

*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

Автореферат  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Екатеринбург 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, доцент  
доктор медицинских наук, доцент

**Гуляева Инна Леонидовна**  
**Булатова Ирина Анатольевна**

**Официальные оппоненты:**

**Власова Татьяна Ивановна** – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии и патологической физиологии с курсом гигиены, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

**Маклакова Ирина Юрьевна** – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук.

Защита состоится «24» мая 2022 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.074.03 при ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке имени В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17 и на сайте университета: [www.usma.ru](http://www.usma.ru), а также на сайте ВАК Минобрнауки России: [vak.minobrnauki.gov.ru](http://vak.minobrnauki.gov.ru).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 21.2.074.03  
доктор медицинских наук, профессор

**Базарный**  
**Владимир Викторович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Неалкогольная жировая болезнь печени (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, причем 70,4 % случаев приходится на долю стеатоза, 24,6 % – стеатогепатита и 5 % на долю цирроза печени (Л.Б. Лазебник и соавт., 2021; В.Т. Ивашкин и соавт., 2016; И.В. Маев и соавт., 2020; Z.M. Younossi et al., 2018). Частота НАЖБП у пациентов с ожирением составляет от 70 до 100 %. Однако наличие НАЖБП возможно также у лиц с нормальным весом. Данные о распространенности НАЖБП у людей без ожирения в разных странах достаточно вариабельны и составляют от 3 до 30 % (А.О. Буеверов и соавт., 2017; R.N. Fenget al.; 2014; D. Kim et al., 2017; Y.M. Kwon et al., 2012; D.H. Sinn et al., 2012; Y. Shi et al., 2019).

Активно обсуждается проблема сочетания вирусных и метаболических повреждений печени. Установлено, что распространенность вторичного вирус-ассоциированного стеатоза печени (СП) колеблется от 30 до 80 % при вирусных поражениях печени и выявляется в 30–70 % биоптатов печени при хроническом гепатите С (L. Castera et al., 2006; M. Persico et al., 2010; И.А. Булатова, 2016; Л.И. Ткаченко, 2016; Д.Т. Абдураманов, 2005).

В настоящее время этиопатогенез НАЖБП при ожирении рассматривают как сложные взаимодействия множественных генетических, средовых (питание, физическая активность), адаптационных факторов и гормональных особенностей (Л.Б. Лазебник и соавт., 2021; И.В. Маев, 2020; M.C. Rotonyu, 2016). В качестве факторов риска развития НАЖБП без ожирения рассматриваются экзогенные (избыточное потребление холестерина и быстроусваиваемой фруктозы) и генетически детерминированные (А.О. Буеверов и соавт., 2017). Определение региональных особенностей генетических мутаций при оценке риска развития НАЖБП имеет значение для отечественной популяции в целом (Х.А. Куртанов, 2018; Т.С. Кролевец, 2018; К. Райхельсон, 2019; А.Т. Дьяконова, 2019.). Однако в литературе встречаются противоречивые факты. По данным И.В. Курбатовой и соавт. (2016), носительство аллеля С по -174G> С полимор-

физма гена IL-6 ассоциируется с развитием неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) в российской популяции (И.В. Курбатова, 2016). В зарубежном исследовании корреляции данного полиморфизма с развитием патологии печени выявлено не было (M. Cengiz, 2014).

В изучении этиологии и патогенеза НАЖБП ключевая роль принадлежит адекватным экспериментальным моделям (Т.В. Брус, 2018; С.В. Оковитый, 2018; С.Р. Тоор, 2016). Выявление закономерностей патогенеза СП у лабораторных животных при моделировании НАЖБП может быть использовано для доклинической оценки механизмов саногенетического действия лекарственных средств.

На сегодняшний день диагностика НАЖБП представляет значительные трудности, поскольку требует в первую очередь исключения других заболеваний печени. 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. Некоторые из 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.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. Уточнить патофизиологические механизмы на модели фруктозоиндуцированного СП у лабораторных животных.
2. Обосновать гепатопротекторный эффект экстракта листьев Джинуры Прокумбенс на модели фруктозоиндуцированного стеатоза у лабораторных животных.
3. Оценить выраженность метаболических нарушений, дисфункции эндотелия (ДЭ), концентрации провоспалительных цитокинов и состояния системы гемостаза при СП разного генеза.

4. Оценить ассоциации лабораторных и инструментальных показателей и установить лабораторные маркеры, имеющие диагностическое значение для верификации неалкогольного стеатоза печени (НАСП).

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

### **Методология и методы исследования**

Работа является экспериментально-клиническим исследованием, выполненным с использованием научной методологии, с применением формально-логических, общенаучных и специфических методов. Экспериментальная часть проведена с участием подопытных животных (белые неинбредные половозрелые крысы-самцы, содержащиеся в идентичных условиях вивария) путем моделирования фруктозоиндуцированного стеатоза печени с использованием в качестве питьевой воды 15%-ного раствора фруктозы на протяжении всего эксперимента. Клиническая часть осуществлена с участием пациентов со стеатозом печени на фоне ожирения, вирусного поражения печени и группы контроля. Для достижения цели и решения задач исследования использовались методы: спектрофотометрии, иммуноферментный и иммунохемилюминесцентный анализ, колориметрия, генетические, гистологические, микроскопические, инструментальные; результаты исследования подвергнуты адекватными методами статистического анализа. Все эксперименты проведены с учетом требований международных и российских законодательных актов о юридических и этических принципах исследований с использованием подопытных животных, одобрены этическим локальным комитетом ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (от 31.08.2021 г.).

### **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 индекса стеатоза (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- $\alpha$  -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 (васкулоэндотелиальный фактор роста) и IL-6 (интерлейкин 6).

