| ХС и ТГ | 0,422 | 0,003 | Фибриноген и АЛТ | 0,535 | 0,001 |
| ЛПНП и АЛТ | 0,395 | 0,006 | Фибриноген и ГГТП | 0,603 | 0,001 |
| ЛПНП и глюкоза | 0,370 | 0,011 | Фибриноген и белок | 0,472 | 0,009 |
| НСИ и АЛТ | 0,618 | <0,001 | Фибриноген и ТГ | 0,661 | 0,001 |
| НСИ и АСТ | -0,366 | 0,012 | Фибриноген и АЧТВ | 0,815 | 0,004 |
| НСИ и ИМТ | 0,936 | <0,001 | Агрегация с АДФ и инсулин | =0,516 | 0,002 |
| НСИ и ЩФ | 0,487 | 0,004 | Агрегация с коллагеном и лептин | -0,773 | 0,001 |
| ИФ и ТР | -0,759 | <0,001 | Агрегация с коллагеном и инсулин | -0,619 | 0,001 |
| APRI и АЛТ | 0,581 | <0,001 | Агрегация с ристоцетином и ХС | 0,401 | 0,005 |
| APRI и АСТ | 0,896 | <0,001 | Агрегация с ристоцетином и ЛПНП | 0,390 | 0,008 |
| APRI и альбумин | -0,416 | 0,027 | Агрегация с ристоцетином и лептин | 0,456 | 0,004 |
| APRI и ТР | -0,521 | 0,003 | Агрегация с ристоцетином и инсулин | 0,549 | 0,001 |
| ВЭФР и ФВ | 0,699 | <0,001 | Агрегация с ристоцетином и С-пептид | 0,352 | 0,038 |
| АЧТВ и АЛТ | 0,799 | 0,001 | Агрегация с ристоцетином и ФВ | 0,999 | 0,001 |

Примечание – r – коэффициент корреляции; p – значимость корреляции

В группе с вирус-ассоциированным стеатозом биохимические маркеры коррелировали с концентрацией цитокинов и ИС и ИФ, а параметры гемостаза с

биохимическими тестами, метаболическими маркерами, цитокинами и ВЭФР (табл. 20).

Таблица 20 – Взаимосвязи патогенетических тестов в группе с вторичным СП

| Показатели | r | p | Показатели | r | p |
|--------------------|--------|--------|----------------------------------|--------|-------|
| АФП и АЛТ | 0,731 | <0,001 | ВЭФР и ФВ | 0,789 | 0,001 |
| АФП и АСТ | 0,759 | <0,001 | Агрегация с АДФ и АЛТ | -0,633 | 0,001 |
| АФП и ТВ | 0,603 | 0,001 | Агрегация с АДФ и АСТ | -0,502 | 0,007 |
| ИЛ-6 и ГГТП | 0,575 | 0,005 | Агрегация с АДФ и ГГТП | -0,798 | 0,001 |
| ТВ и ВЭФР | 0,801 | <0,001 | Агрегация с АДФ и ХС | 0,392 | 0,047 |
| АСТ и ТВ | 0,553 | 0,002 | Агрегация с АДФ и лептин | -0,865 | 0,001 |
| ГГТП и ТВ | 0,582 | 0,004 | Агрегация с АДФ и АФП | -0,664 | 0,001 |
| HSI и АЛТ | 0,382 | 0,049 | Агрегация с ристоцетином и АЛТ | 0,456 | 0,017 |
| HSI и ТГ | 0,407 | 0,038 | Агрегация с ристоцетином и ХС | 0,513 | 0,007 |
| HSI и ЛПОНП | 0,410 | 0,037 | Агрегация с ристоцетином и ЛПНП | 0,595 | 0,001 |
| ИФ и ФЭГ | 0,875 | <0,001 | Агрегация с ристоцетином и ЛПОНП | 0,485 | 0,018 |
| ИФ и ФНО- α | 0,765 | <0,001 | Агрегация с ристоцетином и ИЛ-6 | 0,459 | 0,016 |
| ИФ и ВЭФР | 0,865 | <0,001 | Агрегация с ристоцетином и ВЭФР | 0,493 | 0,019 |
| ИФ и альбумин | -0,655 | <0,001 | Агрегация с адреналином и АЛТ | -0,582 | 0,001 |
| ИФ и ТР | -0,845 | <0,001 | Агрегация с адреналином и АСТ | -0,558 | 0,002 |
| APRI и АЛТ | 0,552 | 0,002 | Агрегация с коллагеном и ГГТП | -0,849 | 0,001 |
| APRI и АФП | 0,408 | 0,042 | Агрегация с | 0,898 | 0,001 |

| | | | | | |
|--|--|--|-------------------|--|--|
| | | | ристоцетином и ФВ | | |
|--|--|--|-------------------|--|--|

Примечание – r – коэффициент корреляции; p – значимость корреляции

Выявленные многочисленные значимые корреляции биометрических, лабораторных и расчетных параметров в группах с НАСП-О и вторичным стеатозом на фоне вирусного поражения печени подтверждают взаимосвязи метаболических нарушений, воспаления, повреждения эндотелия и дисфункции гемостаза в развитии и прогрессировании стеатоза, а также возможность использования этих маркеров для диагностики степени поражения печени.

4.7 Сравнительная оценка результатов экспериментальной и клинической части исследования

Комплексно с применением единого лабораторного алгоритма изучили механизмы развития разных форм стеатоза в эксперименте при моделировании фруктозоиндуцированного стеатоза у лабораторных животных (форма НАСП-БО) и в клинической части у пациентов с формой НАСП-О и вирус-ассоциированным стеатозом.

Лабораторный алгоритм оценки патогенетически значимых маркеров включал в себя: биохимические тесты, липидный спектр, метаболические параметры, уровень провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6, маркеры повреждения эндотелия (ВЭФР, ФВ), оценку показателей гемостаза (агрегационная функция ТР, ПВ, ТВ, АЧТВ, фибриноген, ХЗФ).

В экспериментальной модели фруктозоиндуцированного стеатоза печени у лабораторных животных установлены нарушения показателей липидного обмена и формирование соответствующих морфологических изменений в печени в виде гепатомегалии и жировой дистрофии.

В клинической части у пациентов с НАСП-О и лиц с вторичным стеатозом на фоне вирусного поражения печени регистрировались дислипидемия,

нарушение метаболических показателей, активация провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6, повреждение эндотелия с гиперпродукцией ВЭФР и повышением функциональной активности ФВ, изменения гемостаза в виде нарушения агрегации ТР и удлинения ТВ. По результатам расчетных индексов (HSI, ИФ и APRI) у всех пациентов определяется стеатоз, у части больных есть данные за начальный фиброз и исключен ЦП. Наличие стеатоза подтверждено данными УЗИ.

Анализируя результаты исследования экспериментальной и клинической части при СП разного генеза выявлены сходные изменения липидного спектра и биометрических характеристик печени (гепатомегалия) (табл. 21).

Таблица 21 – Сравнительная оценка результатов экспериментального и клинического исследования

| Показатели | Экспериментальная модель НАСП-БО | Клинические модели СП | |
|--|--|--|---|
| | Фруктозоиндуцированный | НАСП-О | Вторичный |
| Биометрия печени | Гепатомегалия | Гепатомегалия у 20% | Гепатомегалия у 20% |
| Маркеры цитолиза и холестаза | норма | норма | норма |
| Липидный спектр и метаболические параметры | ТГ $\uparrow\uparrow$ ЛПВП \downarrow ЛПОНП \uparrow | ХС \uparrow , ТГ $\uparrow\uparrow$, ЛПНП \uparrow , ЛПОНП $\uparrow\uparrow$, ИА $\uparrow\uparrow$; ЛПВП \downarrow инсулин $\uparrow\uparrow$, НОМА-IR \uparrow , лептин $\uparrow\uparrow$ С-пептид \uparrow | ТГ \uparrow , ЛПОНП \uparrow , ИА \uparrow ; ЛПВП \downarrow , НОМА-IR \uparrow , лептин \uparrow С-пептид \uparrow |
| Цитокины | норма | ИЛ-6 \uparrow ФНО- α \uparrow | ИЛ-6 $\uparrow\uparrow$ ФНО- α $\uparrow\uparrow$ |
| Маркеры повреждения эндотелия | норма | ВЭФР \uparrow ФВ \uparrow | ВЭФР $\uparrow\uparrow$ ФВ \uparrow |
| Параметры гемостаза | удлинение ПВ | нарушение агрегации ТР | нарушение агрегации ТР |

| | | | |
|--|--|-----------------|-----------------|
| | | удлинение ТВ | удлинение ТВ |
|--|--|-----------------|-----------------|

4.8 Диагностическое значение индекса стеатоза на модели больных неалкогольным стеатозом печени

В рамках данного исследования были установлены взаимосвязи следующих биометрических и лабораторных параметров: ИМТ и наличием НАСП - 0,9; между ГГТП и наличием стеатоза – 0,8; между ВЭФР и наличием стеатоза – 0,85; между ИЛ-6 и наличием стеатоза – 0,8, которые были включены в математическую модель диагностики СП.

Построение уравнения расчета ИС печени было выполнено на модели пациентов с НАСП-О. Уравнение множественной регрессии выглядит следующим образом (Решение о выдаче патента от 05.08.2021 г. по заявке №2021106422/14(013887):

$$ИС = -1,2390 + 0,0575 * ИМТ + 0,0064 * ГГТП + 0,0006 * ВЭФР + 0,0001 * ИЛ6$$

где ИС – индекс стеатоза,

-1,2390 – константа,

0,0575, 0,0064, 0,0006 и 0,0001 – коэффициенты показателей,

ИМТ – индекса массы тела (кг/м²), ГГТП – уровень гамма-глутамилтранспептидазы (ед/л),

ВЭФР – концентрация васкулоэндотелиального фактора роста (пг/мл),

ИЛ6 – уровень интерлейкина-6 (пг/мл)

При значении ИС, равном 0,5 и более, диагностируют наличие НАСП, при ИС менее 0,5 – отсутствие НАСП.

Предсказательную ценность каждого параметра модели оценивали по шкале значений площади под ROC-кривой (AUC). Площадь ROC-кривой для ИМТ составила AUC 1,00±0,00 (доверительный интервал 0,88–1,00), для ГГТП площадь AUC 0,84±0,07 (доверительный интервал 0,67–0,95), AUC для ВЭФР –

$0,79 \pm 0,08$ (доверительный интервал $0,61-0,92$), для ИЛ-6 – $0,92 \pm 0,03$ (доверительный интервал $0,77-0,99$) (рис. 19).

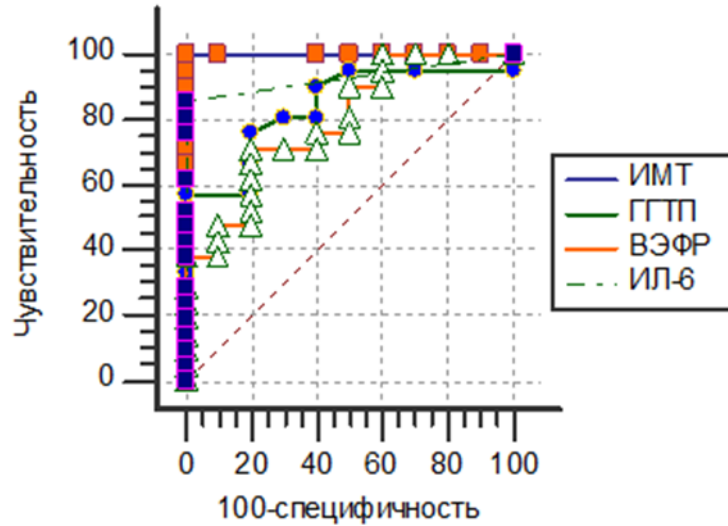


Рисунок 19 – ROC-кривая для показателей индекса стеатоза

Модель эффективна (коэффициент множественной корреляции $R = 0,809$; доля влияния суммы входящих в модель факторов составляет $R^2 \cdot 100 = 65,5\%$), статистически значима (критерий $F = 12,318$; $p = 0,001$).

Диагностические характеристики математической модели оценки ИС представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Диагностические характеристики математической модели расчета ИС

| Диагностические характеристика | Значения, % |
|--------------------------------|-------------|
| Чувствительность | 95,2 |
| Специфичность | 97 |
| Показатель воспроизводимости | 95,2 |
| Показатель соответствия | 96,8 |

Пороговое значение ИМТ для исключения НАСП составило 24,2 (чувствительность – 100%, специфичность – 100%) (рис. 20).

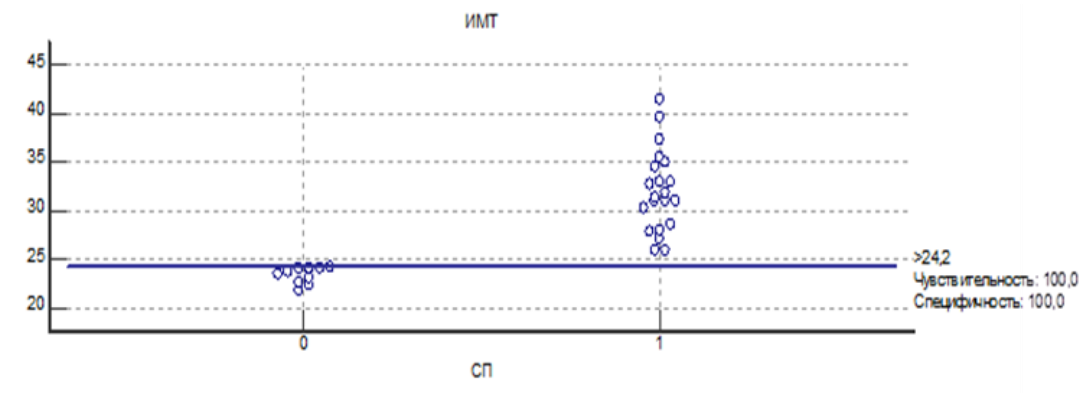


Рисунок 20 – Пороговое значение ИМТ для визуальной оценки баланса чувствительности и специфичности при диагностике НАСП

Пороговое значение ГГТП для исключения СП составило 18 Ед/л (чувствительность – 57,1%, специфичность – 100%) (рис. 21).

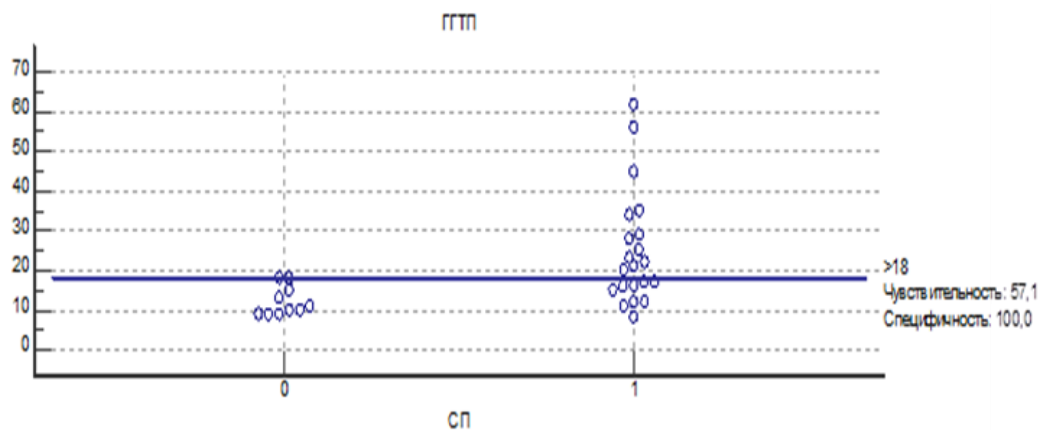


Рисунок 21 – Пороговое значение ГГТП для визуальной оценки баланса чувствительности и специфичности при диагностике НАСП

Пороговое значение ВЭФР для исключения СП составило 138 пг/мл (чувствительность – 71,4%, специфичность – 100%) (рис. 22).

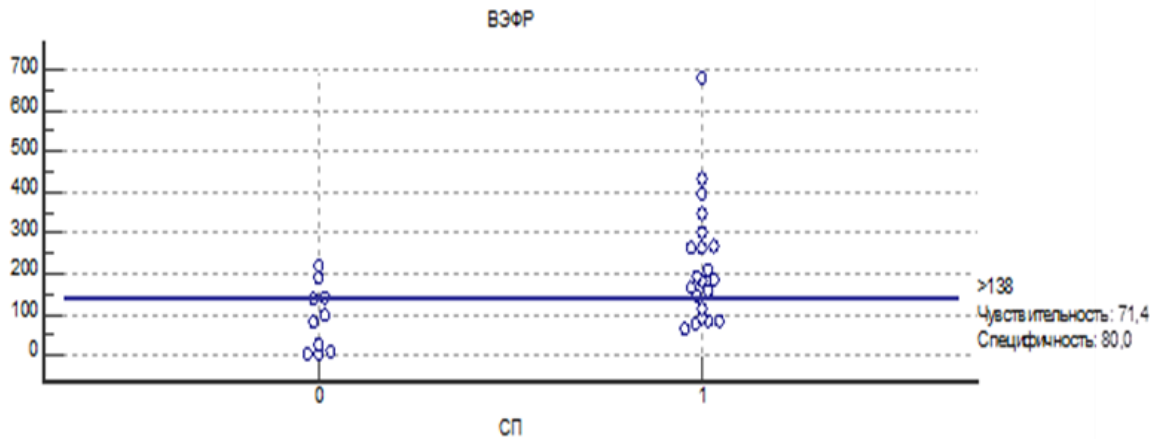


Рисунок 22 – Пороговое значение ВЭФР для визуальной оценки баланса чувствительности и специфичности при диагностике НАСП

Пороговое значение ИЛ-6 для исключения СП составило 0 пг/мл (чувствительность – 85,7%, специфичность – 100%) (рис. 23).