Предложен метод диагностики НАСП с расчетом ИС.

Показано, что анализ индивидуального генетического профиля по генам TNF- $\alpha$  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 IL-6.

Риск развития и прогрессирования НАСП у лиц с ожирением ассоциирован с носительством генотипа AA гена TNF- $\alpha$  -308G/A и генотипа CC гена VEGFA -634G/C.

### **Степень достоверности, апробация результатов исследования, личное участие автора**

Степень достоверности полученных результатов и обоснованность выводов базируются на адекватности эксперименталь-

ной модели, достаточном объеме выборки пациентов в клинической части, значительном объеме исследований, использовании сертифицированного оборудования и реактивов, современных методов исследования; актами внедрения результатов работы и проверке первичной документации; адекватной статистической обработке результатов. 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 И.Л. Гуляевой и д.м.н., доцентом И.А. Булатовой. 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.

Основные результаты диссертации изложены 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), на совместном заседании научной проблемной комиссии по молекулярной биологии, фармакологии, нормальной физиологии и патофизиологии ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, 11 сентября 2021 г.

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Основные результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедрах патологической физиологии



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

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

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе четыре – 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»; четыре работы опубликованы в материалах конференции. Получен один патент на изобретение «Способ диагностики неалкогольного стеатоза печени» (Решение о выдаче патента от 05.08.2021 г. по заявке №2021106422/14(013887)).

### **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 наименования работ, из которых – 87 отечественных и 135 иностранных источников. Текст диссертации иллюстрирован 26 рисунками и содержит 25 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Экспериментальная часть исследования проводилась на 50 неинбредных половозрелых белых крысах-самцах 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 г. Президиума и Парламента Европы «О защите животных, используемых для научных исследований» и приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ПГМУ до начала эксперимента. Схема дизайна экспериментально-клинического исследования представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Дизайн экспериментально-клинического исследования

Были сформированы три 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 (Т.В. Брус, 2018; E. Roeb et al., 2021; S. Shojaei Zarghani et al., 2016). Учитывая тот факт, что доказана роль фруктозы как фактора риска НАЖБП у лиц без ожирения, причем этот фактор риска не зависит от массы тела (D. Kim, 2016; A. Ribeiro, 2019; J.K. DiStefano, 2020; N. Assy, 2008; A. Abid, 2009), экспериментальная модель фруктозоиндуцированного стеатоза печени может считаться моделью НАСП-БО.

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 (Z. Hassan et al., 2010).

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. По окончании опыта и вывода животных из эксперимента определяли массу печени и массовый коэффициент (МК), который рассчитывали по формуле:  $МК = \text{масса печени (г)} / \text{масса тела (г)} \cdot 100 \%$ . 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 цитокинов. У крыс второй подгруппы производили забор крови для изучения системы гемостаза. У всех животных забирали печень для морфометрических и гистологических исследований.

Для гистологического исследования забирали центральную часть левой боковой доли печени. Гистологическое исследование

проводили с окраской срезов тканей гематоксилином и эозином, 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 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). Диагноз стеатоза печени верифицировался при наличии в биоптате более 5 % печеночных клеток, содержащих депозиты липидов (M. Carr Rotonya, 2016).

В клинической части исследования общее количество обследованных составило 141 человек. Было сформировано три группы: 1-я группа – 52 пациента с неалкогольным стеатозом печени и ожирением (НАСП-О), 2-я группа – пациенты со вторичным стеатозом печени на фоне гепатита С (вторичный СП), 3-я группа – контрольная (65 практически здоровых лиц). Все обследуемые подписали информированное согласие на участие в исследовании. Характеристика групп дана в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика исследуемых групп

Характеристика	НАСП-О (n = 52)	Вторичный СП (n = 24)	Контроль (n = 65)
Возраст, лет	43,0 ± 11,1	37,6 ± 4,3	42,3 ± 7,0
min – max, лет	25–67	25–65	25–52
Мужчины, абс. (%)	17 (33)	11 (46)	30 (46)
Женщины, абс. (%)	35 (67)	13 (54)	35 (54)
Индекс массы тела	37,2 ± 2,6	25,5 ± 2,5	20,7 ± 1,0

Общеклиническое обследование включало сбор анамнеза, жалоб, оценку сопутствующей патологии, наличия профессиональной вредности, употребления алкоголя, лекарственных препаратов. Стеатоз печени 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 (В.Т. Ивашкин, 2016). Наличие и степень фиброза печени (ФП) определяли методом ультразвуковой эластографии на аппарате Fibroscan 502 (Echosens, Франция). Наличие в крови РНК вируса гепатита С, уровень вирусной нагрузки и генотип выявляли методом полимеразной цепной реакции, серологические маркеры – методом иммуноферментного анализа.

Лабораторное обследование в экспериментальной и клинической части работы включало в себя: определение биохимических показателей в сыворотке крови, липидного спектра на автоматическом анализаторе Mindray (Китай) с использованием реагентов этой же фирмы (в эксперименте), у пациентов на автоматическом биохимическом анализаторе Architect-4000 (США). Концентрацию интерлейкина 6 (IL-6) определяли методом иммуноферментного анализа на фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с использованием набора High Sensitive ELISA Kit for Interleukin 6 (IL-6) фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай) у животных и набора фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) у пациентов. Количественное определение функциональной активности фактора Виллебранда (ФВ) и оценку агрегационной активности тромбоцитов в плазме крови проводили на агрегометре модели 230LA НПФ «БИОЛА» (г. Москва). 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 «АПП-4-02» («ЭМКО», Россия, г. Москва) наборами фирмы «Технология-стандарт» (Россия, г. Барнаул).