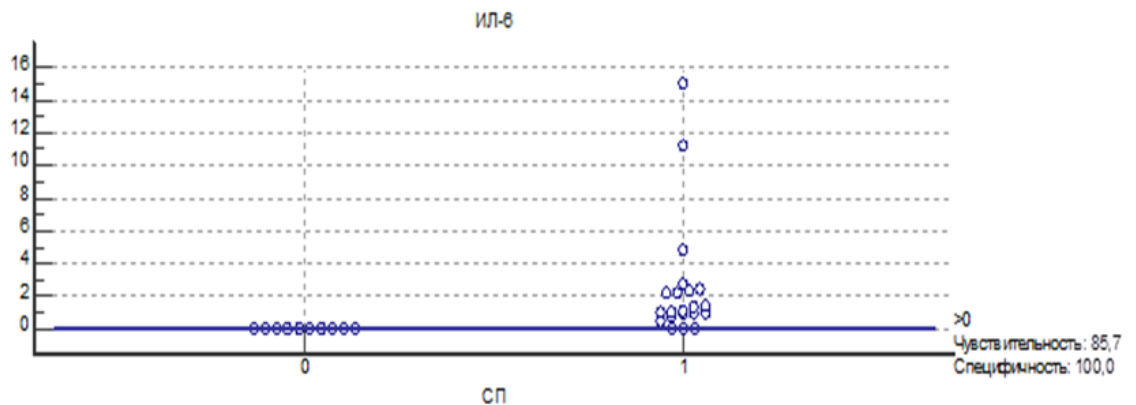


Рисунок 23 – Пороговое значение ИЛ-6 для визуальной оценки баланса чувствительности и специфичности при диагностике НАСП

Таким образом, НАСП диагностируют при значении ИМТ более 24,2 (чувствительность – 100%, специфичность – 100%), ГГТП более 18 Ед/л (чувствительность – 57,1%, специфичность – 100%), ВЭФР более 138 пг/мл (чувствительность – 71,4%, специфичность – 100%) и ИЛ-6 более 0 пг/мл (чувствительность – 85,7%, специфичность – 100%).

Клинические примеры использования расчета индекса стеатоза у пациентов с неалкогольным стеатозом печени

Клинический пример 1. Пациентка А. 49 лет. В течение 4 лет наблюдается у эндокринолога по поводу ожирения. Пришла на плановый консультативный прием. Жалобы на момент осмотра: ощущение тяжести в области печени. Кожа и склеры физиологической окраски, печень +0,5 см ниже края реберной дуги. Живот мягкий, безболезненный. ИМТ 33 кг/м². Уровень ГГТП в сыворотке крови 21 ед/л, концентрация ВЭФР в сыворотке крови 182 пг/мл, сывороточный уровень интерлейкина-6 2,3 пг/мл. Расчет индекса стеатоза: $ИС = -1,2390 + 0,0575 * 33 + 0,0064 * 21 + 0,0006 * 182 + 0,0001 * 2,3 = 0,90$. При округлении до целого числа ИС=1, что свидетельствует о наличии НАСП. Результат согласуется с результатами УЗИ печени.

Клинический пример 2. Пациентка К. 57 лет. В течение 5 лет наблюдается у эндокринолога по поводу ожирения. Пришла на плановый консультативный прием. На момент осмотра пациентка предъявляет жалобы на небольшую утомляемость. Кожа и склеры физиологической окраски, печень +1,0 см ниже края реберной дуги, живот безболезненный. ИМТ 35 кг/м². Уровень ГГТП в сыворотке крови 28 ед/л, концентрация ВЭФР в сыворотке крови 345 пг/мл, сывороточный уровень интерлейкина-6 2,2 пг/мл. Расчет индекса стеатоза: $ИС = -1,2390 + 0,0575 * 35 + 0,0064 * 28 + 0,0006 * 345 + 0,0001 * 2,2 = 1,1$. При округлении до целого числа ИС=1, что свидетельствует о наличии НАСП. Результат согласуется с результатами УЗИ печени.

Клинический пример 3. Пациент Н. 48 лет. В течение 3 лет наблюдается у эндокринолога по поводу избытка массы тела. Пришел на плановый консультативный прием. На момент осмотра пациент предъявляет жалобы на снижение работоспособности. Кожа и склеры физиологической окраски, печень у края реберной дуги, живот мягкий, безболезненный. ИМТ 28 кг/м². Уровень ГГТП в сыворотке крови 45 ед/л, концентрация ВЭФР в сыворотке крови 431

пг/мл, сывороточный уровень интерлейкина-6 0 пг/мл. Расчет индекса стеатоза: $ИС = -1,2390 + 0,0575 * 28 + 0,0064 * 45 + 0,0006 * 431 + 0,0001 * 0 = 0,91$. При округлении до целого числа $ИС = 1$, что свидетельствует о наличии НАСП. Результат согласуется с результатами УЗИ печени.

Клинический пример 4. Относительно здоровая женщина Д. 42 года. Жалобы не предъявляет. При осмотре: кожа и склеры физиологической окраски, живот мягкий, безболезненный. ИМТ 21,8 кг/м². Уровень ГГТП в сыворотке крови 11 Ед/л, концентрация ВЭФР в сыворотке крови 138 пг/мл, сывороточный уровень интерлейкина-6 0 пг/мл. Расчет индекса стеатоза:

$ИС = -1,2390 + 0,0575 * 21,8 + 0,0064 * 11 + 0,0006 * 138 + 0,0001 * 0 = 0,16$. При округлении до целого числа $ИС = 0$, что свидетельствует об отсутствии НАСП. Результат согласуется с результатами УЗИ печени.

Валидация математической модели расчета ИС была проведена на новой группе пациентов с НАСП в количестве 20 человек (10 мужчин и 10 женщин) средним возрастом 44,7±9,6 лет. Нормальный ИМТ имели 3 пациента (15%), повышенный - 8 человек (40%), 4 больных (20%) имели 1 степень ожирения, 5 (25%) - 2 степень. Таким образом, у 45% лиц НАСП был на фоне ожирения (НАСП-О), 55% пациентов со стеатозом имели нормальный и повышенный ИМТ (форма НАСП-БО). У всех пациентов признаки СП подтверждены данными УЗИ, цитолиз отсутствовал.

У 19 пациентов (95%) данной группы значения ИС были более 0,5 (в диапазоне от 0,5 до 1,5), что свидетельствует о наличии СП по критериям модели (табл. 23).

Таблица 23 – Показатели математической модели и расчетный ИС у пациентов с НАСП

| Показатели/ Пациенты с НАСП | Форма НАСП | ИМТ, кг/м ² | ГГТП, Ед/л | ИЛ-6, пг/мл | ВЭФР, пг/мл | ИС |
|-----------------------------------|------------|---------------------------|---------------|----------------|----------------|-----|
| 1 | НАСП-БО | 28 | 45 | 2,4 | 431,1 | 0,9 |
| 2 | НАСП-БО | 26 | 34 | 2,7 | 260,5 | 0,6 |

| | | | | | | |
|----|---------|------|-------|-----|-------|------|
| 3 | НАСП-БО | 29 | 48,8 | 4,8 | 284 | 0,9 |
| 4 | НАСП-БО | 28 | 50 | 0 | 51 | 0,7 |
| 5 | НАСП-БО | 28 | 16,1 | 1,2 | 115,1 | 0,5 |
| 6 | НАСП-БО | 27 | 73 | 4,1 | 323 | 0,9 |
| 7 | НАСП-БО | 24 | 93 | 0 | 136 | 0,8 |
| 8 | НАСП-БО | 24,8 | 19 | 0 | 14,8 | 0,32 |
| 9 | НАСП-БО | 21 | 101,2 | 1,5 | 88,5 | 0,7 |
| 10 | НАСП-БО | 29 | 95 | 6 | 98,4 | 1,1 |
| 11 | НАСП-О | 30 | 43,3 | 1,7 | 123 | 0,8 |
| 12 | НАСП-О | 30 | 70 | 1,3 | 160 | 1 |
| 13 | НАСП-О | 32,1 | 17,7 | 1,9 | 166 | 0,8 |
| 14 | НАСП-О | 33,1 | 43 | 1,7 | 546 | 1,3 |
| 15 | НАСП-О | 39,1 | 20,2 | 1,6 | 143 | 1,2 |
| 16 | НАСП-О | 39,2 | 26 | 1,3 | 300 | 1,3 |
| 17 | НАСП-О | 35 | 66 | 1,0 | 473 | 1,5 |
| 18 | НАСП-БО | 29,7 | 34,5 | 1,5 | 487 | 0,9 |
| 19 | НАСП-О | 38,7 | 79 | 0 | 54,6 | 1,5 |
| 20 | НАСП-О | 35,9 | 49 | 0 | 64,3 | 1,2 |

Таким образом, диагностическая чувствительность модели на новой группе больных составила 95%, что доказывает высокую эффективность предложенного метода диагностики СП и возможность его использования как у лиц с ожирением, так и с нормальной и повышенной массой тела.

Резюме

При НАСП у лиц с ожирением и вторичном стеатозе при вирусном поражении печени регистрируется дислипидемия, нарушение метаболических маркеров, повреждение и ДЭ с гиперпродукцией ВЭФР и повышением функциональной активности ФВ, сходные изменения гемостаза в виде нарушения агрегации ТР и удлинения ТВ, развитие воспалительного синдрома с увеличением выработки провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6.

В экспериментальной и клинических моделях СП выявлены сходные изменения липидного спектра и биометрии печен (гепатомегалия).

Применение расчета индексов HSI, ИФ и APRI позволяет исключить или выявить стеатоз, оценить наличие и степень выраженности фиброза, исключить значимый ФП и ЦП.

Установлены биометрические и лабораторные маркеры, имеющие диагностическое значение для верификации НАСП: ИМТ, ГГТП, ВЭФР и ИЛ-6. На модели больных НАСП-О предложено уравнение множественной регрессии - математическая модель, позволяющая рассчитать ИС, при значении которого равном 0,5 и более, диагностируют наличие НАСП, при ИС менее 0,5 – отсутствие НАСП. Диагностическая чувствительность данной математической модели составила 95,2%, специфичность – 97%. Валидация модели была проведена на новой группе пациентов с НАСП-БО и НАСП-О в количестве 20 человек, чувствительность метода составила 95%.

Глава 5. АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *TNFA* (G308A), *IL6* (C174G) И *VEGFA* (G634C) С РАЗВИТИЕМ НЕАЛКОГОЛЬНОГО СТЕАТОЗА ПЕЧЕНИ У ЛИЦ С ОЖИРЕНИЕМ В ПЕРМСКОМ КРАЕ

Мы исследовали комплекс генетических маркеров: ОНП генов ФНО- α *TNF- α* (G-308A), интерлейкина-6 *IL6* (G-174C) и ВЭФР *VEGFA* (G-634C) у 52 пациентов с НАСП-О и 65 здоровых лиц в г. Перми.

При этом поставили следующие задачи:

1. Сравнить комбинации аллельных вариантов генов *TNF- α* в регионе -308G/A, *IL6* в регионе -174G/C и *VEGFA* в регионе -634G/C у 52 пациентов с НАСП-О и 65 здоровых лиц в Пермском крае.
2. Выявить наличие ассоциации полиморфизма вышеуказанных генов с выработкой патогенетически значимых факторов (ФНО- α , ИЛ-6 и ВЭФР).
3. Составить генетический профиль здоровых лиц и пациентов с применением бальной шкалы.
4. Определить риск развития НАСП у здоровых лиц и риск прогрессирования заболевания у пациентов с ожирением.

5.1 Исследование комбинаций аллельных вариантов исследуемых генов в группах здоровых лиц и больных неалкогольным стеатозом печени в Пермском крае

У пациентов НАСП-О и здоровых лиц в Пермском крае практически с одинаковой частотой выявлялись генотипы GG в 13,46 и 21,54% ($\chi^2=3,23$; $p=0,25$; OR=0,57) и GA в 78,85 и 78,46% ($\chi^2=1,28$; $p=0,96$; OR=1,02) полиморфизма гена *TNF- α* в позиции rs1800629. Значимых различий по распределению аллелей G и A

гена *TNF- α* в регионе -308G/A в изучаемых группах не было обнаружено ($p=0,58$ и $p=0,58$ соответственно). Однако генотип AA гена *TNF- α* в регионе -308G/A значительно чаще регистрировался у больных НАСП-О, чем в популяции здоровых (7,69% и 0% соответственно; $\chi^2=6,05$; $p=0,04$; OR=1,76) (рис. 24).

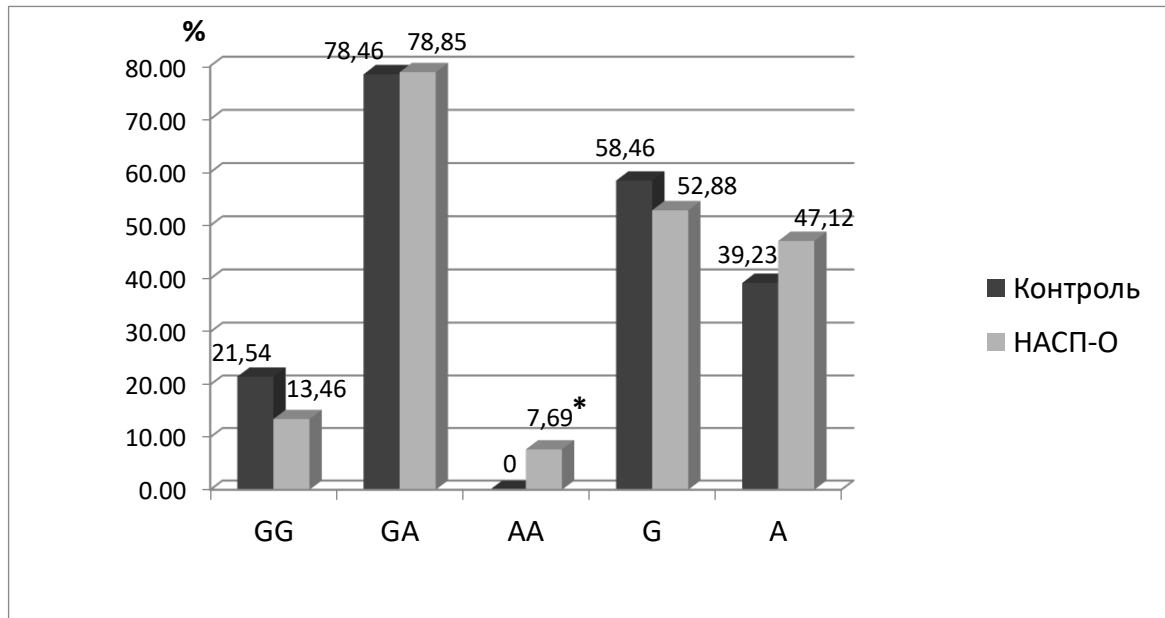


Рисунок 24 – Частота обнаружения аллельных вариаций гена *TNF- α* в регионе -308G/A в позиции rs1800629 в группах здоровых и больных НАСП-О

По полиморфизму гена *IL6* в регионе -174G/C (rs1800795) значимых различий нами не было выявлено. В обеих когортах отмечено преобладание генотипа GC в 52,31 и 51,92% соответственно ($\chi^2=0,36$; $p=0,97$; OR=0,98). Аллели G и C также встречались с одинаковой частотой ($p=0,58$ и $p=0,50$ соответственно) (рис. 25).

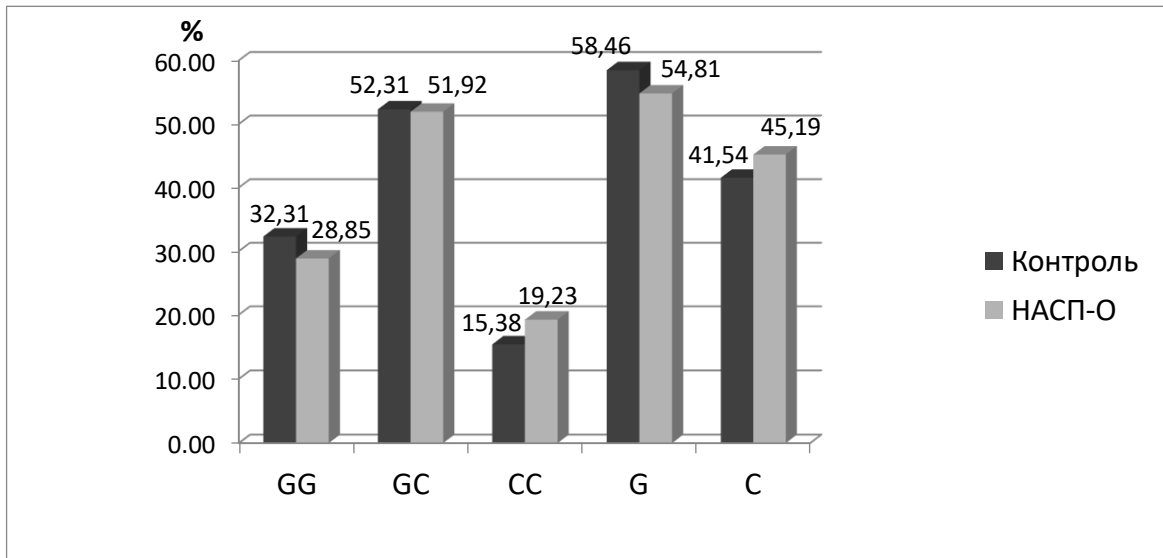


Рисунок 25 – Частота обнаружения аллельных вариаций гена *IL6* в регионе -174G/C в позиции rs1800795 в группах здоровых и больных НАСП-О

При изучении аллельных вариантов гена *VEGFA* (G-634C) в позиции rs2010963 нами было установлено, что гомозигота CC обнаруживалась значительно чаще в когорте больных НАСП-О – в 28,85% случаев (OR=3,36), а у здоровых лишь в 10,77% ($\chi^2=6,18$; $p=0,02$). Аллель C гена *VEGFA* у больных НАСП-О регистрировался в 54,81%, что было значительно выше, чем в контроле ($\chi^2=6,83$; $p=0,01$; OR=2,00) (рис. 26).