В клинической части работы пациентам дополнительно определяли метаболические показатели (инсулин, лептин, С-пептид, индекс НОМА-IR); сывороточные концентрации фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) и васкулоэндотелиального фактора роста (ВЭФР) методом иммуноферментного анализа на аппарате Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) с использованием наборов фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск); уровень альфа-фетопротеина (АФП) оценивали с помощью набора «AFP» (Siemens, Германия) иммунохемилюминесцентным анализом на

анализаторе Immulit-1000 (Германия). Генетическое исследование с определением однонуклеотидных полиморфизмов генов (ОНП) фактора некроза опухоли альфа *TNF-α* (G-308A), интерлейкина-6 (IL-6) (G-174C) и васкулоэндотелиального фактора роста *VEGFA* (G-634C) проводилось у 52 пациентов с НАСП-О и 65 здоровых доноров в г. Перми с использованием аллель-специфической ПЦР «SNP-Скрин» в режиме реального времени. Рассчитывали индексы стеатоза и фиброза: Hepatic steatosis index (HSI) по формуле:  $HSI = 8 \cdot (АЛТ/АСТ) + ИМТ (+2, \text{ если женщина; } +2, \text{ если диабет})$  (J.H. Lee et al., 2010), индекс фиброза (ИФ) по формуле:  $ИФ = 3,79 - 0,0056 \cdot TP + 0,0855 \cdot ФНО-\alpha - 0,0352 \cdot \text{альбумин}$  (А.П. Щёктова и соавт., 2016) и индекс APRI (Aspartate-aminotransferase-to-Platelet Ratio Index) по формуле:  $APRI = (АСТ / (\text{верхний предел АСТ})) \cdot 100 / \text{тромбоциты}$  ( $10^9/\text{л}$ ) (C.T. Wai et al., 2003).

Результаты исследования обработаны с использованием пакета прикладных электронных таблиц (ППЭТ) Stat2015, MedCalc® 15.8 Portable (© MedCalc Software, 1993-2014), авторского (© В.С. Шелудько, 2001–2016), анализа табличного процессора Excel® 2016 MSO (© Microsoft, 2016) (В.С. Шелудько и соавт., 2019) и представлены при нормальном распределении признака в виде средней арифметической ( $M$ ) и  $\sigma$  – среднего квадратического отклонения ( $\sigma$ ) – ( $M \pm \sigma$ ), при асимметричном распределении признака – медианы ( $Me$ ) и межквартильного размаха ( $Q1-Q3$ ). Статистические различия между группами оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента при нормальном распределении и  $U$ -критерию Манна-Уитни для независимых выборок. Коэффициенты корреляции вычисляли ранговым методом по Спирмену. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Определение зависимости между качественными признаками проводилось на основе таблиц сопряжённости по критерию Хи-квадрат. Зависимость считалась статистически достоверной при  $p < 0,05$ . Для оценки корреляции между количественным и качественным признаками количественные признаки преобразовывались в качественные. При наличии достоверной выраженной зависимости признаков строилось уравнение множественной регрессии. Для расчета пороговых значений и диагностической эффективности показателей, имеющих предикторную ценность, проводился ROC-анализ и расчет отношения шансов ( $OR$ ).

## Результаты исследования и их обсуждение

**Экспериментальная часть.** Результаты гистологического исследования показали, что у животных в группе «Стеатоз» при окраске гематоксилином и эозином (г/э) определяются гепатоциты с признаками мелкокапельной и крупнокапельной жировой дистрофии в виде обильного накопления оптически пустых вакуолей различного размера в цитоплазме клеток, набухание цитоплазмы, эксцентричное расположение ядер клеток. Указанные изменения более выражены в гепатоцитах на периферии печеночных долек, менее выражены в центролобулярной зоне долек (50–80 %, степень стеатоза – II–III) (рисунок 2). Описанная структурная реорганизация печени подтверждает развитие стеатоза у животных и адекватность использованного способа моделирования данного заболевания. В печеночной ткани лабораторных животных группы «Стеатоз+ДП» 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 доля таких гепатоцитов с признаками стеатоза существенно меньше – 20–40 %, степень стеатоза – I–II (рисунок 3).

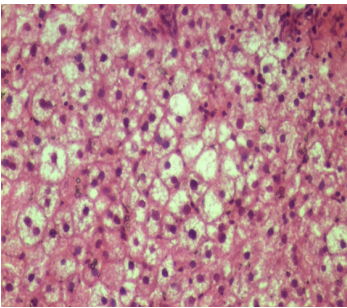


Рисунок 2 – Изменения в ткани печени группы «Стеатоз», гистологические срезы (увеличение  $\times 400$ , окраска г/э)

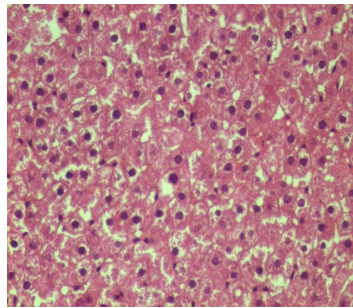


Рисунок 3 – Изменения в ткани печени группы «Стеатоз+ДП», гистологические срезы (увеличение  $\times 400$ , окраска г/э)

В печеночной ткани обеих групп животных воспалительно-клеточной инфильтрации в портальных трактах и в толще печеноч-

ных долек не выявлялось, фиброз (очаговый портальный и мостовидный) не прослеживался, признаки белковой дистрофии (по типу гидропической и гиалиново-капельной) в гепатоцитах отсутствовали.

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 (рисунок 4). При этом в цитоплазме гепатоцитов были обнаружены округлые вакуоли различных размеров оранжево-желтого цвета, соответствующие нейтральным липидам (до 50–80 % объема паренхимы органа, степень стеатоза – II–III). В контрольных образцах определялись гепатоциты с эухромными центрально расположенными ядрами и эозинофильной цитоплазмой. В единичных гепатоцитах (менее 5 %) выявлялись интрацитоплазматические оптически пустые вакуоли, более соответствующие нейтральным липидам (степень стеатоза – 0) (рисунок 5).

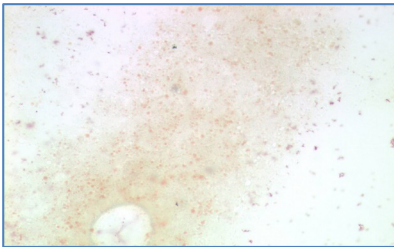


Рисунок 4 – Изменения в ткани печени группы «Стеатоз», гистологические срезы (увеличение  $\times 400$ , окраска суданом III)

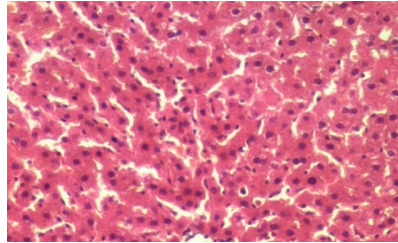


Рисунок 5 – Ткань печени животных контрольной группы, гистологические срезы (увеличение  $\times 400$ , окраска гематоксилином и эозином)

Данные статистического анализа при сравнении количества гепатоцитов при стеатозе у экспериментальных животных отражены в таблице 2.

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.

При сравнении массы тела до начала эксперимента и по его окончании в каждой группе животных достоверных различий не



обнаружено, что подтверждает форму НАСП-БО в нашей экспериментальной модели. Однако массовый коэффициент печени был достоверно 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) %.

Таблица 2 – Количество гепатоцитов при стеатозе у экспериментальных животных (%)

Группа	Доля 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; <sup>1</sup> – различия статистически значимы в группах «Контроль» и «Стеатоз»; <sup>2</sup> – различия статистически значимы в группах «Контроль» и «Стеатоз+ДП»; <sup>3</sup> – различия статистически значимы в группах «Стеатоз» и «Стеатоз+ДП».

По данным лабораторного исследования биохимические показатели (трансаминазы, маркеры холестаза, общий белок, альбумин и глюкоза) в группе животных «Стеатоз» не имели значимых различий от группы «Контроль». 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 оказало существенного влияния на метаболизм липидов. Можно отметить лишь тенденцию к снижению содержания триглицеридов и ЛПОНП в плазме крови животных, получавших ДП, по сравнению с группой «Стеатоз» ( $p_{2-3} = 0,064$  и  $p_{2-3} = 0,057$  соответственно) (таблица 3).

При проведении сравнительного анализа содержания ИЛ-6 в сыворотке крови животных разных групп установлено, что при моделировании стеатоза печени концентрация этого цитокина статистически значимо увеличивается по сравнению с контроль-

ными данными ( $p = 0,006$ ), однако уровень этого цитокина оказался ниже уровня чувствительности, указанного в наборе. При этом введение ДП не оказало влияния на содержание ИЛ-6.

Таблица 3 – Биохимические показатели крови животных в исследуемых группах,  $Me (Q1-Q3)$

Показатель	Группа 1 (К), $n = 9$	Группа 2 (С), $n = 9$	Группа 3, $n = 7$ (С+ДП)	$p$
Общий холестерин (ммоль/л)	2,0 (1,6–2,1)	1,63 (1,42–2,08)	1,4 (1,0–1,7)	$p_{1-2} = 0,185$ $p_{1-3} = \mathbf{0,004}$ $p_{2-3} = 0,185$
Триглицериды (ммоль/л)	1,5 (1,2–2,3)	3,20 (1,86–5,00)	1,9 (0,7–2,6)	$p_{1-2} = \mathbf{0,012}$ $p_{1-3} = 0,711$ $p_{2-3} = 0,064$
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)	$p_{1-2} = \mathbf{0,001}$ $p_{1-3} = \mathbf{0,002}$ $p_{2-3} = 0,672$
ЛПОНП (ммоль/л)	0,7 (0,6–1,0)	1,45 (0,84–2,27)	0,9 (0,3–1,2)	$p_{1-2} = \mathbf{0,008}$ $p_{1-3} = 0,459$ $p_{2-3} = 0,057$

*Примечание:*  $p$  – значимость различий; здесь и в таблице 4 К – контрольная группа; С – группа «Стеатоз», С+ДП – группа «Стеатоз+Д», цифры 1–3 соответствуют порядковому номеру группы.

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 контрольными данными: удлинение ПВ ( $p_{1-2} = 0,034$ ), свидетельствующее о снижении активности внешнего механизма свертывания крови, а именно активности факторов протромбинового комплекса (факторов II, VII, X, V), синтезирующихся в печени (таблица 4).

В группе животных, принимавших экстракт листьев ДП, наблюдаются аналогичные изменения, при этом статистически значимых различий ПВ у животных 2-й и 3-й групп не обнаружено. Применение экстракта ДП вызвало положительную динамику

теста АЧТВ: статистически значимое уменьшение АЧТВ по сравнению с группой «Стеатоз» ( $p_{2-3} = 0,0001$ ), наряду с отсутствием достоверных различий с контролем ( $p_{1-3} = 0,072$ ), на наш взгляд, можно расценивать как положительное влияние ДП на функциональную активность гепатоцитов. Статистически значимых различий показателей первичного звена гемостаза у животных разных групп не обнаружено. Корреляционный анализ лабораторных параметров в группе животных «Стеатоз» показал значимые взаимосвязи функциональных печеночных тестов с метаболическими показателями, корреляции параметров гемостаза с маркерами цитолиза, холестаза и липидного обмена.