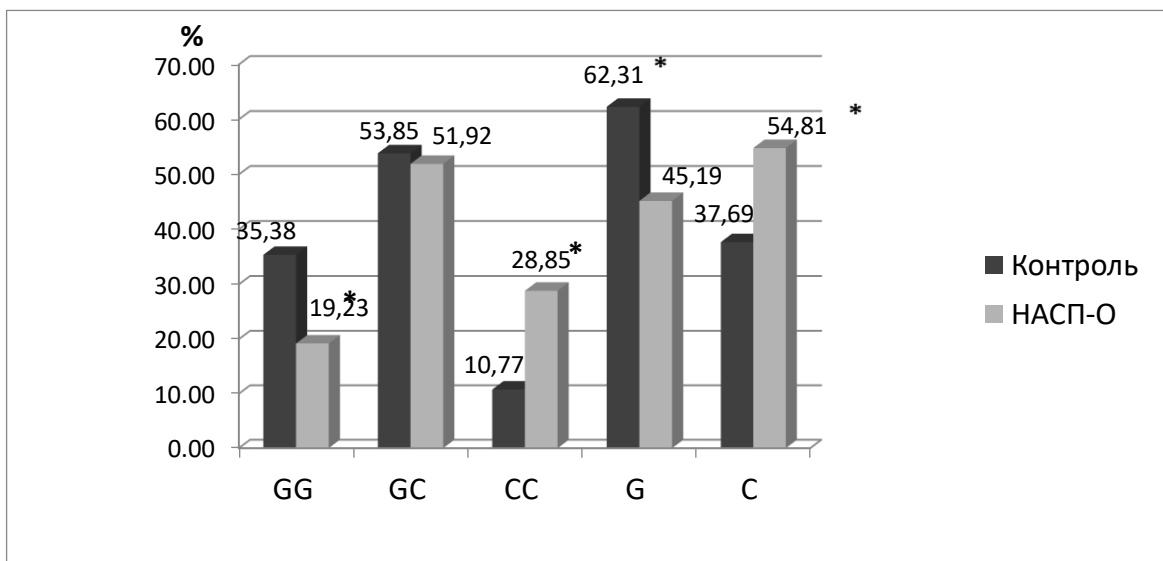


Рисунок 26 – Частота обнаружения аллельных вариаций гена *VEGFA* в регионе -634G/C в позиции rs2010963 в группах здоровых и больных НАСП-О

Следовательно, риск развития НАСП у лиц с ожирением ассоциирован с носительством генотипа AA гена *TNF-α* -308G/A и генотипа CC гена *VEGFA* -634G/C.

5.2 Анализ ассоциации аллельных вариаций генов с выработкой патогенетически значимых факторов

Определение зависимости между изучаемыми качественными признаками проводилось по таблице сопряженности (кросстабуляции).

При оценке зависимости по таблице сопряженности в группе с НАСП-О была выявлена взаимосвязь полиморфизма региона -308G/A гена *TNF-α* с активацией выработки цитокинов ФНО-α и ИЛ-6 ($K_i=0,558$; $p=0,043$ и $K_i=0,597$; $p=0,042$ соответственно), а также ассоциация полиморфизма региона -634G/C гена *VEGFA* с продукцией ФВ ($K_i=0,642$; $p=0,045$), что может приводить к прогрессированию иммуновоспалительного синдрома и ДЭ в группе носителей (табл. 24).

Таблица 24 – Ассоциации генетических маркеров с выработкой патогенетических факторов в группе пациентов с НАСП-О

| "ТАБ" | Кросстабуляция | | | эмпир. | крит. | УРОВЕНЬ ЗНАЧИМОСТИ | |
|------------------|----------------|-------|--------------|--------|----------|--------------------|-----------|
| Переменные: | $K_i =$ | | | знач. | $p=0,05$ | p (альфа) | n' (DF) |
| ген <i>TNF-α</i> | <i>TNF-α</i> | 0,558 | $\chi^2-KB=$ | 5,5 | 6,0 | 0,043 | 2 |
| X Y: | 1 | 2 | 3 | Итого | | | |
| 3 | 1 | 9 | 4 | 14 | | | |
| | 12,5 | 64,3 | 50,0 | 46,7 | | | |
| | 7,1 | 64,3 | 28,6 | 100,0 | | | |
| 4 | 7 | 5 | 4 | 16 | | | |
| | 87,5 | 35,7 | 50,0 | 53,3 | | | |
| | 43,8 | 31,3 | 25,0 | 100,0 | | | |
| Итого | 8 | 14 | 8 | 30 | | | |
| | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | | | |
| | 26,7 | 46,7 | 26,7 | 100,0 | | | |

| "ТАБ" | Кросстабуляция | | | эмпир. знач. | крит. $p=0,05$ | УРОВЕНЬ ЗНАЧИМОСТИ | |
|------------------|----------------|----------|----------|--------------|----------------|--------------------|---------|
| Переменные: | Ki = | | | | | p (альфа) | n' (DF) |
| ген <i>TNF-α</i> | <i>IL6</i> | 0,597 | ХИ-КВ= | 6,3 | 6,0 | 0,042 | 2 |
| X Y: | 1 | 2 | 3 | Итого | | | |
| 3 | 2 | 5 | 6 | 13 | | | |
| | 28,6 | 33,3 | 85,7 | 44,8 | | | |
| | 15,4 | 38,5 | 46,2 | 100,0 | | | |
| 4 | 5 | 10 | 1 | 16 | | | |
| | 71,4 | 66,7 | 14,3 | 55,2 | | | |
| | 31,3 | 62,5 | 6,3 | 100,0 | | | |
| Итого | 7 | 15 | 7 | 29 | | | |
| | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | | | |
| | 24,1 | 51,7 | 24,1 | 100,0 | | | |

| "ТАБ" | Кросстабуляция | | | эмпир. знач. | крит. $p=0,05$ | УРОВЕНЬ ЗНАЧИМОСТИ | |
|---------------|----------------|----------|----------|--------------|----------------|--------------------|---------|
| Переменные: | Ki = | | | | | p (альфа) | n' (DF) |
| <i>VEGF</i> | <i>ФВ</i> | 0,642 | ХИ-КВ= | 2,6 | 6,0 | 0,045 | 2 |
| X Y: | 1 | 2 | 3 | Итого | | | |
| 1 | 3 | 4 | 2 | 9 | | | |
| | 100,0 | 100,0 | 66,7 | 90,0 | | | |
| | 33,3 | 44,4 | 22,2 | 100,0 | | | |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | |
| | 0,0 | 0,0 | 33,3 | 10,0 | | | |
| | 0,0 | 0,0 | 100,0 | 100,0 | | | |
| Итого | 3 | 4 | 3 | 10 | | | |
| | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | | | |
| | 30,0 | 40,0 | 30,0 | 100,0 | | | |

Таким образом, прогрессирование НАСП у лиц с ожирением ассоциировано с носительством полиморфизма генов, определяющих хроническое воспаление *TNF-α* (G308A) и ЭД *VEGFA* (G634C).

5.3 Оценка генетического профиля

Оценка индивидуального генетического профиля здоровых и пациентов с НАСП-О проводилась с использованием бальной шкалы со следующими значениями:

0 – по трем полиморфизмам пациент гомозиготен по протективным аллелям;

1 – гетерозиготен по одному из двух генов;

2 – гетерозиготен по двум генам;

3 – обследуемый имеет обе аллели риска по одному гену, гомозиготен по протективным аллелям по другому гену;

4 – по одному гену у обследуемого имеются обе аллели риска, по другому гену обследуемый гетерозиготен;

5 – обследуемый по обоим генам гомозиготен по аллелям риска *TNF-α* (AA) / *VEGFA* (CC)

По предложенной шкале при наличии у здоровых 0-1 балла риск развития НАСП оценивается как низкий, 2-3 балла – умеренный, 4-5 баллов – высокий. При выявлении у пациентов 0-1 балла, риск прогрессирования НАСП оценивается как низкий, 2-3 балла – умеренный, 4-5 баллов – высокий.

В группе здоровых более половины (51%) имели низкий риск развития НАСП (0-1 балл по шкале), 38% - умеренный (2-3 балла), 11% - высокий (4 балла) (табл. 25).

Таблица 25 – Генетический профиль здоровых и пациентов с НАСП-О

| Группы/баллы | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------|---|----|----|---|----|---|
| Доноры, % | 9 | 42 | 35 | 3 | 11 | - |
| НАСП, % | 2 | 23 | 40 | 4 | 29 | 2 |

В группе пациентов 25% имели низкий риск прогрессирования НАСП (0-1 балл), почти половина больных (44%) – умеренный (2-3 балла), а треть обследуемых (31%) – высокий риск (4-5 баллов) по шкале.

Следовательно, определение генетических вариантов полиморфизма гена *TNF-α* (G308A) и *VEGFA* (G634C) может служить дополнительным критерием прогнозирования риска развития и прогрессирования НАСП у лиц с ожирением.

Резюме

У пациентов с НАСП-О в регионе -308G/A гена *TNF-α* значимо чаще обнаруживалась гомозигота AA, чем в популяции здоровых.

При изучении комбинаций аллельных вариантов гена -634G/C *VEGFA* в позиции rs2010963 гомозигота CC и аллель C значимо чаще регистрировалась в группе больных НАСП-О, чем у практически здоровых лиц.

По генотипам и аллелям полиморфизма гена *IL6* в регионе -174G/C (rs1800795) не выявлено статистически значимой разницы.

Таким образом, генетическими факторами риска развития НАСП у лиц с ожирением в Пермском крае следует считать носительство AA-вариантов гена *TNF-α* (G308A) и CC-варианта гена *VEGFA* (G634C).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

НАЖБП занимает первое место в структуре хронических заболеваний печени – 71,6%, встречается по разным данным у 20-40% людей в мире, в Российской Федерации – 37,3% согласно протоколу DIREG2 [20, 36, 45]. Частота НАЖБП при ожирении составляет от 70 до 100%. Однако наличие НАЖБП возможно также у лиц с нормальным весом. Так, согласно последнему метаанализу Shi Y. и соавторов (2019) распространенность НАЖБП у лиц без ожирения составляет 15,7% [193].

Активно обсуждается проблема сочетания вирусных и метаболических повреждений печени. Было установлено, что распространенность вторичного вирус-ассоциированного стеатоза печени колеблется от 30 до 80% при вирусных поражениях печени [2, 15, 75, 106, 178].

НАЖБП – неоднородное по фенотипам заболевание, которое в 70–90% случаев представлено клинико-морфологической формой НАСП. У 10-30% пациентов развивается НАСГ, прогрессирующая форма НАЖБП, ассоциированная с гепатоцеллюлярным повреждением и воспалением. У 25–40% пациентов с НАСГ впоследствии развивается ФП, постепенно ведущий к циррозу органа в 20–30% случаев [20, 43, 46, 71, 73].

Патогенез НАЖБП многофакторный, многоэтапный, пусковыми точками которого являются ИР и изменение профиля гормонов - регуляторов жирового обмена. В настоящее время этиопатогенез НАЖБП рассматривают, как сложные взаимодействия множественных генетических, средовых (питание, физическая активность), адаптационных факторов и гормональных особенностей [45, 51, 185].

К эндогенным факторам риска развития НАЖБП относятся: несбалансированное питание с пере- или недоеданием, низкая физическая активность, синдром избыточного бактериального роста с гиперэндотоксинемией, нарушение энтерогепатической циркуляции желчных кислот. Фруктоголизм и фруктозная болезнь печени – новые термины, обозначающие зависимость от продуктов, содержащих быстроусваиваемую фруктозу, и метаболическую

НАЖБП вследствие избыточного употребления таких продуктов, соответственно [114, 183].

На сегодняшний день диагностика стеатоза представляет значительные трудности, поскольку требует исключения других заболеваний печени. Следует учитывать, что «золотого стандарта» неинвазивной диагностики НАЖБП нет [177, 217]. Методы диагностики НАЖБП включают оценку клинико-лабораторных показателей, неинвазивные инструментальные методы (УЗИ, эластография/эластометрия, КТ, МРТ), инвазивные (пункционная биопсия печени) и малоинвазивные методы – расчетные ИС и ИФ [20, 31, 36, 45, 51, 216].

Однако клинико-лабораторная картина при СП как правило скудная. Применение инвазивных методов ограничено в связи с наличием противопоказаний и риском осложнений. Инструментальные методы не всегда дают четкое представление об активности процесса, наличия и степени выраженности фиброза, неинформативны у пациентов с большим избытком подкожного жирового слоя. Часть существующих панелей запатентованы, выполняются с определенными реактивами, либо включают большой перечень лабораторных тестов. Поэтому, актуален дальнейший поиск неинвазивных доступных маркеров СП, позволяющих реализовать их в общеклинической практике.

В последние годы активно изучают проблему наследственной предрасположенности к развитию НАЖБП. [69]. К значимому аспекту следует отнести наличие полиморфизма генов, регулирующих иммунновоспалительные процессы. Определение региональных особенностей генетических мутаций при оценке риска развития НАЖБП имеет значение для отечественной популяции в целом [30, 40, 44, 65].

Таким образом, многообразие фенотипов НАЖБП, распространенность этой нозологии у лиц с нормальным весом, влияние генетических факторов развитие и прогрессирование стеатоза, недостаточная изученность механизмов вторичного накопления жира при вирусных поражениях печени и трудности диагностики обуславливают необходимость более глубокого изучения СП.

Актуальной остается проблема терапии и профилактики НАЖБП. Недавно в литературе появились данные о растении Джинура Прокумбенс, обладающем широким терапевтическим спектром. Джинура Прокумбенс носит официальное международное название *Gynura Procumbens*, растение из сложноцветного семейства астровых [126]. По данным литературы экстракт из стеблей Джинуры Прокумбенс снижает уровень АЛТ и уменьшает накопление липидов в печеночной ткани [132]. В связи с этим представляет интерес изучение гепатопротективных свойств Джинуры Прокумбенс при СП.

Целью экспериментально-клинического исследования было уточнить патогенетические механизмы и генетические риски разных форм СП для обоснования новых подходов к диагностике и гепатопротекции. Экспериментальная часть исследования проводилась на 50-ти неинбредных половозрелых белых крысах-самцах возрастом 7 месяцев и массой тела - 400-530 г.

Были сформированы 3 группы животных.

Группа 1 – «Контроль» (n=18) – здоровые, интактные животные. Для кормления этой группы использовался полноценный сбалансированный стандартный гранулированный корм, одобренный для лабораторных животных (крыс и мышей) (ООО «Лабораторкорм», Россия).

Группа 2 – «Стеатоз» (n=18). Кормление осуществляли аналогично животным первой группы с использованием 15%-ного раствора фруктозы в качестве питьевой воды.

Группа 3 – «Стеатоз + ДП» (n=14) – крысы, у которых моделировали стеатоз аналогично тому, как это осуществлялось в группе «Стеатоз печени». Одновременно, с первого дня исследования, проводили ежедневное интрагастральное введение экстракта листьев Джинуры Прокумбенс (производство *Via Vitae Estate*, Кипр) с помощью зонда, из расчета 0,5 г на 1 кг веса животного в день, однократно, на протяжении 30 суток [130].

Учитывая, что на сегодняшний день доказана роль фруктозы как фактора риска НАЖБП у лиц без ожирения, мы предположили, что выбранная нами

экспериментальная модель фруктозоиндуцированного стеатоза печени может формировать неалкогольный стеатоз без ожирения (НАСП-БО) [93, 141].

Ежедневно производились осмотр животных, оценка их поведения, состояния шерсти, активности, аппетита; осуществлялось измерение массы тела. В конце эксперимента, на 30-й день, крыс подвергали эвтаназии с помощью эфирного наркоза, производили прямой забор крови из правого предсердия для лабораторных исследований.

Обследование экспериментальных животных включало в себя измерение биометрических показателей (масса тела, масса печени, расчет массового коэффициента печени) и определение лабораторных показателей: АЛТ, АСТ, ЩФ, общий белок, альбумин, глюкоза, липидный спектр, концентрация цитокина ИЛ-6, функциональная активность ФВ, агрегационная активность ТР с индуктором АДФ, показатели коагуляционного гемостаза и системы фибринолиза: ПВ, ТВ, АЧТВ, фибриноген и ХЗФ.

При моделировании фруктозоиндуцированного стеатоза печени, а также в группе животных, получавших экстракт Джинуры Прокумбенс, летальности не отмечалось. Полученные данные подтверждают обоснованность выбора применяемой модели

После вывода животных из эксперимента определяли массу печени и ее массовый коэффициент (МК). Известно, что у пациентов с НАЖБП нередко наблюдается гепатомегалия, которая может быть обусловлена дистрофическими изменениями печеночных клеток, жировой и лимфомакрофагальной инфильтрацией, формированием узлов и фиброзированием, застоем крови [35].

Нами установлено, что массовый коэффициент печени был статистически значимо выше в группе «Стеатоз» по сравнению с группой контроля (3,75 (3,38–3,99) и 3,5 (3,3–3,6), соответственно) ($p=0,009$). У животных, получавших ДП, этот показатель был ниже, чем в группе «Стеатоз» и практически не отличался от такового в группе контроля – 3,5 (3,4–3,9) %. Данный факт согласуется с полученными нами результатами гистологического исследования и подтверждает

эффективность экстракта ДП в качестве профилактического средства, снижающего риск развития морфологических изменений печени при НАСП.

При сравнении массы тела до начала эксперимента и по его окончании в каждой группе животных статистически значимых различий не обнаружено, что подтверждает форму НАСП-БО в данной экспериментальной модели.