Таблица 4 – Показатели системы гемостаза у животных, *Me* (Q1–Q3)

Показатель	Группа 1 (К) <i>n</i> = 9	Группа 2 (С) <i>n</i> = 9	Группа 3 <i>n</i> = 7 (С+ДП)	<i>p</i>
АЧТВ, с	35,3 (32,4–37,1)	38,30 (37,92–39,50)	33,2 (31,3–33,9)	$p_{1-2} = 0,181$ $p_{1-3} = 0,072$ $p_{2-3} = \mathbf{0,0001}$
ПВ, с	19,8 (19,1–20,4)	20,90 (20,20–22,10)	21,9 (21,7–22,9)	$p_{1-2} = \mathbf{0,034}$ $p_{1-3} = \mathbf{0,001}$ $p_{2-3} = 0,239$
ТВ, с	72,8 (67,9–80,1)	76,10 (67,90–83,12)	70,2 (67,1–71,5)	$p_{1-2} = 0,364$ $p_{1-3} = 0,077$ $p_{2-3} = 0,100$

*Примечание:* *p* – значимость различий.

Таким образом, на модели фруктозоиндуцированного стеатоза, являющегося 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 внутривенное введение экстракта листьев ДП экспериментальным животным с стеатозом оказывает гепатопротекторный эффект, препятствуя формированию гепатомегалии и характерных для стеатоза морфологических изменений в ткани печени, что позволило уточнить особенности патогенеза фруктозоиндуцированного стеатоза печени (НАСП-БО) и обосновать в эксперименте саногенетический гепатопротекторный эффект ДП (рисунок 6).



Рисунок 6 – Особенности патогенеза НАСП-БО по результатам экспериментального исследования и точки приложения ДП (X)

**Исследование пациентов с неалкогольным стеатозом печени на фоне ожирения и вторичным стеатозом с вирусным поражением печени.** Картина клинической симптоматики в обеих группах была схожа. Жалобы предъявляли от 10 до 30 % пациентов. Стоит отметить, что астенический и болевой синдромы чаще регистрировались у пациентов с вторичным СП. Гепатомегалия наблюдалась у 20 % лиц в группе с НАСП-0 и больных с вирус-ассоциированным стеатозом. По данным инструментальных методов у пациентов обеих групп имелись признаки стеатоза печени, у лиц с вторичным СП регистрировался фиброз 1–2-й стадии. Гипертоническая болезнь отмечалась у 56 % больных НАСП-О, сахарный диабет 2-го типа – у 19 %. Ожирение I степени имели 42 % пациентов с НАСП, II степени – 35 %, III степени – 23 %. Распределение по генотипам вируса в группе с вторичным СП было следующим: 12 лиц (50 %) с генотипом HCV-3, 8 (33 %) имели генотип HCV-1 и 4 (16 %) – HCV-2.

Биохимические маркеры цитолиза и холестаза у пациентов обеих групп находились в пределах референсных значений наборов. У всех лиц с НАСП-О имелись признаки ожирения разной степени, ИМТ равнялся в среднем  $37,2 \pm 2,6$  ( $p = 0,001$ ). В группе с вторичным стеатозом на фоне вирусного поражения печени

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 % были повышены значения ИМТ в диапазоне от  $24,9$  до  $29,0 \text{ кг/м}^2$ .

Липидный спектр у пациентов обеих исследуемых групп достоверно отличался от контрольных данных, регистрировались: гипертриглицеридемия, снижение ЛПВП, повышение ЛПОНП. Более выраженная дислипидемия наблюдалась у лиц с НАСП-О в сочетании с гиперинсулинемией, повышением индекса НОМА-IR, уровня лептина и С-пептида (таблица 5).

Таблица 5 – Метаболические показатели в исследуемых группах,  $Me (Q1-Q3)$

Показатель	Контроль ( $n = 20$ )	НАСП-О ( $n = 52$ )	Вторичный СП ( $n = 24$ )
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) <sup>1,3</sup>	4,6 (4,3–5,4)
ТГ, ммоль/л	0,9 (0,8–1,3)	1,4 (0,8–2,0) <sup>1,3</sup>	1,2 (1,0–1,6) <sup>2</sup>
ЛПВП, ммоль/л	1,6 (1,5–1,8)	1,3 (1,1–1,6) <sup>1</sup>	1,3 (1,1–1,6) <sup>2</sup>
ЛПНП, ммоль/л	2,8 (2,3–3,2)	3,3 (2,8–3,8) <sup>1,3</sup>	2,8 (2,4–3,1)
ЛПОНП, ммоль/л	0,4 (0,3–0,6)	0,9 (0,7–1,0) <sup>1,3</sup>	0,6 (0,5–0,7) <sup>2</sup>
ИА	1,8 (1,5–1,9)	2,9 (2,5–3,4) <sup>1,3</sup>	2,6 (2,1–3,6) <sup>2</sup>
Инсулин, мкМЕ/мл	7,7 (6,2–7,8)	13,3 (9,3–18) <sup>1,3</sup>	6,3 (5,1–8,4)
НОМА-IR	1,6 (1,5–1,7)	3,1 (2,4–4,3) <sup>1,3</sup>	1,93 (1,2–3) <sup>2</sup>
С-пептид, нг/мл	1,1 (0,8–1,9)	2,8 (2,0–3,6) <sup>1</sup>	3,1 (2,3–4,3) <sup>2</sup>
Лептин, нг/мл	1,8 (1,2–2,8)	8,8 (6,3–14,1) <sup>1,3</sup>	2,8 (1,5–6,1) <sup>1</sup>

*Примечание:*  $p$  – значимость различий; 1 – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; 2 – различия статистически значимы в группах контрольной и вторичного СП; 3 – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП.