Ткань печени животных подвергалась гистологическому исследованию. Гистологический анализ проводился с окраской срезов гематоксилином и эозином по общепринятой методике. Для подтверждения наличия нейтральных липидов в цитоплазме гепатоцитов и уточнения степени стеатоза в группе «Стеатоз» пять образцов были исследованы с помощью окраски замороженных срезов суданом III, без докраски гематоксилином и эозином. При микроскопии оценивали наличие признаков стеатоза – число гепатоцитов с включениями липидов, наличие скоплений клеток воспалительного инфильтрата и баллонной дистрофии, определяли процент гепатоцитов со стеатозом и ИС; наличие признаков воспаления и фиброза (по Kleiner, 2005).

Результаты гистологического исследования тканей печени показали, что у животных в группе «Стеатоз» при окраске гематоксилином и эозином определялись гепатоциты с характерными изменениями (50-80%), что соответствует II-III степени стеатоза, признаки воспалительно-клеточной инфильтрации, белковой дистрофии и фиброза отсутствовали. Описанная структурная реорганизация печени подтверждает адекватность использованного способа моделирования данного заболевания. В печеночной ткани лабораторных животных группы «Стеатоз+ДП» также обнаруживались гепатоциты с признаками жировой инфильтрации, однако процент таких гепатоцитов существенно меньше – 20-40%, соответственно, степень стеатоза – I-II, Признаки воспалительно-клеточной инфильтрации, белковой дистрофии и фиброза отсутствовали. В контрольных образцах признаки жировой и белковой дистрофии гепатоцитов, воспалительно-клеточная инфильтрация и признаки фиброза отсутствовали. Полученные данные свидетельствуют о том, что у экспериментальных животных курсовое введение экстракта листьев Джинуры

Покумбенс препятствует формированию характерных для жирового гепатоза морфологических изменений в ткани печени.

Патогенез НАЖБП – многофакторный процесс, в развитии которого нарушение липидного обмена занимает одну из лидирующих позиций. В структуре гепатоцеллюлярных липидов наибольший процент составляют ТГ, избыток которых накапливается в основном благодаря поступающим из пищи жирных кислот, и повышенному липогенезу в печени вследствие гиперинсулинемии. Накопление в цитоплазме гепатоцитов нейтральных липидов в виде капель может являться результатом избыточного попадания свободных жирных кислот в печень или повышенного их образования из ацетилкоэнзима [11]. Следует отметить, что метаболизм фруктозы в печени по гликолитическому пути происходит гораздо быстрее, чем глюкозы, что позволяет фруктозе интенсифицировать в печени биохимические процессы, ведущие к синтезу жирных кислот, ТГ и ЛПОНП [136, 137].

При анализе показателей липидограммы установлено, что в процессе формирования СП у животных развивается дислипидемия, проявляющаяся статистически значимо более выраженными триглицеридемией ($p_{1-2}=0,012$), ЛПОНП-емией ($p_{1-2}=0,008$) и статистически значимым снижением концентрации ЛПВП ($p_{1-2}=0,001$), что согласуется с данными литературы [35].

В результате проведения корреляционного анализа с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена установлено, что изменение параметров липидограммы у крыс в группе «Стеатоз» (ХС, ТГ, ЛПНП, ЛПОНП) тесно коррелируют с показателями гемостаза (АЧТВ), уровнем глюкозы, общим белком и альбумином.

Клиническими и экспериментальными исследованиями установлено, что НАЖБП сопровождается дисбалансом между отдельными звеньями и механизмами системы гемостаза. В литературе имеются разнонаправленные данные о нарушениях системы гемостаза при НАЖБП [186]. В патогенезе гемостазиологических нарушений при СП важную роль играют дисфункция ТР и изменение активности одного из ключевых белков гемостаза – гликопротеина

плазмы крови фактора фон Виллебранда (vWF). Этот фактор синтезируется эндотелием и обеспечивает адгезию ТР к поврежденной сосудистой стенке.

По данным литературы у крыс с экспериментальной НАЖБП наблюдалось повышение ФВ, увеличение агрегационной активности ТР, повышение концентрации фибриногена, продуктов деградации фибрина, а также уменьшение времени свертывания и кровотечения [172, 186].

Для оценки сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза нами были использованы тесты: индуцированная агрегация ТР с АДФ (%) и активность ФВ (%). Статистически значимых различий этих показателей у животных разных групп не обнаружено.

В силу того, что ФВ синтезируется эндотелием, изменение его концентрации расценивается как один из маркеров ЭД. В экспериментах на животных было доказано, что в патогенезе НАЖБП эндотелиальная дисфункция может быть одним из факторов, связанных с накоплением липидов и повреждением печени [202]. В клинической практике также была доказана системная ДЭ у лиц с НАЖБП [18].

В наших исследованиях мы не обнаружили статистически значимого изменения активности ФВ у экспериментальных животных. Можно предположить, что на столь ранних этапах формирования НАЖБП этот патофизиологический механизм не является ведущим.

При оценке плазменного звена гемостаза у животных группы «Стеатоз» обнаружено статистически значимое изменение показателей, отражающих активность коагуляционного гемостаза по внешнему механизму свертывания, по сравнению с контролем. Установлено снижение активности факторов протромбинового комплекса (факторов II, VII, X, V), синтезирующихся в печени (удлинение ПВ ($p_{1-2}=0,034$)). В группе животных, получавших экстракт листьев ДП, наблюдаются аналогичные изменения этого показателя, при этом статистически значимых различий ПВ у животных 2-й и 3-й групп не обнаружено. Полученные результаты можно объяснить возможным нарушением белкосинтетической функции при НАЖБП. VII фактор имеет самый короткий

период полураспада (7 часов) и первым уменьшается при печеночной недостаточности.

Анализ корреляции параметров, отражающих активность внешнего механизма свертывания крови (ПВ) и уровня провоспалительного цитокина ИЛ 6 показал их статистически значимую ассоциацию. Это объясняется тем, что система гемостаза – одна из интегративных систем организма, многие факторы которой участвуют в процессах воспаления, равно как и большинство медиаторов воспаления в той или иной степени регулируют работу всех звеньев гемостаза.

АЧТВ – один из базовых показателей гемостазиограммы. Он, прежде всего, отражает эффективность внутреннего пути свертывания крови, хотя чувствителен к дефициту всех факторов, кроме фактора VII. Нами установлено, что показатель АЧТВ у животных с стеатозом выше, чем в контроле (35,3 (32,4–37,1) и 38,30 (37,92–39,50), соответственно), однако эти изменения статистически не значимы. Применение экстракта ДП вызвало статистически значимое уменьшение АЧТВ по сравнению с группой «Стеатоз» ($p_{2-3}=0,000$) наряду с отсутствием статистически значимых различий с контролем ($p_{1-3}=0,072$), что, на наш взгляд, можно расценивать, как определенное положительное влияние ДП на функциональную активность гепатоцитов.

У животных группы «Стеатоз» показатель ТВ имеет тенденцию к увеличению, хотя статистической значимости различий в сравнении с контролем не наблюдается. Интересно, что по данным ряда авторов дефицит тканевого фактора в кроветворных клетках резко снижает уровень тромбинемии и развитие НАЖБП у мышей с гиперхолестеринемией [144].

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что ключевыми звеньями патогенеза стеатоза являются морфологические изменения печеночной ткани, проявляющиеся жировой инфильтрацией; нарушение липидного обмена и коагуляционного гемостаза, что позволило нам уточнить особенности патогенеза фруктозоиндуцированного стеатоза печени (форма НАСП-БО). Курсовое интрагастральное введение экстракта листьев Джинуры Прокумбенс экспериментальным животным с

фруктозоиндуцированным стеатозом оказывает гепатопротекторное действие при НАСП: препятствует формированию гепатомегалии и характерных для стеатоза морфологических изменений в ткани печени.

Полученные результаты экспериментального исследования позволяют дополнить имеющиеся представления о ключевых моментах патогенеза неалкогольного жирового гепатоза и открывают перспективы дальнейшего изучения возможности применения экстракта листьев Джинуры Прокумбенс при СП.

Общее количество обследованных по клинической части составило 141 человек. Было сформировано три группы: 1-я группа – контроль (практически здоровые лица) в количестве 65 человек (35 женщин и 30 мужчин) без патологии печени средним возрастом $42,3 \pm 7,0$ года, 2-я группа – 52 человека с неалкогольным стеатозом печени и ожирением (НАСП-О), в том числе 17 мужчин (33%) и 35 женщин (67%) средним возрастом $43,0 \pm 11,1$ года и 3-я группа – 24 пациента с вторичным СП на фоне ХГС в фазе ремиссии, среди которых было 11 (46%) мужчин и 13 (54%) женщин средним возрастом $37,6 \pm 4,3$ лет. От всех участников исследования было получено письменное информированное добровольное согласие.

Все участники исследования проходили подробное общеклиническое обследование, измерение биометрических параметров (рост, вес, ИМТ), определение лабораторных и генетических показателей и инструментальное обследование. Лабораторное обследование пациентов и группы контроля включало в себя определение биохимических параметров: АЛТ, АСТ, ГГТП, ЩФ, фракций билирубина, общего белка и альбумина; метаболических показателей (глюкоза, липидный спектр, инсулин, лептин, С-пептид, НОМА-IR); концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6; маркеров повреждения эндотелия - активность ФВ и концентрацию ВЭФР; параметры гемостаза – ТВ, ПВ, АЧТВ, ХЗФ, фибриноген, уровень ТР и агрегатограмма (индуцированная агрегация с индукторами АДФ, коллагеном, адреналином и ристоцетином); концентрация АФП и расчет ИС и ФП (HSI, ИФ, APRI).

Генетическое исследование включало определение ОНП генов *TNF-α* (G-308A), *IL6* (G-174C) и *VEGFA* (G-634C) у 52 пациентов с НАСП-О и 65 здоровых лиц. Инструментальное обследование заключалось в проведении УЗИ органов брюшной полости и печени для верификации стеатоза в обеих клинических группах и ультразвуковой эластографии печени у больных вторичным стеатозом для стратификации ФП. Наличие в крови РНК вируса гепатита С, уровень вирусной нагрузки и генотип выявляли методом ПЦР, серологические маркеры – методом ИФА.

По данным обследования картина клинической симптоматики у пациентов обеих исследуемых групп была схожа. Жалобы предъявляли от 10 до 30% больных. Стоит отметить, что астенический и болевой синдромы чаще регистрировались у пациентов с вторичным СП. По данным инструментальных методов у пациентов обеих групп имелись признаки СП, у больных с вторичным стеатозом на фоне вирусного поражения печени наблюдался фиброз 1-2 стадии. Плотность печени по данным эластографии в этой группе составила 6,7 (6,1; 7,3), что соответствует стадии F1-2. У 80% пациентов из этой группы наблюдалась 1 стадия ФП, 20% имели фиброз 2 стадии. Распределение по генотипам вируса в группе с вторичным СП было следующим: 12 лиц (50%) с генотипом HCV-3, 8 человек (33%) имели генотип HCV-1 и 4 пациента (16%) – HCV-2.

У пациентов с НАСП имелись признаки ожирения, ИМТ равнялся в среднем $37,2 \pm 2,6$ и статистически значимо превышал значения этого показателя практически здоровых лиц $20,7 \pm 1,0$ ($p=0,001$). В группе с вторичным вирус-ассоциированным стеатозом ИМТ в среднем был $25,5 \pm 2,5$, что тоже превышало данные контроля ($p=0,002$). Но стоит отметить, что в этой группе большая часть пациентов (85%) имели показатели ИМТ до $24,9 \text{ кг/м}^2$, что по ВОЗ соответствует нормальной массе тела. У 15% больных были повышены значения ИМТ в диапазоне от $24,9$ до $29,0 \text{ кг/м}^2$ без признаков ожирения. По данным исследований превышение ИМТ отмечается у 12% пациентов с гепатитом С [15], что сопоставимо с нашими результатами.

Биохимические параметры в обеих исследуемых группах больных находились в пределах референсных значений, хотя маркеры холестаза были значимо выше группы контроля. По данным литературы уже на стадии стеатоза может выявляться повышение уровня ГГТП в среднем до уровня 3–4 верхних пределов нормы [36, 45, 64].

Уровень глюкозы у пациентов с НАСП-О и вторичным СП не имел значимых различий от группы здоровых. Однако у отдельных больных НАСП-О, имеющих СД 2 типа этот показатель был выше нормы. Липидный спектр у пациентов обеих исследуемых групп статистически значимо отличался от контроля, регистрировались: гипертриглицеридемия, снижение ЛПВП, повышение ЛПОНП. Более выраженная дислипидемия наблюдалась при НАСП-О в сочетании с гиперинсулинемией, повышением индекса НОМА-IR, уровня лептина и С-пептида.

По данным литературы дислипидемия в виде гипертриглицеридемии, снижения ЛПВП и повышения ЛПНП выявляется примерно у 55-80% больных с НАЖБП, а у 75% пациентов отмечается повышение уровня глюкозы натощак, изменение глюкозотолерантного теста, повышение инсулина и С-пептида [64]. Нарушения метаболических тестов, преимущественно в виде гипертриглицеридемии, качественного изменения липопротеинового спектра, повышения уровня инсулина, индекса НОМА-IR, С-пептида и лептина отмечается по разным данным у 20-80% больных вирусными поражениями печени [15, 70, 75, 150]. Ряд исследователей находили корреляцию стеатоза с уровнем вирусемии и стадией ФП, что свидетельствует в пользу вирус-индуцированного механизма метаболических нарушений [15, 150, 166]. По некоторым данным более выраженные метаболические нарушения в виде уменьшения концентрации холестерина, гиперинсулинемии, гиперлептинемии и повышения уровня С-пептида маркируют переход в цирроз [15].

Индекс HSI у практически здоровых лиц был менее 30, что исключает СП и соотносится с данными литературы [148]. В группах с НАСП-О и вторичным СП значения данного показателя превышали 30, что подтверждает наличие

стеатоза в обеих группах больных. При этом показатели индекса HSI у пациентов с НАСП-О были выше значений группы с вторичным СП, что свидетельствует о более выраженном жировом поражении печени.

ИФ в группе контроля варьировал в интервале от 0 до 0,5, что исключает ФП и соотносится со значениями авторов патента [84]. Значения ИФ у 67% пациентов с НАСП-О были менее 0,5, что свидетельствует об отсутствии признаков ФП. При этом у 23% больных этой группы ИФ был более 0,5 (от 0,56 до 1,2), что соответствовало начальной стадии фиброза. У всех пациентов с вторичным СП данный индекс превышал 0,5 (от 0,6 до 1,5) и соответствовал умеренной стадии фиброза, что укладывается в диагностические характеристики метода, указанные в патенте [84]. У обследуемых всех групп расчетный индекс APRI был менее 0,5, что исключает значимый ФП и ЦП и соответствует данным методики [209].

Таким образом, использование расчетных индексов HSI, ИФ и APRI позволяет исключить или выявить стеатоз, оценить наличие и степень выраженности фиброза, исключить значимый ФП и ЦП.

При анализе показателей гемостаза в группах с НАСП-О и вторичным стеатозом на фоне вирусного поражения печени количество ТР значимо не отличались от контроля. В обеих группах пациентов наблюдалось снижение агрегации с коллагеном ($p=0,002$ и $p=0,04$ соответственно) и с АДФ ($p=0,02$ и $p=0,03$ соответственно). При этом агрегация ТР с ристоцетином и функциональная активность ФВ напротив в группе с НАСП-О ($p=0,001$ и $p=0,01$) и вторичным СП ($p=0,001$ и $p=0,001$) была выше, чем в контроле. Есть мнение, что нарушение агрегации ТР при вирусных поражениях печени обусловлено дефектами механизмов передачи сигнала, дефицитом пула хранения плотных гранул и уменьшением содержания арахидоновой кислоты в мембране ТР [85].

Известно, что печень является одним из ключевых органов, обеспечивающих стабильную работу системы гемостаза. Данные литературы по исследованию гемостаза при НАЖБП в литературе весьма противоречивы. Было установлено, что при НАЖБП наблюдается повышенная активация ТР, вероятно

связанная с нарушением их биофизического состояния мембран, что может способствовать развитию протромботического состояния у пациентов [201]. Также есть данные об отсутствии значимых изменений в количестве, активации и агрегации ТР при стеатозе, которые наступают только при прогрессировании процесса в стеатогепатит, ФП и ЦП. Нами обнаружены разнонаправленные реакции ТР с индукторами агрегации.

По уровню ФВ тоже неоднозначные данные в литературе. Одни авторы не находили значимых различий в активности ФВ при НАЖБП от контрольной группы [179]. В ряде других работ было обнаружено, что ФВ значительно повышается при стеатозе, что может быть следствием повреждения эндотелия, при этом было показано, что этого маркера в крови коррелирует с выраженностью гистологических изменений в печени [99, 199, 207]. По данным литературы при вирусных поражениях печени возрастает агрегационная способность ТР и активность ФВ [82]. Это частично согласуется с результатами, полученными в нашем исследовании.

Также представляют интерес исследования, посвященные системе коагуляционного гемостаза и фибринолиза при СП. В одних исследованиях сообщается, что у больных НАЖБП наблюдается высокое содержание протромботических факторов в крови, коррелирующее с выраженностью гистологических изменений в печени, что позволило предположить, что стеатоз и сам вносит определенный вклад в риск тромбоза [169]. В одном из недавних исследований напротив авторы пришли к выводу, что состояние гемостаза при СП практически ничем не отличается от здоровых людей [179]. По некоторым данным изменение параметров гемостаза коррелирует с прогрессированием поражения печени: уменьшается уровень ТР, фибриногена, удлиняется АЧТВ, что сочетается с укорочением времени лизиса [17].

По нашим данным ТВ было значимо удлинено в обеих группах больных в сравнении с практически здоровыми лицами ($p=0,001$ и $p=0,001$ соответственно), что может свидетельствовать о нарушении синтетической функции печени.