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 пока-

зывает наличие СП в обеих исследуемых группах пациентов, более выраженный у пациентов с НАСП на фоне ожирения.

Индекс фиброза в группе контроля варьировался 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 % обследованных 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 фиброз и цирроз печени.

Таблица 6 – Показатели гемостаза в исследуемых группах, *Me (Q1–Q3)*

Показатель	Контроль (n = 20)	НАСП-О (n = 52)	Вторичный СП (n = 24)
Агрегация с коллагеном, %	64,0 (58,8–69,3)	43,5 (23,5–54,0) <sup>1</sup>	42,0 (30,0–62,0) <sup>1</sup>
Агрегация с ристоцетином, %	69,2 (60,8–75,3)	74,5 (64,3–81,0) <sup>1</sup>	92,1(69,5–96,7) <sup>2,3</sup>
Агрегация с АДФ, %	59,4 (47,3–64,0)	51,0 (37,8–60,8) <sup>1</sup>	42,0 (36,0–54,0) <sup>2</sup>
ФВ, %	78,1 (55,4–83,8)	94,0 (75,8–105,8) <sup>1</sup>	93,5(72,1–103,5) <sup>2</sup>
АЧТВ, с	28,0 (28,0–29,0)	30,6 (29,7–31,3) <sup>1</sup>	32,6 (30,6–36,0) <sup>2</sup>
ТВ, с	12,0 (12,0–12,8)	27,0 (26,3–27,8) <sup>1,3</sup>	19,0 (17,8–19,9) <sup>2</sup>

*Примечание:* *p* – значимость различий; 1 – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; 2 – различия статистически значимы в группах контрольной и вторичного СП; 3 – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП.

Количество тромбоцитов в обеих группах значимо не отличалось от контрольных данных. У пациентов с НАСП-О и вирус-ассоциированным СП 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 тромбоцитов 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 контрольной группе. При анализе показателей коагуляционного гемостаза в обеих группах со стеатозом наблюдалось небольшое удлинение АЧТВ в сравнении с контрольными данными ( $p = 0,003$

и  $p = 0,002$ ), но при этом не выходило за рамки референсных значений набора (24–38 с). При этом показатель ТВ 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 (таблица 6).

По результатам иммуноферментного исследования у пациентов обеих групп было зарегистрировано повышение сывороточных концентраций провоспалительных цитокинов и ВЭФР, более значимое у лиц с вторичным стеатозом (таблица 7).

Таблица 7 – Концентрации цитокинов в исследуемых группах, *Me* (Q1–Q3)

Показатель	Контроль ( $n = 20$ )	НАСП-О ( $n = 52$ )	Вторичный СП ( $n = 24$ )
ФНО- $\alpha$ , пг/мл	0,0 (0,0–0,0)	1,1 (0,0–2,1) <sup>1</sup>	2,1 (0,9–3,1) <sup>2,3</sup>
ИЛ-6, пг/мл	0,0 (0,0–0,0)	1,0 (0,0–2,2) <sup>1</sup>	2,2 (0,4–7,8) <sup>2,3</sup>
ВЭФР, пг/мл	86,7 (10,7–175,1)	184,6 (94,8–291,7) <sup>1</sup>	365(232,8–617,3) <sup>2,3</sup>

*Примечание:*  $p$  – значимость различий; 1 – различия статистически значимы в группах контроль и НАСП-О; 2 – различия статистически значимы в группах контрольной и вторичного СП; 3 – различия статистически значимы в группах НАСП-О и вторичного СП.

Корреляционный анализ 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. В группе с вирус-ассоциированным стеатозом биохимические маркеры коррелировали с концентрацией цитокинов и индексами стеатоза и фиброза, а параметры гемостаза с биохимическими тестами, метаболическими маркерами, цитокинами и ВЭФР.

Анализ результатов исследования, полученных в экспериментальной и клинической части при стеатозе печени разного генеза, выявил сходные изменения липидного спектра и биометрических характеристик печени (таблица 8).

В рамках данного исследования методом множественной регрессии была разработана математическая модель диагностики стеатоза печени, формула для расчета которого выглядит сле-

дующим образом (Решение о выдаче патента от 05.08.2021 г. по заявке № 2021106422/14(013887)):

$$\text{ИС} = -1,2390 + 0,0575 \cdot \text{ИМТ} + 0,0064 \cdot \text{ГГТП} + 0,0006 \cdot \text{ВЭФР} + 0,0001 \cdot \text{IL6}.$$

Таблица 8 – Сравнительная оценка результатов экспериментального и клинического исследования

Показатель	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↑↑ ЛПВП↓ ЛПОНП↑	ХС↑, ТГ↑↑, ЛПНП↑, ЛПОНП↑↑, ИА↑↑; ЛПВП↓ инсулин↑↑, НОМА-IR↑, лептин↑↑ С-пептид↑	ТГ↑, ЛПОНП↑, ИА↑; ЛПВП↓, НОМА-IR↑, лептин↑ С-пептид↑
Цитокины	Норма	IL-6 ↑ ФНО-α ↑	IL-6 ↑↑ ФНО-α ↑↑
Маркеры повреждения эндотелия	Норма	ВЭФР↑ ФВ↑	ВЭФР↑↑ ФВ↑
Параметры гемостаза	Удлинение ПВ	Нарушение агрегации тромбоцитов удлинение ТВ	Нарушение агрегации тромбоцитов удлинение ТВ

При значении индекса стеатоза (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 – 97,0 %. Для каждого параметра модели оценивали предсказательную ценность по шкале значений площади под ROC-кривой (AUC) (рисунок 7). Также были рассчитаны пороговые значения для каждого показателя модели, которые составили: ИМТ более 24,2, ГГТП более 18 Ед/л, ВЭФР более 138 пг/мл и IL-6 более 0 пг/мл.