Таким образом, при НАСП-О и вторичном стеатозе на фоне вирусного поражения печени регистрируются сходные изменения показателей гемостаза в виде нарушения агрегации ТР (гипоагрегация с коллагеном и АДФ и гиперагрегация с ристоцетином), повышение функциональной активности ФВ и удлинение ТВ.

При анализе сывороточной концентрации провоспалительных цитокинов у пациентов обеих исследуемых групп было зарегистрировано повышение ФНО- α и ИЛ-6 в сравнении с контролем. Полученные нами данные согласуются с рядом других исследований, которые изучали цитокиновый статус при НАЖБП. Установлена положительная корреляция между ФНО- α , ИЛ-6, активностью стеатогепатита и индексом гистологической активности в печени [23, 220].

Во многих работах показано, что развитие фибротических изменений в печени связано с уровнем продукции провоспалительных цитокинов [16, 58, 76, 77, 86, 167]. По нашим данным у пациентов с вторичным СП сывороточные концентрации ФНО- α и ИЛ-6 были значимо выше, чем у больных НАСП ($p=0,021$, $p=0,039$ и $p=0,002$ соответственно). Таким образом, течение НАСП-О и вторичного стеатоза ассоциировано с активацией провоспалительных цитокинов, более выраженном при вирус-ассоциированном СП.

Синдром повреждения эндотелия с гиперпродукцией ВЭФР наблюдался в обеих группах пациентов, причем при вторичном стеатозе концентрация данного маркера была значимо выше, чем при НАСП-О ($p=0,002$). Степень повреждения эндотелия по ВЭФР у мужчин с НАСП-О больше, чем у женщин ($p=0,031$). При этом у женщин наблюдалась значимо большая активация выработки ФНО- α и ИЛ-6, чем у мужчин в этой группе ($p=0,029$ и $p=0,005$ соответственно). То есть у женщин течение формы НАСП-О сопровождается более выраженным воспалительным синдромом, а у мужчин преобладает синдром ЭД. В группе с вирус-ассоциированным стеатозом значимых различий цитокинового статуса по полу не было выявлено.

В группе пациентов с НАСП-О концентрация ВЭФР прямо коррелировала с уровнем ФВ ($r = 0,624$; $p < 0.001$), а цитокины ФНО- α и ИЛ-6 – друг с другом ($r =$

0,510; $p = 0,004$). У больных с вторичным стеатозом отмечалась прямая взаимосвязь ФНО- α с ИЛ-6 ($r = 0,575$; $p < 0,001$). По данным литературы повышение уровня цитокинов в крови при НАЖБП прямо коррелирует с тяжестью болезни и со степенью ЭД. [21, 63].

Таким образом, НАСП у лиц с ожирением и вирус-ассоциированный стеатоз характеризуются развитием воспалительного синдрома и повреждением эндотелия, ассоциированными с увеличением выработки провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6 и гиперпродукцией ВЭФР, более активными при вторичном стеатозе. Выраженность процессов стеатоза в печени нарастает по мере активации механизмов воспаления и повреждения эндотелия.

Выявленные многочисленные значимые корреляции биометрических, лабораторных и расчетных параметров в группе с НАСП у лиц с ожирением и у пациентов с вторичным стеатозом подтверждают взаимосвязи метаболических нарушений, воспаления, повреждения эндотелия и дисфункции гемостаза в развитии стеатоза, а также возможность использования этих маркеров для диагностики степени поражения печени.

Таким образом, применив единый лабораторный алгоритм мы изучили механизмы развития разных форм стеатоза: в эксперименте при моделировании фруктозоиндуцированного стеатоза у лабораторных животных (форма НАСП-БО) и в клинической части у пациентов с формой НАСП-О и вирус-ассоциированным стеатозом. Анализируя результаты исследования, полученные в ходе экспериментальной и клинической части при СП разного генеза нами выявлены сходные изменения липидного спектра и биометрии печени (гепатомегалия).

В рамках данного исследования установлены биометрические и лабораторные маркеры, имеющие диагностическое значение для верификации НАСП: ИМТ, ГГТП, ВЭФР и ИЛ-6. На модели больных НАСП предложено уравнение множественной регрессии – математическая модель, позволяющая рассчитать ИС (Приоритетная справка №2021106422 от 11.03.2021г.). Формула для его расчета имеет вид:

$$ИС = -1,2390 + 0,0575 * ИМТ + 0,0064 * ГГТП + 0,0006 * ВЭФР + 0,0001 * ИЛ6$$

При значении ИС, равном 0,5 и более, диагностируют наличие НАСП, при ИС менее 0,5 – отсутствие НАСП. Диагностическая чувствительность данной математической модели составила 95,2%, специфичность – 97%.

Валидация математической модели расчета ИС была проведена на новой группе пациентов с НАСП в количестве 20 человек, из которых у 45% НАСП был на фоне ожирения (НАСП-О), 55% имели форму НАСП-БО. Диагностическая чувствительность модели на новой группе больных составила 95%, что доказывает высокую эффективность предложенного метода диагностики СП и возможность его использования как у лиц с ожирением, так и с нормальной и повышенной массой тела.

Далее в рамках работы были исследованы особенности ОНП генов ФНО- α *TNF- α* (G-308A), интерлейкина-6 *IL6* (G-174C) и ВЭФР *VEGFA* (G-634C) у 52 пациентов с НАСП-О и 65 здоровых лиц в г. Перми.

Генотип AA гена *TNF- α* в регионе -308G/A значимо чаще регистрировался у больных НАСП-О, чем в популяции здоровых (7,69% и 0% соответственно; $\chi^2=6,05$; $p=0,04$; OR=1,76) в Пермском крае, что отмечали другие исследователи у жителей Азиатско-Тихоокеанского региона [222].

По полиморфизму гена *IL6* в регионе -174G/C (rs1800795) значимых различий нами не было выявлено, что было показано и в других работах [109].

При изучении аллельных вариантов гена *VEGFA* (G-634C) в позиции rs2010963 гомозигота CC обнаруживалась значимо чаще в когорте больных НАСП с ожирением – в 28,85% случаев, а у здоровых лишь в 10,77% ($\chi^2=6,18$; $p=0,02$). Аллель C гена *VEGFA* в регионе -634G/C у больных НАСП-О регистрировался в 54,81%, что было значимо выше, чем у здоровых ($\chi^2=6,83$; $p=0,01$; OR=2,00).

Таким образом, можно предположить, что предикторами развития НАСП у лиц с ожирением в Пермском крае является аллель C в локусе гена *VEGFA* (G-634C). Доказана значимость аллеля C этого генетического маркера при хронизации вирусных заболеваний печени [83]. Следовательно, риск развития

формы НАСП у лиц с ожирением в Пермском крае ассоциирован с носительством генотипа АА гена *TNF- α* -308G/A и генотипа СС гена *VEGFA* -634G/C.

При оценке зависимости по таблице сопряженности в группе с НАСП-О была выявлена взаимосвязь полиморфизма региона -308G/A гена *TNF- α* с активацией выработки цитокинов ФНО- α и ИЛ-6 ($K_i=0,558$; $p=0,043$ и $K_i=0,597$; $p=0,042$ соответственно), а также ассоциация полиморфизма региона -634G/C гена *VEGFA* с продукцией ФВ ($K_i=0,642$; $p=0,045$), что может приводить к прогрессированию иммуновоспалительного синдрома и ДЭ в группе носителей.

Таким образом, прогрессирование НАСП у лиц с ожирением в Пермском крае ассоциировано с носительством полиморфизма генов, определяющих хроническое воспаление *TNF- α* (G308A) и ЭД *VEGFA* (G634C).

Оценка индивидуального генетического профиля показала, что в группе здоровых более половины (51%) имели низкий риск развития НАСП (0-1 балл по шкале), 38% - умеренный (2-3 балла), 11% - высокий (4 балла). В группе пациентов 25% имели низкий риск прогрессирования НАСП (0-1 балл), почти половина больных (44%) – умеренный (2-3 балла), а треть обследуемых (31%) – высокий риск (4-5 баллов) по шкале.

Разработанная нами система расчета риска развития НАСП при ожирении на основе анализа индивидуального генетического профиля с использованием генетических маркеров *TNF- α* в регионе -308G/A и *VEGFA* в регионе -634G/C позволяет провести раннюю неинвазивную диагностику риска развития СП у здоровых и определить риск возможного прогрессирования данного заболевания у пациентов: при выявлении 0-1 балла риск оценивается как низкий, 2-3 балла – умеренный и 4-5 баллов – высокий. Знание особенностей генотипа больных с НАСП необходимо для выбора индивидуализированного алгоритма лечения.

ВЫВОДЫ

1. Фруктозоиндуцированная модель стеатоза адекватно отражает механизмы развития НАЖБП и открывает дополнительные возможности для дальнейшего изучения патогенеза и разработки методов патогенетической терапии этого заболевания.
2. При НАСП-О и у пациентов с вторичным вирус-ассоциированным стеатозом печени общность патофизиологических механизмов заключается в активации провоспалительных цитокинов, повреждении эндотелия, изменениях в системе гемостаза, более выраженных при вторичном стеатозе на фоне вирусного поражения печени. Метаболические изменения и дислипидемия более значимы при стеатозе у лиц с ожирением.
3. Надежным и удобным критерием диагностики НАСП является применение формулы расчета ИС с использованием параметров: ИМТ, ГГТП, ВЭФР и ИЛ-6.
4. Носительство генотипов АА гена *TNF- α* в регионе -308G/A и СС гена *VEGFA* в регионе -634G/C является фактором риска развития НАСП-О.
5. На экспериментальной модели фруктозоиндуцированного стеатоза печени доказан гепатопротективный эффект экстракта листьев Джинуры Прокумбенс, который проявляется в замедлении процесса формирования характерных для стеатоза морфологических и биометрических изменений печени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование полиморфизма генов TNF- α (G-308A) и VEGFA (G-634C) следует использовать в качестве оценки риска развития НАСП-О в Пермском крае. Предикторами развития СП следует считать носительство AA-варианта гена TNF- α (G308A) и CC-варианта гена VEGFA (G634C).
2. Анализ индивидуального генетического профиля с использованием генетических маркеров TNF- α в регионе -308G/A и VEGFA в регионе -634G/C позволяет провести раннюю неинвазивную диагностику риска развития НАСП у здоровых и определить риск возможного прогрессирования данного заболевания у пациентов: при выявлении 0-1 балла риск оценивается как низкий, 2-3 балла – умеренный и 4-5 баллов – высокий.
3. Для диагностики НАСП оптимально использовать расчет ИМТ, определение в сыворотке крови уровня ГГТП, концентрации ВЭФР и ИЛ-6, и рассчитывать ИС с чувствительностью 95,2% и специфичностью 97%. При ИС, равном 0,5 и более, диагностируют наличие НАСП, при ИС менее 0,5 – отсутствие.
4. Экстракт листьев Джинуры Прокумбенс рекомендуется для дальнейшего углубленного доклинического исследования в качестве растительного гепатопротектора при НАСП.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Актуальность изучаемой темы будет сохраняться на протяжении еще ряда лет, так как на сегодняшний день регистрируется пандемия НАЖБП. При этом малоизученным остаются механизмы развития СП у худых, у подростков, у женщин в менопаузе, имеются противоречивые литературные данные об особенностях течения и прогрессировании стеатоза в разных возрастных группах, влияние этнических, расовых и популяционных особенностей на течение НАЖБП и вопросы ее профилактики.

И в связи с этими обстоятельствами математическая формула расчета ИС, генетическая панель оценки регионального риска развития СП, а также возможность применения экстракта Джинуры Прокумбенс в качестве растительного гепатопротектора, доказанные в эксперименте и представленные в диссертации, могут быть основой для расширения объема выборки пациентов и лабораторных животных, выделения наиболее важных и перспективных лабораторно-инструментальных методов диагностики, направленных на расширение представлений о НАЖБП, включая ее фенотипическую неоднородность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – аденозиндифосфат
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АФП – альфа-фетопротеин
АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время
ВЭФР – васкулоэндотелиальный фактор роста
ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза
ДП – Джинура Прокумбенс
ДЭ – дисфункция эндотелия
ИА – индекс атерогенности
ИЛ-6 – интерлейкин-6
ИМТ – индекс массы тела
ИР – инсулинорезистентность
ИС – индекс стеатоза
ИФ – индекс фиброза
ИФА – иммуноферментный анализ
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
МС – метаболический синдром
НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени
НАСГ – неалкогольный стеатогепатит
НАСП – неалкогольный стеатоз печени
НАСП-БО – неалкогольный стеатоз печени без ожирения
НАСП-О – неалкогольный стеатоз печени с ожирением
ОНП – однонуклеотидный полиморфизм генов
ПВ – протромбиновое время

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СП – стеатоз печени

ТВ – тромбиновое время

ТГ – триглицериды

ТР – тромбоциты

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФВ – фактор Виллебранда

ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа

ФП – фиброз печени

ХГС – хронический гепатит С

ХЗФ – хагеман-зависимый фибринолиз

ХС – общий холестерин

ЦП – цирроз печени

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭД – эндотелиальная дисфункция

APRI – Aspartate-aminotransferase-to-Platelet Ratio Index

HSI – Hepatic steatosis index

НОМА-IR – Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease

NASH – non-alcoholicsteatohepatitis

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абациева, М. П. Оценка метаболома сыворотки крови – перспективный метод диагностики неалкогольной жировой болезни печени у мужчин / М. П. Абациева, И. Г. Бакулин, С. И. Ситкин, Т. Я. Вахитов, Е. В. Демьянова // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2018. – Т. 10. – №4. – С. 5-14.
2. Абдурахманов, Д. Т. Стеатоз печени при хроническом гепатите С: механизмы развития и роль в прогрессировании поражений печени / Д. Т. Абдурахманов // Клиническая гепатология. – 2005. – №1. – С. 25-28.
3. Алдашева, Ж. А. Оценка диагностической ценности определения некоторых цитокинов в сыворотке крови больных со стеатозами печени / Ж. А. Алдашева, Б. А. Салханов, Т. И. Давлятшин, Ж. Г. Аюпова // Вестник АГИУВ. – 2010. – №2. – С. 26-28.
4. Аметов, А. С. Инсулинорезистентность и липотоксичность – две грани одной проблемы при сахарном диабете типа 2 и ожирении / А. С. Аметов, Е. А. Тертычная // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2019. – № 2 (27). – С. 25-33.
5. Афифи, Ф. Статистический анализ: подход с использованием ЭВМ: пер. с англ.: монография / Ф. Афифи, С. Эйзен. – М. : Мир, 1982. – 488 с.
6. Бабак, О. Я. Влияние генетического полиморфизма на формирование неалкогольной жировой болезни печени / О. Я. Бабак, Е. В. Колесникова, И. В. Шуть, Е. Г. Куринная, К. А. Сытник // Гастроэнтерология. – 2013. – №1 (47). – С. 54-59.
7. Баженова Н. М. Агрегационная способность тромбоцитов у пациентов с гипертонической болезнью в сочетании с неалкогольной жировой болезнью печени на фоне ожирения / Н. М. Баженова // Гастроэнтерология. – 2018. – Т. 52. – №4. – С. 216-221; DOI: 10.22141/2308-2097.52.4.2018.154141.

8. Байматов, В. Н. Влияние высокожирового рациона питания на морфофункциональное состояние печени крыс / В. Н. Байматов, Н. С. Тропская, Е. А. Кислякова и др. // Биомедицина. – 2018. – №4. – С. 44-50.
9. Батырова, А. С. Современные представления о системе гемостаза при хронических заболеваниях печени (обзор литературы) / А. С. Батырова, М. И. Баканов, А. Н. Сурков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – №8. – С. 40-44.
10. Брус, Т. В. Моделирование неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести у лабораторных крыс и возможности ее коррекции : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.03 / Брус Татьяна Викторовна. – СПб., 2018. – 21 с.
11. Брус, Т. В. Современное представление о неалкогольной жировой болезни печени / Т. В. Брус, А. Г. Васильев // Российские биомедицинские исследования. – 2020. – Т. 5. – №1. – С. 18-25.
12. Буеверов, А. О. Неалкогольная жировая болезнь печени без ожирения: проблема, ожидающая решения / А. О. Буеверов, П. О. Богомолов // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 12. – №2. – С. 226-232.
13. Буеверов, А. О. «Цитокиновый взрыв» и прогрессирование неалкогольного стеатогепатита / А. О. Буеверов, П. О. Богомолов // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2012. – №5. – С. 12-18.
14. Булатова, И. А. Лабораторные маркеры поражения печени при хроническом гепатите С. Современные технологии в медицине / И. А. Булатова, А. П. Щёктова, Н. И. Насибуллина, С. В. Падучева, В. В. Щёкотов. – 2017 – Т. 9. – №3. – С. 87-92; <https://readera.ru/14317125>.
15. Булатова, И. А. Фиброз при хронических заболеваниях печени: механизмы развития, клинико-лабораторная оценка прогрессирования и мониторинг терапии : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.01.04 / Булатова Ирина Анатольевна. – П., 2016. – 49 с.

16. Булатова, И. А. Цитокины у больных циррозом печени вирусного и невирусного генеза / И. А. Булатова // Новости «Вектор-бест». – 2015. – №1. – С. 2-5.
17. Булыгин, В. Г. Структурно-метаболические параметры ткани печени и показатели системы гемостаза у детей при хроническом гепатите В / В. Г. Булыгин, В. А. Дударев, Г. В. Булыгин // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – №5. – С. 38-43.
18. Быкова, Г. А. Особенности функции внешнего дыхания и состояния эндотелия у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени / Г. А. Быкова, О. В. Хлынова, А. В. Туев // Здоровье семьи – 21 век. – 2018. – №1 (1). – С. 16-24.
19. Валитова, Ю. Н. β -ситостерин – природный антиоксидант / Ю. Н. Валитова, А. Г. Ренкова, Ф. В. Минибаева // Экобиотех. – 2020. – Т. 3. – №2. – С. 150-156.
20. Винницкая, Е. В. Новая парадигма неалкогольной жировой болезни печени: фенотипическое многообразие метаболически ассоциированной жировой болезни печени / Е. В. Винницкая, Ю. Г. Сандлер, Д. С. Бордин // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Т. 16. – №24. – С. 54-63.
21. Вульф, М. А. Факторы, способствующие развитию неалкогольной жировой болезни печени и инсулинорезистентности при ожирении / М. А. Вульф, Е. В. Кириенкова, Д. А. Скуратовская, Е. В. Левада, Л. В. Волкова, П. А. Затолокин, Н. Д. Газатова, Л. С. Литвинова // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64. – №5. – С. 444–450.
22. Гейвандова, Н. И. Роль эндотелиальной дисфункции в формировании неалкогольного стеатогепатита / Н. И. Гейвандова, З. В. Нигиян, Г. Г. Бабашева // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2015. – Т. 10. – №2. – С. 183-187.
23. Гейвандова, Н. И. Сывороточные цитокины у больных неалкогольной жировой болезнью печени и их взаимосвязь с выраженностью морфологических изменений / Н. И. Гейвандова, Н. Г. Белова, Г. А. Александрович // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2011. – №1. – С. 9-12.

24. Гоголева, С. П. Коррекция липотоксичности ингибиторами натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа / С. П. Гоголева // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2020. – Т. 9. – №3. – С. 67-69.
25. Гриднев, А. Е. Оксид азота при изолированной гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и при ее сочетании с гипертонической болезнью / А. Е. Гриднев // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т. 15. – № 3-2 (51). – С. 104-110.
26. Гуляева, И. Л. Изучение эффективности применения отвара листьев растения Джинура Прокумбенс у пациентов с сахарным диабетом 2 типа с недостаточным контролем гликемии на фоне терапии сахароснижающими препаратами [Электронный ресурс] / И. Л. Гуляева // Наука, техника и образование. – 2014. – №5 (5). – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-effektivnosti-primeneniya-otvara-listiev-rasteniya-dzhinura-prokumbens-u-patsientov-s-saharnym-diabetom-2-tipa-s/viewer>
27. Дедов, И. И. Национальные клинические рекомендации по лечению морбидного ожирения у взрослых. 3-й пересмотр (Лечение морбидного ожирения у взрослых) / И. И. Дедов, Г. А. Мельниченко, М. В. Шестакова и др. // Ожирение и метаболизм. – 2018. – Т. 15. – №1. – С. 53-70.
28. Драпкина, О. М. Континуум неалкогольной жировой болезни печени: от стеатоза печени до сердечно-сосудистого риска / О. М. Драпкина, О. Н. Корнеева // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2016. – №4. – С. 424-429.
29. Драпкина, О. М. Эпидемиологические особенности неалкогольной жировой болезни печени в России (результаты открытого многоцентрового проспективного исследования-наблюдения DIREGL 01903) / О. М. Драпкина, В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – Т. 24. – № 4. – С. 32-38.
30. Дьяконова, А. Т. Полиморфизм rs58542926 гена TM6SF2 при хронических неинфекционных болезнях печени в якутской популяции / А. Т. Дьяконова, Х.

- А. Куртанов, Н. И. Павлова и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 6.
31. Жирков, И. И. Неинвазивные методы диагностики стеатоза при неалкогольной жировой болезни печени / И. И. Жирков, А. В. Гордиенко, И. М. Павлович, В. Ю. Голофеевский, О. В. Маковеева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 174. – №5. – С. 61-66.
32. Жмуров, Д. В. Цирроз печени / Д. В. Жмуров, М. А. Парфентева, Ю. В. Семенова, Д. А. Рубцов // Colloquium-journal. – 2020. – №11 (63). – С. 40-46.
33. Звенигородская, Л. А. Клиническое значение ключевых компонентов адипо-сердечно-сосудистой оси у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и неалкогольной жировой болезнью печени / Л. А. Звенигородская, А. М. Мкртумян, М. В. Шинкин и др. // Эффективная фармакотерапия. – 2021. – Т. 17. – №20. – С. 26-36; DOI 10.33978/2307-3586-2021-17-20-26-36.
34. Звенигородская, Л. А. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет: мишени метаболического тандема / Л. А. Звенигородская, М. В. Шинкин // Consilium medicum. – 2015. – №6. – С. 31-41.
35. Ивашкин, В. Т. Диагностика и лечение неалкогольной жировой болезни печени: методические рекомендации для врачей / Под редакцией академика РАН, профессора В. Т. Ивашкина. – Москва, 2015. – 38 с.
36. Ивашкин, В. Т. Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации / В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская, Ч. С. Павлов и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – №2. – С. 24-42.
37. Кащенко, В. А. Ожирение и неалкогольная жировая болезнь печени: возможности терапевтического лечения / В. А. Кащенко, А. И. Мицинская, А. Ю. Соколов, А. Н. Шишкин, С. А. Варзин, А. Е. Неймарк и др. // Сибирское медицинское обозрение. – 2020. – №3. – С. 20-29; DOI: 10.20333/2500136-2020-3-20-29.

38. Корнюшин, О. В. Морфологические изменения печени у крыс с моделью стеатоза печени и декомпенсированного диабета 2 типа после выполнения различных типов бариатрических операций / О. В. Корнюшин, Я. Г. Торопова, О. М. Берко и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – №8. – С. 72-76.
39. Кролевец, Т. С. Исследование полиморфизма гена PNPLA3 у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и различной стадией фиброза / Т. С. Кролевец, М. А. Ливзан, В. А. Ахмедов, Д. Г. Новиков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – Т. 159. – №11. – С. 24-32.
40. Кролевец, Т. С. Клинико-лабораторные маркеры прогнозирования фиброза печени у лиц с неалкогольной жировой болезнью печени / Т. С. Кролевец, М. А. Ливзан // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – №7 (155). – С. 43-51.
41. Кролевец, Т. С. Роль микробиоты и интестинального мукозального барьера в формировании и прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени / Т. С. Кролевец, М. А. Ливзан, С. И. Мозговой // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2020. – Т. 30. – №5. – С. 42-48.
42. Ксенева, С. И. Дискоординация вегетативного обеспечения функций в патогенезе метаболического синдрома : дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.03 Патологическая физиология / Ксенева Светлана Игоревна. – Томск., 2020.
43. Кузнецова, А. С. Особенности ремоделирования сердца у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени в зависимости от наличия и тяжести мезентериального атеросклероза / А. С. Кузнецова, А. И. Долгушина, В. В. Владимирский, А. Р. Молчанова // Сердечная недостаточность: материалы конгресса Общества специалистов по сердечной недостаточности. – Пермь, 2018. – С. 40.
44. Куртанов, Х. А. Полиморфизм гена адипонутрина (PNPLA3) у коренных жителей Республики Саха (Якутия), страдающих сахарным диабетом 2 -го типа

- / Х. А. Куртанов, Л. А. Сыдыкова, Н. И. Павлова и др. // Альманах клинической медицины. – 2018. – Т. 46. – №3. – С. 258-263.
45. Лазебник, Л. Б. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия / Л. Б. Лазебник, У. В. Голованова, С. В. Туркина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2021. – Т. 1. – №1. – С. 4-52.
46. Лазебник, Л. Б. Системное воспаление и неалкогольная жировая болезнь печени / Л. Б. Лазебник, В. Г. Радченко, С. Н. Джадхав, С. И. Ситкин, П. В. Селиверстов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – Т. 165. – №5. – С. 29–41; DOI: 10.31146/1682-8658-esg-165-5-29-41.
47. Макарова, М. Н. Опыт моделирования неалкогольного стеатогепатита с применением метионинхолин-дефицитной диеты на мышах линии C57BL/6 / М. Н. Макарова, Я. И. Гушин, Н. М. Фаустова и др. // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – №2. – С. 49-59.
48. Мишина, Е. Е. Неалкогольная жировая болезнь печени: причина или следствие инсулинорезистентности? / Е. Е. Мишина, А. Ю. Майоров, П. О. Богомолов и др. // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20. – №5. – С. 335-343.
49. Морозова, Т. С. Цитокиновый профиль при хронических диффузных заболеваниях печени (обзор литературы) / Т. С. Морозова, И. Ф. Гришина, О. П. Ковтун // Уральский медицинский журнал. – 2018 – №13 (168) – С. 119-134.
50. Мохорт, Т. В. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет: аспекты патогенеза, диагностики и лечения / Т. В. Мохорт // Медицинские новости. – 2012. – № 4. – С. 4-10.
51. Неалкогольная жировая болезнь печени с позиций современной медицины / И. В. Маев, Д. Н. Андреев, Ю. А. Кучерявый, Д. Т. Дичева, Е. И. Кузнецова. – М. : Прима Принт, 2020. – 68 с.
52. Никитин, И. Г. Поражение печени при COVID-19: два клинических наблюдения / И. Г. Никитин, Л. Ю. Ильченко, И. Г. Федоров, Г. Г. Тотолян // Альманах клинической медицины. – 2020. – Т. 48. – №6. – С. 412-421; <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2020-48-053>.

53. Нилова, Т. В. Диагностическое значение оксида азота и эндотоксина при неалкогольной жировой болезни печени / Т. В. Нилова, Л. А. Звенигородская, Е. А. Черкашова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – №7. – С. 38-42.
54. Носов, А. Е. Значимость клинико-лабораторных индексов в диагностике неалкогольной жировой болезни печени / А. Е. Носов, М. Т. Зенина, О. Ю. Горбушина и др. // Терапевтический архив. – 2021. – Т. 93. – №8. – С. 883-889.
55. Оковитый, С. В. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных / С. В. Оковитый, Е. Б. Шустов, М. А. Белых и др. // Биомедицина. – 2018. – №4. – С. 29-43.
56. Отт, А. В. Значение лептинорезистентности в развитии различных метаболических фенотипов ожирения / А. В. Отт, Г. А. Чумакова, Н. Г. Веселовская // Российский кардиологический журнал. – 2016. – №4. – С. 4-18.
57. Павлов, Ч. С. Эластометрия или биопсия печени: как сделать правильный выбор? / Ч. С. Павлов // Российские медицинские вести. – 2008. – Т. 12. – №1. – С. 31-37.
58. Падучева, С. В. Клинико-диагностическое значение воспалительных и молекулярно-генетических показателей при циррозе печени : дис. ... канд. мед. наук : 14.01.04 / Падучева Светлана Вячеславовна. – 2019.
59. Пальгова, Л. К. Эпидемиологические особенности неалкогольной жировой болезни печени в Северо-Западном регионе России (результаты открытого многоцентрового проспективного исследования DIREG 2) / Л. К. Пальгова, А. Ю. Барановский, Т. И. Ушакова, А. С. Юркина, Д. В. Блинов // Вестник СПбГУ. Медицина. – 2017. – Т. 12. – №2. – С. 118-35; DOI: 10.21638/11701/spbu11.2017.201.
60. Патлусов, Е. П. Клиническая и прогностическая оценка инвазивной и неинвазивных методик диагностики фиброза печени у больных хроническим гепатитом С : дис. ... канд. мед. наук. : 14.01.09, Инфекционные болезни / Патлусов Евгений Павлович. – М., 2018.

61. Пашенцева, А. В. Инсулинорезистентность в терапевтической клинике / А. В. Пашенцева, А. Ф. Вербовой, Л. А. Шаронова // Ожирение и метаболизм. – 2017. – Т. 14. – №2. – С. 9-17; <https://doi.org/10.14341/omet201729-17>.
62. Пестернин, Л. Д., Джинура прокумбенс: обзор биологических эффектов и их возможных механизмов / Л. Д. Пестернин, Б. В. Курцев, И. Л. Гуляева, И. А. Булатова, А. М. Мифтахова // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №3. – С. 146.
63. Пивторак, Е. В. Нарушения функции эндотелия у больных неалкогольной жировой болезнью печени / Е.В. Пивторак // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – №2 (102). – С. 63.
64. Полунина, Т. Е. Неалкогольная жировая болезнь печени: эпидемиология, патогенез, диагностика, лечение / Т. Е. Полунина, И. В. Маев // Consilium medicum. Гастроэнтерология. – 2012. – №1. – С. 35-40.
65. Райхельсон, К. Л. Влияние полиморфизма гена PNPLA3 на течение неалкогольной жировой болезни печени / К. Л. Райхельсон, В. П. Ковязина, Д. В. Сидоренко и др. // Русский медицинский журнал. – 2019. – №12. – С. 85-88.
66. Решетняк, В. И. Заболевания печени и гемостаз. Часть I. Нехолестатические заболевания печени и гемостаз (обзор) / В. И. Решетняк, И. В. Маев, Т. М. Решетняк, С. В. Журавель, В. М. Писарев // Общая реаниматология. – 2019. – Т. 15. – №5. – С. 74-87; DOI: 10.15360/1813-9779-2019-5-74-87.
67. Романцова, Т. И. Иммунометаболизм и метавоспаление при ожирении / Т. И. Романцова, Ю. П. Сыч // Ожирение и метаболизм. – 2019. – Т.16. – №4. – С. 3-17.
68. Сивкова, А. А. Патогенетическое значение цитокинов в формировании и прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени / А. А. Сивкова, Н. В. Ларева, Е. В. Лузина // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – №4. – С. 56-58.
69. Сидоренко, Д. В. Роль молекулярно-генетических факторов в патогенезе и диагностике неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы и собственные данные) / Д. В. Сидоренко, В. Д. Назаров, С. В. Лапин, В. Л.

- Эмануэль // Медицинский алфавит. – 2020. – №5. – С. 13-19.
<https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-5-13-19>.
70. Ситников, И. Г. Особенности нарушений липидного обмена и их коррекция препаратом фосфоглив при хроническом гепатите С / И. Г. Ситников, А. В. Рыжжина, М. С. Бохонов // Современные технологии в медицине. – 2009. – №1. – С. 54-56.
71. Стахеев, С. А. Современное состояние проблемы неалкогольной жировой болезни печени / С. А. Стахеев // Известия Российской военномедицинской академии. – 2018. – Т. 37. – №1. – С. 259-264.
72. Стаценко, М. Е. Неинвазивная диагностика неалкогольной жировой болезни печени: простые «инструменты уже в руках практического врача» / М. Е. Стаценко, С. В. Туркина, М. А. Косивцова, Н. Н. Шилина // В помощь практическому врачу. – 2019. – №2 (70). – С. 134-139.
73. Степанов, Ю. М. Неалкогольная жировая болезнь печени: особенности метаболических изменений на разных этапах развития болезни / Ю. М. Степанов, Н. В. Недзвецкая, В. Б. Ягмур, И. А. Кленина // Гастроэнтерология. – 2018. – Т. 52. – № 1. – С. 13-18.
74. Таратина, О. В. Полиморфизм генов дисфункции эндотелия и скорость прогрессирования фиброза печени при хроническом гепатите С / О. В. Таратина, Т. Н. Краснова, Л. М. Самоходская, Т. Н. Лопаткина, В. А. Ткачук, Н. А. Мухин // Терапевтический архив. – 2014. – Т. 86. – №4. – С. 45-51.
75. Ткаченко, Л. И. Клинико-патогенетическая роль нарушений углеводного и липидного обмена у больных хроническими вирусными гепатитами: прогнозирование и оптимизация терапии : автореф. дис. ... докт. мед. наук : 14.01.09 / Ткаченко Лариса Ивановна. – М., 2017. – 49 с.
76. Фишман, Б. Б. Динамика и взаимосвязи сывороточных концентраций интерлейкина-2, интерлейкина-6, фактора некроза опухоли альфа при циррозах печени вирусной этиологии / Б. Б. Фишман, В. В. Зурабов, В. Е. Куликов, М. Э. Хапман, М. А. Тонеева, С. Ш. Бутримова // Вич-инфекция и иммуносупрессии. – 2017. – Т. 9. – №2. – С. 42-46.

77. Хаммерих, Л. Интерлейкины при хроническом заболевании печени: уроки, извлеченные из экспериментальных моделей мышей / Л. Хаммерих, Ф. Тэк // Клиническая и экспериментальная гастроэнтерология. – 2014. – С. 297–306; <https://doi.org/10.2147/CEG.S43737>
78. Чистякова, М. В. Функциональное состояние эндотелия у пациентов с вирусным гепатитом и циррозом печени / М. В. Чистякова, А. В. Говорин, Е. В. Радаева // Казанский медицинский журнал. – 2014. – Т. 95. – №1. – С. 41-45; DOI: 10.17816/KMJ1453.
79. Чуланов, В. П. Промежуточные результаты международного многоцентрового проспективного наблюдательного исследования «MOSAIC» по оценке эпидемиологии, субъективных и экономических исходов лечения хронического гепатита С / В. П. Чуланов, В. А. Исаков, К. В. Жданов и др. // Инфекционные болезни. – 2018. – Т. 16. – №1. – С. 5-14.
80. Шелудько, В. С. Теоретические основы медицинской статистики (статистические методы обработки и анализа материалов научно-исследовательских работ) : учебно-методическое пособие, издание 3-е / В. С. Шелудько, Г. И. Девяткова. – Пермь: ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е. А. Вагнера Минздрава России; Саратов: Амирит, 2019. – 96 с.
81. Шептулина, А. Ф. Неинвазивная диагностика фиброза печени: роль сывороточных маркеров / А. Ф. Шептулина, Е. Н. Широкова, В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2015. – №2. – С. 28-40.
82. Щёктова, А. П. Маркеры поражения эндотелия и агрегация тромбоцитов при хроническом гепатите и циррозе печени / А. П. Щёктова // Клиницист. – 2012. – №1. – С. 31-36.
83. Щёктова, А. П. Роль васкулоэндотелиального фактора роста и его гена в патогенезе гепатобилиарной патологии / А. П. Щёктова, И. А. Булатова // Пермский медицинский журнал. – 2020 – Т. 37. – №4. – С. 36-45; DOI: <https://doi.org/10.17816/pmj37436-45>.