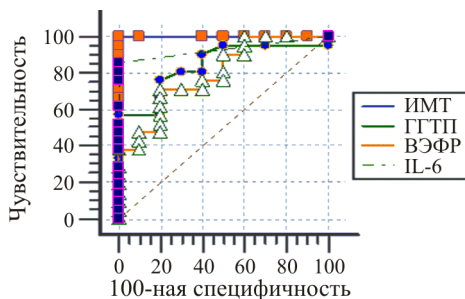


Рисунок 7 – ROC-кривая для показателей индекса стеатоза

Валидация математической модели расчета ИС была проведена на новой группе пациентов с НАСП в количестве 20 человек (10 мужчин и 10 женщин), средний возраст  $44,7 \pm 9,6$  г., из которых 45 % имели форму НАСП-О, а 55 % – нормальный и повышенный ИМТ (форма НАСП-БО). У 19 пациентов (95 %) данной группы значения ИС были более 0,5 (в диапазоне от 0,5 до 1,5), что свидетельствует о наличии стеатоза печени по критериям модели. Диагностическая чувствительность модели на новой группе больных составила 95 %, что доказывает высокую эффективность предложенного метода диагностики стеатоза печени и возможность его использования как у лиц с ожирением, так с нормальной и повышенной массой тела.

При исследовании особенностей ОНП гена *TNF- $\alpha$*  в позиции rs1800629 генотип AA гена *TNF- $\alpha$*  в регионе -308G/A значимо чаще регистрировался у пациентов с НАСП-О, чем в популяции здоровых (7,69 и 0 % соответственно;  $\chi^2 = 6,05$ ;  $p = 0,04$ ;  $OR = 1,76$ ) (рисунок 8). При оценке ОНП гена *VEGFA* (G-634C) в позиции rs2010963 нами было установлено, что генотип GC преобладал у здоровых в 35,38 % ( $\chi^2 = 7,71$ ;  $p = 0,04$ ). Однако вариант CC значимо чаще встречался у пациентов с НАСП-О – в 28,85 % случаев ( $OR = 3,36$ ), а у здоровых обнаруживался лишь в 10,77 % ( $\chi^2 = 6,18$ ;  $p = 0,02$ ). Аллель C гена *VEGFA* в регионе -634G/C у пациентов с НАСП-О регистрировалась в 54,81 %, что было значимо выше, чем в контрольной группы ( $\chi^2 = 6,83$ ;  $p = 0,01$ ;  $OR = 2,00$ ) (рисунок 9).

Таким образом, генетическими факторами риска развития НАСП у пациентов с ожирением в Пермском крае следует счи-

тать носительство AA-вариантов гена *TNF-α* (G308A) и CC-варианта гена *VEGFA* (G634C). По полиморфизму гена *IL-6* в регионе -174G/C (rs1800795) значимых различий не было выявлено.

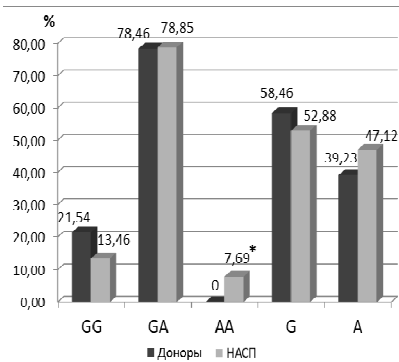


Рисунок 8 – Аллельные вариации гена *TNF-α* (G-308A) у доноров и пациентов с НАСП

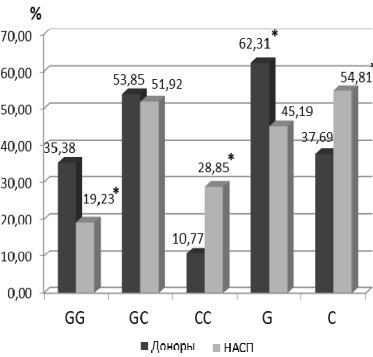


Рисунок 9 – Аллельные вариации гена *VEGFA* (G-634C) у доноров и пациентов с НАСП

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 *IL-6* ( $Ki = 0,558$ ;  $p = 0,043$  и  $Ki = 0,597$ ;  $p = 0,042$  соответственно), а также ассоциация полиморфизма региона -634G/C гена *VEGFA* с продукцией ФВ ( $Ki = 0,642$ ;  $p = 0,045$ ), что может приводить к прогрессированию иммуновоспалительного синдрома и дисфункции эндотелия в группе носителей. Оценка индивидуального генетического профиля здоровых лиц и пациентов с НАСП-О 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 выявле-

нии у пациентов с ожирением 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) (таблица 9).

Таблица 9 – Генетический профиль здоровых и пациентов с НАСП-О

Группа	Баллы					
	0	1	2	3	4	5
Доноры, %	9	42	35	3	11	–
НАСП-О, %	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.

## 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 IL-6.

4. Носительство генотипов AA гена *TNF-α* в регионе -308G/A и CC 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- $\alpha$  (G-308A) и VEGFA (G-634C) следует использовать в качестве оценки риска развития НАСП-О у жителей Пермского края. Предикторами развития СП следует считать носительство AA-варианта гена TNF- $\alpha$  (G308A) и CC-варианта гена VEGFA (G634C).

2. Анализ индивидуального генетического профиля с использованием генетических маркеров TNF- $\alpha$  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 с ним: 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 IL-6, и рассчитывать ИС с чувствительностью 95,2 % и специфичностью 97,0 %. 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.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**1. Мифтахова, А.М.** Роль лептина в патогенезе стеатоза печени, стеатогепатита и дисфункции эндотелия при ожирении: обзор литературы / А.М. Мифтахова, Л.Д. Пестренин, И.Л. Гуляева // Пермский медицинский журнал. – 2020. – № 3 (37). – С. 58–65.