- 84.Щёктова, А. П. Способ диагностики стадии фиброза печени у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С. Патент №2592371 / А. П. Щёктова, И. А. Булатова, В. В. Щёкотов, В. С. Шелудько, Н. И. Насибуллина // Заявка №2015121005 от 20.07.2016. – Бюл. №20.
- 85.Щёктова, А. П. Сравнительная характеристика маркеров фиброза при алкогольной болезни печени и хроническом гепатите С / А. П. Щёктова, М. С. Невзорова, И. А. Булатова // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №1. – С. 83; DOI: 10.17513/spno.29564.
- 86.Щёкотов, В. В. Влияние противовирусной терапии хронического гепатита С на синтез цитокинов и процессы фиброзирования в печени / В. В. Щёкотов, И. А. Булатова, А. П. Щёктова, Н. И. Насибуллина, Г. Г. Ларионова, А. И. Павлов // Клиницист. – 2015. – Т. 9. – №2. – С. 28-35; <https://doi.org/10.17650/1818-8338-2015-9-2-28-35>.
- 87.Ягода, А. В. Функциональная активность тромбоцитов при хронических вирусных заболеваниях печени / А. В. Ягода, П. В. Корой, И. В. Касторная // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2004. – Т. 14. – №2. – С. 29-34.
- 88.Abid, A. Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome / A. Abid, O. Taha, W. Nseir et al. // J Hepatol. – 2009. – №51. – P. 918-924.
- 89.Ahmed, G. M. Seroprevalence of Hepatitis C Virus among type 2 diabetes mellitus patients in blue Nile state, Sudan / G. M. Ahmed, A. A. Adam // American Journal of Research Communication. – 2014. – V. 2. – №12. – P. 141-147.
- 90.Andres-Hernando, A. Deletion of Fructokinase in the Liver or in the Intestine Reveals Differential Effects on Sugar-Induced Metabolic Dysfunction / A. Andres-Hernando, D. J. Orlicky, M. Kuwabara // Cell Metab. – 2020. – №32. – P. 117-127.
- 91.Angulo, P. Fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and clinical implications / P. Angulo, M. V. Machado, A. M. Diehl // Seminars in Liver Disease. – 2015. – V. 35. – №2. – P. 132-145.

92. Arinze, J. T. Prevalence and incidence of, and risk factors for chronic cough in the adult population: The Rotterdam Study / J. T. Arinze, E. W. de Roos, L. Karimi, K. M. C. Verhamme, B. H. Stricker, G. G. Brusselle // *ERJ Open Res.* – 2020. – V. 6. – №2. – P. 00300-2019.
93. Assy, N. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors / N. Assy, G. Nasser, I. Kamayse et al. // *Can J Gastroenterol.* – 2008. – №22. – P. 811-816.
94. Barres, R. The role of diet and exercise in the transgenerational epigenetic landscape of T2DM / R. Barres, J. R. Zierath // *Nature Reviews Endocrinology.* – 2016. – V. 12. – №8. – P. 441-451.
95. Bassendine, M. F. Lipids and HCV / M. F. Bassendine, D. A. Sheridan, S. H. Bridge, D. J. Felmlee, R. D. Neely // *Semin. Immunopathol.* – 2013. – №35. – P. 87-100.
96. Bedogni, G. Incidence and natural course of fatty liver in the general population: The Dionysos study / G. Bedogni, L. Miglioli, F. Masutti et al. // *Hepatology* – 2007. – №46. – P. 1387-1391.
97. Bedossa, P. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis/ P. Bedossa, D. Dargere, V. Paradis // *C. Hepatology.* – 2003. – №38. – P. 1449-1457.
98. Benedict, M. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review / M. Benedict, X. Zhang // *World Journal of Hepatology.* – 2017. – V. 9. – №16. – P. 715-732.
99. Bilgir, O. Changes in the levels of endothelium-derived coagulation parameters in nonalcoholic fatty liver disease / O. Bilgir, F. Bilgir, G. Bozkaya, M. Calan // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* – 2014 – V. 25. – №2. – P. 151-155.
100. Bugianesi, E. Fibrosis in genotype 3 chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease: role of insulin resistance and hepatic steatosis / E. Bugianesi, G. Marchesini, E. Gentilcore et al. // *J Hepatology.* – 2006. – V. 44. – №6. – P. 648-655.
101. Bugianesi, E. Insulin resistance in nondiabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms / E. Bugianesi, A. Gastaldelli, E. Vanni et al. // *Diabetologia.* – 2005. – V. 48. – P. 634-642.

102. Butterworth, R. F. L-Ornithine L-Aspartate for the Treatment of Sarcopenia in Chronic Liver Disease: The Taming of a Vicious Cycle [Electronic resource] / R. F. Butterworth // Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology. – 2019. – Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/8182195>
103. Camilleri, M. Gastrointestinal Complications of Obesity / M. Camilleri, H. Malhi, A. Acosta // Gastroenterology. – 2017. – V. 152. – № 7. – P. 1656-1670.
104. Carino, A. Ursodeoxycholic acid is a GPBAR1 agonist and resets liver/intestinal FXR signaling in a model of diet-induced dysbiosis and NASH / A. Carino, M. Biagioli, S. Marchianò, C. Fiorucci et al. // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2019. – V. 1864. – №10. – P. 1422-1437.
105. Castera, L. FibroScan and FibroTest to assess liver fibrosis in HCV with normal aminotransferases / L. Castera, J. Foucher, J. Bertet, et al. // Hepatology – 2006. – №43. – P. 373-374.
106. Castera, L. Steatosis, insulin resistance and fibrosis progression in chronic hepatitis / L. Castera // Minerva Gastroenterol Dietol. – 2006. – №52. – P. 125-134.
107. Caussy, C. Nonalcoholic fatty liver disease with cirrhosis increases familial risk for advanced fibrosis / C. Caussy, M. Soni, J. Cui et al. // J. Clin. Invest. – 2017. – V. 127. – №7. – P. 2697-2704.
108. Celikbilek, M. Mean platelet volume in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease / M. Celikbilek, S. Gürsoy, K. Deniz et al. // Platelets. – 2013. – V. 24. – №3. – P. 194-199.
109. Cengiz, M, The role of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in non-alcoholic steatohepatitis / M. Cengiz, D. G. Yasar, M. A. Ergun, G. Akyol, S. Ozenirler // Hepat. Mon. – 2014. – V. 14. – №12. – P. e24635; DOI: 10.5812/hepatmon.24635.
110. Chen, H. Consumption of Sugar-Sweetened Beverages Has a Dose-Dependent Effect on the Risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: An Updated Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis / H. Chen, J. Wang, Z. Li et al. // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2019. – №16. – P. 2192.

111. Coulon, S. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease / S. Coulon, S. Francque, I. Colle et al. // *Cytokine*. – 2012. – №59. – P. 442-449.
112. De Chiara, F. Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease / F. De Chiara, S. Heeboll, G. Marrone et al. // *J. Hepatol.* – 2018. – V. 69. – №4. – P. 905-915.
113. DiNicolantonio, J. J. Added fructose as a principal driver of non-alcoholic fatty liver disease: A public health crisis / J. J. DiNicolantonio, A. M. Subramonian, J. H. O’Keefe // *Open Heart*. – 2017. – №4. – P. 631.
114. DiStefano, J. K. The relationship between excessive dietary fructose consumption and paediatric fatty liver disease / J. K. DiStefano, G. Q. Shaibi // *Pediatr Obes.* – 2020. – №16 (6).
115. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guideline for the management of non-alcoholic liver disease / European Association for the Study of the Liver (EASL) and European Association for the Study of Diabetes (EASD) and European Association for the Study of Obesity (EASO) // *Diabetologia*. – 2016. – V. 59. – P. 1121-1140.
116. Enjoji, M. Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease: the significance of cholesterol / M. Enjoji, K. Yasutake, M. Kohjima et al. // *Int J Hepatol.* – 2012. – №2012.
117. Eslam, M. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact / M. Eslam, L. Valenti, S. Romeo // *J Hepatol.* – 2018. – V. 68. – №2. – P. 268-279.
118. 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). EASLEASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease / *J. Hepatol.* – 2016. – V. 64. – №6. – P. 1388–1402.
119. Fang, K. C. Higher platelet counts are associated with metabolic syndrome independent of fatty liver diagnosis / K. C. Fang, Y. L. Cheng, C. W. Su et al // *Journal of the Chinese Medical Association*. – 2017. – V. 80. – №3. – P. 125-132.
120. Farrell, G. C. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis / G. C. Farrell, C. Z. Larter // *Hepatology*. – 2006. – V. 49. – № 2. – P. 99-112.

121. Fartoux, L. Impact of steatosis on progression of fibrosis in patients with mild hepatitis C / L. Fartoux, O. Chazouilleres, D. Wendum, R. Poupon, L. Serfaty // *Hepatology*. – 2005. – №41. – P. 82-87.
122. Felmlee, D. J. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins – impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease / D. J. Felmlee, M. L. Hafirassou, M. Lefevre, T. F. Baumert, C. Schuster // *Viruses*. – 2013. – № 5. – P. 1292-1324.
123. Feng, R. N. Lean-non-alcoholic fatty liver disease increases risk for metabolic disorders in a normal weight Chinese population / R. N. Feng, S. S. Du, C. Wang, Y. C. Li et al. // *World J Gastroenterol*. – 2014. – №20 (47). – P.17932-17940.
124. Gong, T. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases / T. Gong, L. Liu, W. Jiang et al. // *Nat Rev Immunol*. – 2020. – V. 20. – №2. – P. 95-112; DOI: 10.1038/s41577-019-0215-7.
125. Groeneveld, D. Intrahepatic fibrin (ogen) deposition drives liver regeneration after partial hepatectomy in mice and humans / D. Groeneveld, D. Pereyra, Z. Veldhuis, J. Adelmeijer, P. Ottens, A. K. Kopec et al. // *Blood*. – 2019. – V. 133. – №11. – P. 1245-1256.
126. Guo, W. Based on Plasma Metabonomics and Network Pharmacology Exploring the Therapeutic Mechanism of *Gynura procumbens* on Type 2 Diabetes [Electronic resource] / W. Guo, H. Ouyang, M. Liu, J. Wu, X. He, S. Yang, M. He, Y. Feng // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Available from: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.674379>.
127. Hammami, S. Relationship between inflammatory markers with the presence and severity of coronary artery disease / S. Hammami, S. Zribi, N. Koubaa, K. Benhamda, F. Matoug, M. Hammami // *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*. – 2018. – V. 10. – № 1. – P. 117.
128. Hardy, T. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease / T. Hardy, M. Zeybel, C. P. Day et al. // *Gut*. – 2017. – V. 66. – №7. – P. 1321-1328.
129. Hashizume, H. A prospective study of long-term outcomes in female patients with nonalcoholic steatohepatitis using age- and body mass index-matched cohorts /

- H. Hashizume, K. Sato, Y. Yamazaki et al. // *Acta Med Okayama*. – 2013. – V. 67. – P. 45-53.
130. Hassan, Z. Antidiabetic properties and mechanism of action of *Gynura procumbens* water extract in streptozotocin-induced diabetic rats / Z. Hassan, M. F. Yam, M. Ahmad et al // *Molecules*. – 2010. V. 15. – P. 9008-9023; DOI:10.3390/molecules15129008.
131. Henkel, J. Soybean Oil-Derived Poly-Unsaturated Fatty Acids Enhance Liver Damage in NAFLD Induced by Dietary Cholesterol / J. Henkel, E. Alfine, J. Sain et al. // *Nutrients*. – 2018. – №10. – P. 1326.
132. Herawan Timotius, K. Overview of Herbal Therapy with Leave of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr / K. Herawan Timotius, I. Rahayu // *Journal of Young Pharmacists*. – 2020. – V. 12. – №3. – P. 201-206; DOI: 10.5530/jyp.2020.12.61.
133. Hwang, S. J. Hepatic steatosis and hepatitis C: Still unhappy bedfellows? / S. J. Hwang, S. D. Lee // *J Gastroenterol Hepatol*. – 2011. – V. 26. – №1. – P. 96-101.
134. Intagliata, N. M. Changes in hemostasis in liver disease / N. M. Intagliata, S. H. Caldwell // *J. Hepatol*. – 2017. – V. 67. – №6. – P. 1332-1333; DOI: 10.1016/j.jhep.2017.07.001.PMID: 29156209.
135. James, M. E. Diet-Induced Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Food for Thought on Sugar, Fat, and Cholesterol / M. E. James, L. E. Jennifer // *Cells*. – 2021. – №10 (7). – P. 1805.
136. Jegatheesan, P. Fructose and NAFLD: the multifaceted aspects of fructose metabolism / P. Jegatheesan, J. P. De Bandt // *Nutrients*. – 2017. – №9 (3). – P. 230.
137. Jensen, T. Fructose and sugar: a major mediator of non-alcoholic fatty liver disease / T. Jensen, M. F. Abdelmalek, S. Sullivan et al. // *J Hepatol*. – 2018. – №68 (5). – P. 1063-1075.
138. Kassel, K. M. Protease-activated receptor 1 and hematopoietic cell tissue factor are required for hepatic steatosis in mice fed a Western diet / K. M. Kassel, A. P. Owens 3rd, C. E. Rockwell, B. P. Sullivan et al. // *The American Journal of Pathology*. 2011. – V. 179. – №5. – P. 2278-2289.

139. Kawaguchi, T. Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance: therapeutic strategies for insulin sensitization / T. Kawaguchi, M. Sata // *World J Gastroenterol.* – 2010. – №16. – P. 1943-1952.
140. Kim, D. Body fat distribution and risk of incident and regressed nonalcoholic fatty liver disease / D. Kim, G. E. Chung, M. S. Kwak et al. // *Clin Gastroenterol Hepatol.* – 2016. – №14. – P. 132-138.
141. Kim, D. Nonobese fatty liver disease / D. Kim, W. R. Kim // *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017. – №15 (4). – P. 474-485
142. Kim, T. H. Fast food diet-induced non-alcoholic fatty liver disease exerts early protective effect against acetaminophen intoxication in mice / T. H. Kim, D. Choi, J. Y. Kim et al. // *BMC Gastroenterol.* – 2017. – №17. – P. 124.
143. Ko, C. Y. Multiscale Determinants of Delayed Afterdepolarization Amplitude in Cardiac Tissue / C. Y. Ko, M. B. Liu, Z. Song, Z. Qu, J. N. Weiss // *Biophysical Journal.* – 2017. – №112 (9). – P. 1949-1961.
144. Kopec, A. K. Role of hemostatic factors in hepatic injury and disease: animal models de-liver / A. K. Kopec, N. Joshi, J. P. Luyendyk // *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* – 2016. – V. 14. – №7. – P. 1337-1349; DOI: 10.1111/jth.13327. PMID: 27060337; PMCID: PMC5091081.
145. Kovalic, A. J. Genetic and Epigenetic Culprits in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease / A. J. Kovalic, P. Banerjee, Q. T. Tran, A. K. Singal, S. K. Satapathy // *Journal of Clinical Experimental Hepatology.* – 2018. – V. 8. – №4. – P. 390-402; DOI: 10.1016/j.jceh.2018.04.001. PMID: 30564000; PMCID: PMC6286466.
146. Kwon, Y. M. Association of nonalcoholic fatty liver disease with components of metabolic syndrome according to body mass index in Korean adults / Y. M. Kwon, S. W. Oh, S. S. Hwang et al. // *Am J Gastroenterol.* – 2012. – №107. – P. 1852-1858.
147. Lallukka, S. Obesity/insulin resistance rather than liver fat increases coagulation factor activities and expression in humans / S. Lallukka, P. K. Luukkonen, Y. Zhou,

- E. Isokuortti et al. // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2017. – V. 117. – №2. – P. 286-294; DOI: 10.1160/TH16-09-0716. PMID: 27929200.
148. Lee, J. H. Hepatic steatosis index: a simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease / J. H. Lee, D. Kim, H. J. Kim et al. // *Digestive and Liver Disease*. – 2010. – V. 42. – P. 503-508.
149. Leoni, S. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review with comparative analysis / S. Leoni, F. Tovoli, L. Napoli, I. Serio, S. Ferri, L. Bolondi // *World J. Gastroenterol.* – 2018. – V. 24. – №30. – P. 3361-3373.
150. Lerat, H. Hepatitis C virus proteins induce lipogenesis and defective triglyceride secretion in transgenic mice / H. Lerat, H. L. Kammoun, E. Merour, M. R. Higgs, C. Callenc et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – №284. – P. 33466-33474.
151. Leung, J. C. Histological severity and clinical outcomes of nonalcoholic fatty liver disease in nonobese patients / J. C. Leung, T. C. Loong, J. L. Wei et al. // *Hepatology*. – 2016. – №65 (1). – P. 54-64.
152. Li, H. S. Salidroside and Curcumin Formula Prevents Liver Injury in Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rats / H. S. Li // *Ann Hepatol.* – 2018. – №17 (5). – P. 769-778.
153. Lisman, T. Fibrin fuels fatty liver disease / T. Lisman, C. N. Jenne // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2018. – V. 16. – №1. – P. 3-5; DOI: 10.1111/jth.13906. PMID: 29314630.
154. Liu, M. Strategy for rapid screening of antioxidant and anti-inflammatory active ingredients in *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and characteristic ion filtration / M. Liu, M. He, H. Gao, S. Guo, J. Jia, H. Ouyang, Y. Feng, S. Yang // *Biomedical Chromatography*. – 2019. – V. 33. – №11. – P. e4635; DOI: 10.1002/bmc.4635.
155. Li, Z. T. The Role of Gastroesophageal Reflux in Provoking High Blood Pressure Episodes in Patients with Hypertension / Z. T. Li, F. Ji, X. W. Han, L. Wang, Y. Q. Yue, Z. G. Wang // *Journal of Clinical Gastroenterology* – 2018. – № 52 (8). – P. 685-690.

156. Lonardo, A. 'Not all forms of NAFLD were created equal'. Do metabolic syndrome related NAFLD and PNPLA3-related NAFLD exert a variable impact on the risk of early carotid atherosclerosis? / A. Lonardo, S. Ballestri, G. Targher // *Atherosclerosis*. – 2017. – V. 257. – P. 253-255.
157. Loomba, R. Heritability of hepatic fibrosis and steatosis based on a prospective twin study / R. Loomba, N. Schork, C. H. Chen et al. // *Gastroenterology*. – 2015. – V. 149. – №7. – P. 1784-1793.
158. Lu, F. B. The relationship between obesity and the severity of non-alcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis / F. B. Lu, E. D. Hu, L. M. Xu et al. // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2018. – №12 (5). – P. 491-502.
159. Madan, S. A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mean Platelet Volume: A Systemic Review and Meta-analysis / S. A. Madan, F. John, C. S. Pitchumoni // *Journal of Clinical Gastroenterology*. – 2016. – V. 50. – №1. – P. 69-74; DOI: 10.1097/MCG.0000000000000340. PMID: 25984978.
160. Malehmir, M. Platelet GPIIb/IIIa is a mediator and potential interventional target for NASH and subsequent liver cancer. / M. Malehmir, D. Pfister, S. Gallage, M. Szydłowska, D. Inverso et al. // *Nat Med*. – 2019. – V. 25. – №4. – P. 641-655; DOI: 10.1038/s41591-019-0379-5. PMID: 30936549.
161. Margariti, A. The severity of histologic liver lesions is independent of body mass index in patients with nonalcoholic fatty liver disease / A. Margariti, M. Deutsch, S. Manolakopoulos et al. // *J Clin Gastroenterol*. – 2013. – №47. – P. 280-286.
162. Massard, J. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C / J. Massard // *J. Hepatol*. – 2006. – V. 44. – №1. – P. 19-24.
163. Mastrocola, R. Fructose liquid and solid formulations differently affect gut integrity, microbiota composition and related liver toxicity: A comparative in vivo study / R. Mastrocola, I. Ferrocino, E. Liberto et al. // *J. Nutr. Biochem*. – 2018. – №55. – P. 185-199.
164. Meer, A. J. Improvement of platelets after SVR among patients with chronic HCV infection and advanced hepatic fibrosis / A. J. Meer, R. Maan, B. J. Veldt, J. J.

- Feld et al. // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2015. – V. 31. – №6. – P. 1168-1176.
165. Mock, K. High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation / K. Mock, S. Lateef, V. A. Benedito, J. C. Tou // *J. Nutr. Biochem.* – 2017. – №39. – P. 32-39.
166. Muzzi, A. Insulin resistance is associated with liver fibrosis in non-diabetic chronic hepatitis C patients / A. Muzzi, G. Leonardo, L. Rubbia-Brandt // *J. Hepatol.* – 2005. – №42. – P. 41-46.
167. Nakagawa, H. Impact of serum levels of interleukin-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients/ H. Nakagawa, N. Fujiwara, R. Tateishi, T. Arano, R. Nakagomi // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2015. – V. 30. – №2. – P. 379.
168. Negro, F. Hepatitis C virus-induced steatosis: an overview / F. Negro // *Dig Dis.* – 2010. – V. 28. – №1. – P. 294-299.
169. Northup, P. G. Hypercoagulation and thrombophilia in nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms, human evidence, therapeutic implications, and preventive implications / P. G. Northup, C. K. Argo, N. Shah, S. H. Caldwell // *Seminars in Liver Disease*. – 2012. – V. 32. – №1. – P. 39-48.
170. Ozhan, H. Mean platelet volume in patients with non-alcoholic fatty liver disease / H. Ozhan, M. Aydin, M. Yazici et al. // *Platelets*. – 2010. – V. 21. – №1. – P. 29-32.
171. Panchal, S. K. Caffeine attenuates metabolic syndrome in diet-induced obese rats / S. K. Panchal, W. Y. Wong, K. Kauter, L. C. Ward, L. Brown // *Nutrition*. – 2012. – №28. – P. 1055-1062.
172. Park, E. J. (S)YS-51, a novel isoquinoline alkaloid, attenuates obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease in mice by suppressing lipogenesis, inflammation and coagulation / E. J. Park, Y. M. Kim, H. J. Kim, S. Y. Jang, M. H. Oh, D. H. Lee, K. C. Chang // *European Journal of Pharmacology*. – 2016. – №788 – P. 200-209; DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.06.040. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27343380.

173. Pastori, D. Relation of nonalcoholic fatty liver disease and Framingham Risk Score to flow-mediated dilation in patients with cardiometabolic risk factors / D. Pastori, L. Loffredo, L. Perri, F. Baratta, L. Scardella, L. Polimeni, A. Pani, M. Brancorsini, F. Albanese, E. Catasca et al. // *The American Journal of Cardiology*. – 2015. – №115 (10). – P. 1402-1406.
174. Patel, J. H. Hepatitis C and hepatic steatosis / J. H. Patel, J. F. Cobbold, H. C. Thomas, S. D. Taylor-Robinson // *QJM*. – 2010. – V. 103. – №5. – P. 293-303.
175. Pelusi, S. Prevalence and risk factors of significant fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver without steatohepatitis / S. Pelusi, A. Cespiati, R. Rametta et al. // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2019. – V. 17. – №11. – P. 2310-2319.
176. Pergola, G. De. sP-selectin plasma levels in obesity: association with insulin resistance and related metabolic and prothrombotic factors / G. De Pergola, N. Pannacciulli, M. Coviello et al. // *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. – 2008. – V. 18. – №3. – P. 227-232.
177. Persico, M. Nonalcoholic fatty liverdisease and eNOS dysfunction in humans / M. Persico, M. Masarone, A. Damato, M. Ambrosio, A. Federico, V. Rosato, T. Bucci, A. Carrizzo, C. Vecchione // *BMC Gastroenterol.* – 2017. – V. 17. – №1. – P. 35.
178. Persico, M. Steatosis as a co-factor in chronic liver diseases / M. Persico, A. Iolascon // *World J Gastroenterol.* – 2010. – V. 16. – №10. – P. 1171-1176.
179. Potze, W. Preserved hemostatic status in patients with non-alcoholic fatty liver disease / W. Potze, M. S. Siddiqui, S. L. Boyett et al. // *J. Hepatol.* – 2016. – V. 65. – №5. – P. 980-987.
180. Poynard, T. Performance of biomarkers FibroTest, ActiTest, SteatoTest, and NashTest in patients with severe obesity: meta-analysis of individual patient data / T. Poynard, G. Lassailly, E. Diaz, K. Clement, R. Caiazzo, J. Tordjman, M. Munteanu et al. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – №3. – P. e30325.
181. Ramadori, P. Platelets in chronic liver disease, from bench to bedside / P. Ramadori, T. Klag, N. P. Malek, M. Heikenwalder // *JHEP Rep.* – 2019. – №1 (6). –

- P. 448-459; DOI: 10.1016/j.jhepr.2019.10.001. PMID: 32039397; PMCID: PMC7005648.
182. Aydos, L. R. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by High-Fat Diet in C57bl/6 Models / L. R. Aydos, L. A. do Amaral, R. S. de Souza et al. // *Nutrients*. – 2019. – №11. – P. 3067.
183. Ribeiro, A. Childhood fructoholism and fructoholic liver disease / A. Ribeiro, M. J. Igual-Perez, E. Santos Silva, E. M. Sokal // *Hepatol Commun*. – 2019. – №3. – P. 44-51.
184. Rosinger, A. Sugar-sweetened Beverage Consumption Among U.S. Adults, 2011-2014 / A. Rosinger, K. Herrick, J. Gahche, S. Park // *NCHS Data Brief*. – 2017. – №270. – P. 1-8.
185. Rotonya, M. C. Non-alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management / M. C. Rotonya, O. Amanke, K. Vandana // *MScGastroenterol Clin North Am*. 2016. – №45 (4). – P. 639-652.
186. Sakr, H. F. Swimming, but not vitamin E, ameliorates prothrombotic state and hypofibrinolysis in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease / H. F. Sakr, A. M. Abbas, M. A. Haidara // *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. – 2018. – V. 29. – №1. – P. 61-71; DOI: 10.1515/jbcpp-2017-0069. PMID: 29161233.
187. Santilli, F. Decreased plasma endogenous soluble RAGE, and enhanced adipokine secretion, oxidative stress and platelet/coagulative activation identify non-alcoholic fatty liver disease among patients with familial combined hyperlipidemia and/or metabolic syndrome / F. Santilli, P. Blardi, C. Scapellato, M. Bocchia et al. // *Vascular Pharmacology*. – 2015. – №72. – P. 16-24.
188. Sayyar, M. Platelet count increases after viral elimination in chronic HCV, independent of the presence or absence of cirrhosis / M. Sayyar, M. Saidi, S. Zapatka, Y. Deng, M. Ciarleglio, G. Garcia-Tsao // *Liver Int*. – 2019. – V. 39. – №11. – P. 2061-2065.

189. Schlottmann, F. Obesity and esophageal cancer: GERD, Barrett's esophagus, and molecular carcinogenic pathways / F. Schlottmann, N. H. Dreifuss, M. G. Patti // *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. – 2020. – №6. – P. 425-433.
190. Scorletti, E. Treating liver fat and serum triglyceride levels in NAFLD, effects of PNPLA3 and TM6SF2 genotypes: results from the WELCOME trial / E. Scorletti, A. L. West, L. Bhatia et al. // *J. Hepatology*. – 2015. – V. 63. – №6. – P. 476-1483.
191. Seko, Y. The genetic backgrounds in nonalcoholic fatty liver disease / Y. Seko, K. Yamaguchi, Y. Itoh // *Journal of Clinical Gastroenterology*. – 2018. – V. 11. – №2. – P. 97-102; DOI: 10.1007/s12328-018-0841-9. PMID: 29492830.
192. Shin, W. Y. The association between nonalcoholic hepatic steatosis and mean platelet volume in an obese Korean population / W. Y. Shin, D. H. Jung, J. Y. Shim, H. R. Lee // *Platelets*. – 2011. – V. 22. – №6. – P. 442-446.
193. Shi, Y. The Prevalence of Lean/Nonobese Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis / Y. Shi, Q. Wang, Y. Sun, et al. // *J Clin Gastroenterol*. – 2019. – №54 (4). – P. 378-387.
194. Sinn, D. H. Ultrasonographically detected non-alcoholic fatty liver disease is an independent predictor for identifying patients with insulin resistance in nonobese, nondiabetic middle-aged Asian adults / D. H. Sinn, G. Y. Gwak, H. N. Park et al. // *Am J Gastroenterol*. – 2012. – №107. – P. 561-567.
195. Softic, S. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling / S. Softic, M. K. Gupta, G. X. Wang et al. // *J. Clin. Investig.* – 2017. – №127. – P. 4059-4074.
196. Sookoian, S. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to therapeutics / S. Sookoian, C. I. Pirola // *Seminars in Liver Disease*. – 2019. – V. 39. – №2. – P. 124-140.
197. Souto, K. P. Nonalcoholic fatty liver disease in patients with different baseline glucose status undergoing bariatric surgery: analysis of intraoperative liver biopsies and literature review / K. P. Souto, N. G. Meinhardt, M. J. Ramos, J. M. Ulbrich-Kulkzynski, A. T. Stein, D. C. Damin // *Surgery for Obesity and Related Diseases*. – 2018. – V. 14. – №1. – P. 66-73; DOI: 10.1016/j.soard.2017.09.527.

198. Sutthammikorn, N. Topical *Gynura procumbens* as a Novel Therapeutic Improves Wound Healing in Diabetic Mice / N. Sutthammikorn, V. Supajatura, H. Yue et al. // *Plants (Basel)*. – 2021. – №10 (6). – P. 1122.
199. Targher, G. Diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease and its hemostatic/thrombotic and vascular complications / G. Targher, C. D. Byrne // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2013. – V. 39. – №2. – P. 214-228.
200. Taura, N. Association between liver fibrosis and insulin sensitivity in chronic HCV / N. Taura // *Am. J. Gastroenterol.* – 2006. – V. 101. – №12. – P. 2752-2759.
201. Tavit, Y. Mean platelet volume in patients with metabolic syndrome and its relationship with coronary artery disease / Y. Tavit, N. Sen, H. U. Yazici et al. // *Thrombosis Research*. – 2007. – V. 120. – №2. – P. 245-250.
202. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome [Electronic resource] / International Diabetes Federation, 2006. – Available from: <https://www.idf.org/e-library/consensusstatements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome>.
203. Toop, C. R. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis / C. R. Toop, S. Gentili // *Nutrients*. – 2016. – №8. – P. 577.
204. Treeprasertsuk, S. NAFLD fibrosis score: A prognostic predictor for mortality and liver complications among NAFLD patients / S. Treeprasertsuk, E. Björnsson, F. Enders et al. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – V. 19. – №8. – P. 1219-1229.
205. Tripodi, A. Nonalcoholic fatty liver disease and thrombocytopenia III: Its association with insulin resistance. Hemostasis in acute and chronic liver disease / A. Tripodi // *Seminars in Liver Disease*. – 2017. – V. 37. – №1. – P. 28-32; DOI: 10.1055/s-0036-1597770. PMID: 28201846.
206. Uehara, D. Long-term Results of Bariatric Surgery for Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Non-alcoholic Steatohepatitis Treatment in Morbidly Obese Japanese Patients / D. Uehara, Y. Seki, S. Kakizaki, N. Horiguchi, H. Tojima, Y. Yamazaki,

- K. Sato, M. Yamada, T. Uraoka, K. Kasama // *Obesity Surgery*. 2019. – V. 15. – P. 99-123; DOI: 10.1007/s11695-018-03641-2.
207. Verrijken, A. Prothrombotic factors in histologically proven nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis / A. Verrijken, S. Francque, I. Mertens et al. // *Hepatology*. – 2014. – V. 59. – №1. – P. 121-129.
208. Vilaseca, M. The anticoagulant rivaroxaban lowers portal hypertension in cirrhotic rats mainly by deactivating hepatic stellate cells / M. Vilaseca, H. García-Calderó, E. Lafoz, O. García-Irigoyen, M. A. Avila, J. C. Reverter, J. Bosch, V. Hernández-Gea, J. Gracia-Sancho, J. C. García-Pagán // *Hepatology*. – 2017. – №65. – P. 2031-2044.
209. Wai, C-T. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C / C-T. Wai, J. K. Greenson, R. J. Fontana, J. D. Kalbfleisch, J. A. Marrero, H. S. Conjeevaram, A. S. Lok // *Hepatology*. – 2003. – V. 38. – №2. – P. 518-526.
210. Wang, X. Hepatocyte TAZ/ WWTR1 promotes inflammation and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis / X. Wang, Z. Zheng, J. M. Caviglia et al. // *Cell Metabolism*. – 2016. – V. 24. – №6. – P. 848-862.
211. Wei, J. L. Prevalence and severity of nonalcoholic fatty liver disease in non-obese patients: a population study using proton-magnetic resonance spectroscopy / J. L. Wei, J. C. Leung, T. C. Loong et al. // *Am J Gastroenterol*. – 2015. – №110. – P. 1306-1314.
212. Wijarnpreecha, K. A. Small intestinal bacterial over - growth and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis / K. A. Wijarnpreecha // *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. – 2020. – V. 32. – №5. – P. 601-608.
213. Wouters, K. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis / K. Wouters, P. J. van Gorp, V. Bieghs et al. // *Hepatology*. – 2008. – №48. – P. 474-486.

214. Xi, Y. Role of farnesoid X receptor in hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease / Y. Xi, H. Li // *Biomed Pharmacother.* – 2020. – V. 121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109609>
215. Yamaguchi, K. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis / K. Yamaguchi, L. Yang, S. McCall et al. // *Hepatology* – 2007. – №45. – P. 1366-1374.
216. Younossi, Z. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention / Z. Younossi, Q. M. Anstee, M. Marietti et al. // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 11-20.
217. Younossi, Z. Global perspectives on non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis / Z. Younossi, F. Tacke, M. Arrese, B. C. Sharma, I. Mostafa, E. Bugianesi et al. // *Hepatology.* – 2018. – V. 69. – №6. – P. 2672-2682.
218. Younossi, Z. M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease – meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes / Z. M. Younossi, A. B. Koenig, D. Abdelatif et al. // *Hepatology.* – 2016. – №64 (1). – P. 73-84.
219. Younossi, Z. M. Obeticholic acid for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: interim analysis from a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial / Z. M. Younossi, V. Ratziu, R. Loomba, M. Rinella, Q. M. Anstee et al. // *Lancet.* – 2019. – №394 (10215). – P. 2184-2196.
220. Zhang, Y. Transcriptomic coordination at hepatic steatosis indicates robust immune cell engagement prior to inflammation / Y. Zhang, I. Chatzistamou, H. Kiaris // *BMC Genomics.* – 2021. – №22 (1). – P. 454.
221. Zhou, J. Sumoylation inhibitors synergize with FXR agonists in combating liver fibrosis / J. Zhou, S. Cui, Q. He, Y. Guo, X. Pan, P. Zhang et al. // *Nature Communications.* – 2020. – №11 (1). – P. 240.
222. Zhou, Y. J. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease of Chinese people / Y. J. Zhou, Y. Y. Li, Y. Q. Nie, H. Yang, Q. Zhan, J. Huang, S. L. Shi, X. B. Lai, H. L. Huang // *Journal of*

Gastroenterology and Hepatology. – 2010. – V. 25. – №4. – P. 772–777; DOI:
10.1111/j.1440-1746.2009.06144x.