**2. \*Джинура Прокумбенс: обзор биологических эффектов и их возможных механизмов [Электронный ресурс] / Л.Д. Пе-**

---

\* Жирным шрифтом выделены работы, опубликованные в журналах, входящих в список ВАК.

стренин, Б.В. Курцев, И.Л. Гуляева, И.А. Булатова, А.М. Мифтахова // *Современные проблемы науки и образования*. – 2020 – № 3. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29863> (дата обращения: 14.03.2022)

3. Патогенетическое обоснование применения Джинуры Прокумбенс для профилактики развития неалкогольного стеатоза печени (экспериментальное исследование) / И.Л. Гуляева, А.М. Мифтахова, И.А. Булатова, Б.В. Курцев // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2021. – № 8 (110). – Ч. 2. – С. 100–105.

4. Булатова, И.А. Анализ полиморфизма гена VEGFA (G-634C) при неалкогольной жировой болезни печени / И.А. Булатова, А.М. Мифтахова, И.Л. Гуляева // *Международный научно-исследовательский журнал*. – 2021. – № 8 (110). – Ч. 2. – С. 87–90.

5. Мифтахова, А. М. Показатели гемостаза при неалкогольном стеатозе печени (экспериментально-клиническое исследование) / А.М. Мифтахова // *Медицинская наука и образование Урала*. – 2021. – Т. 22, № 3 (107). – С. 17–21.

6. Булатова, И.А. Выраженность воспалительного ответа и эндотелиальной дисфункции при стеатозе и фиброзе печени / И.А. Булатова, А.М. Мифтахова, И.Л. Гуляева // *Пермский медицинский журнал*. – 2021. – № 4 (38). – С. 54–61.

7. Булатова, И.А.. Способ диагностики неалкогольного стеатоза печени / И.А. Булатова, А.М. Мифтахова, И.Л. Гуляева // *Медицинский алфавит*. – 2021. – № 30. – С. 52–55.

8. Мифтахова, А.М. Влияние водного экстракта Джинуры Прокумбенс на липидный спектр на фоне экспериментального стеатоза печени / А.М. Мифтахова, И.Л. Гуляева, И.А. Булатова // *Высшая школа: научные исследования: материалы межвузовского международного конгресса (г. Москва). 5 августа 2021 г.* – М., 2021. – С. 92–96.

9. Мифтахова, А.М. Использование расчетных индексов в диагностике неалкогольного стеатоза и вирусного фиброза печени / А.М. Мифтахова, И.А. Булатова, И.Л. Гуляева // *Наука и инновации – современные концепции: сборник научных статей по итогам работы международного научного форума 13 августа 2021 г. (г. Москва)*. – М., 2021. – С. 42–48.

10. **Мифтахова, А.М.** Динамика функциональных печеночных тестов у животных с экспериментальным стеатозом на фоне приема Джинуры Прокумбенс / А.М. Мифтахова, И.Л. Гуляева, И.А. Булатова // Наука и инновации – современные концепции: сборник научных статей по итогам работы международного научного форума 13 августа 2021 г. (г. Москва). – М., 2021. – С. 48–51.

11. **Мифтахова, А.М.** Влияние экстракта Джинуры Прокумбенс на морфометрические и гистологические характеристики печени при фруктозо-индуцированном стеатозе (экспериментальное исследование) / А.М. Мифтахова // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции 11 января 2022 г. (г. Санкт-Петербург). – СПб., 2022. – С. 18–20.

### Патент

Патент Рос. Федерация № 2755974, МПК G01N 33/573 (2006.01). Способ диагностики неалкогольного стеатоза печени / Пестренин Л.Д., Булатова И.А., Гуляева И.Л., Шелудько В.С., Мифтахова А.М.; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «ППМУ им. академика Е.А. Вагнера» Мин. Здрав. Российской Федерации; заявка № 2021106422; заявл. 11.03.2021; опубл. 23.09.2021.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат  
 АЛТ – аланинаминотрансфераза  
 АСТ – аспаратаминотрансфераза  
 АФП – альфа-фетопротеин  
 АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время  
 ВЭФР – васкулоэндотелиальный фактор роста  
 ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза  
 ДП – Джинура Прокумбенс  
 ИА – индекс атерогенности  
 ИМТ – индекс массы тела  
 ИР – инсулинорезистентность  
 ИФ – индекс фиброза  
 ИС – индекс стеатоза

- ЛПВП – липопротеины высокой плотности
- ЛПНП – липопротеины низкой плотности
- ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
- НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени
- НАСП – неалкогольный стеатоз печени
- НАСП-О – неалкогольный стеатоз печени с ожирением
- НАСП-БО – неалкогольный стеатоз печени без ожирения
- ОНП – однонуклеотидный полиморфизм генов
- ПВ – протромбиновое время
- СП – стеатоз печени
- ТВ – тромбиновое время
- ТГ – триглицериды
- ТР – тромбоциты
- ФВ – фактор Виллебранда
- ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа
- ФП – фиброз печени
- ХЗФ – Хагеман-зависимый фибринолиз
- ХС – общий холестерин
- 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
- IL-6 – интерлейкин-6

**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

Автореферат  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета 21.2.074.03,  
созданного на базе ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, от 23.03.2022

---

Подписано в печать 23.03.2022. Формат 60×84 1/16.  
Усл. печ. л. 1,5. Тираж 60 экз. Заказ № 38/2022.

---

Отпечатано в типографии издательства  
Пермского национального исследовательского политехнического университета.  
Адрес: 614990, г. Пермь, Комсомольский проспект, 29, к. 113. Тел. (342) 219-80-33.