МИШИНА ЕКАТЕРИНА ЕВГЕНЬЕВНА

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНСУЛИНУ У ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ И НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

3.1.19. ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Майоров Александр Юрьевич

	доктор медицинских наук
Официальные оппоненты:	Бирюкова Елена Валерьевна доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медикостоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
	Куницына Марина Алексеевна доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной терапии лечебного факультета Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского
ведущая организация.	Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)
диссертационного совета 21.1.045.0 адресу: 117292, г. Москва, ул. Дми	иться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» www.endocrincentr.ru.
Ученый секретарь диссертационного совета доктор медицинских наук	Мазурина Наталия Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и сахарный диабет 2 типа (СД2) – патологические состояния, ассоциированные друг с другом и достигающие размеров эпидемии. Численность пациентов с НАЖБП прогрессивно растет и заболевание остается одним из наиболее частых хронических заболеваний печени, которым страдают 25% взрослого населения в целом. Распространенность НАЖБП при СД2 изучалась в небольшом количестве исследований и составила 69% по данным УЗИ. Одним из наиболее значимых факторов риска развития как СД2, так и НАЖБП является ожирение, которое усиливает имеющуюся инсулинорезистентность (ИР). Последняя является основным патогенетическим звеном СД2 и НАЖБП, связывая эти два патологических состояния. Наиболее точным метолом определения ИР является гиперинсулинемический эугликемический клэмп-тест, однако его использование ограничено в связи с экономическими и временными затратами, необходимостью специального оборудования. «Золотым» стандартом диагностики НАЖБП является пункционная биопсия печени под контролем ультразвукового исследования. Однако данный диагностический метод ограничен. Учитывая ограниченность применения метода и высокую распространенность заболевания в популяции, особенно у пациентов с СД2, отмечается повышенный интерес к поиску неинвазивных методов исследования и маркеров НАЖБП. Однако на данный момент нет единого алгоритма неинвазивного обследования пациента с НАЖБП.

Для определения прогрессирующего фиброза используется методика эластографии сдвиговой волны. Стоит отметить очевидные преимущества: метод характеризуется минимальным риском для здоровья обследуемого, относится к неинвазивным способам обследования и не требует специальных условий. Соответственно оценка данного метода является актуальной задачей.

На данный момент активно изучаются свойства органокинов, синтезирующихся клетками печени, жировой ткани и скелетной мускулатуры, которые могут активно оказывать влияние на метаболические процессы. Понимание того, как модуляция органокинов вовлечена в патогенез НАЖБП, поможет определить приоритетные терапевтические вмешательства.

Несмотря на то, что НАЖБП является самым распространенным заболеванием печени, на сегодня нет этиологического/патогенетического препарата для лечения. Фарнезоидный X рецептор является одним из наиболее важных рецепторов желчных кислот и ядерных рецепторов в печени. Активация фарнезоидного X рецептора регулирует синтез желчных кислот в печени, их транспорт в энтерогепатической циркуляции и влияет на метаболизм липидов и глюкозы, оказывая воздействие на патогенез и прогрессирование НАЖБП. Исследуемый фарнезоидный X рецептор является потенциально полезной фармакологической мишенью для лечения НАЖБП.

Цель исследования

Изучить чувствительность к инсулину и соотнести с лабораторными, инструментальными, морфологическим показателями поражения печени у пациентов с НАЖБП и различными нарушениями углеводного обмена.

Задачи исследования

- 1. Оценить влияние степени чувствительности к инсулину на развитие и прогрессирование НАЖБП при помощи математических моделей гомеостаза глюкозы и/или гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста у пациентов с НАЖБП с различными нарушениями углеводного обмена и без них, соотнести между собой эти методы.
- 2. Оценить влияние гликемического контроля на развитие и прогрессирование НАЖБП.
- 3. Определить корреляцию морфологических изменений (фиброза), полученных при проведении

- биопсии печени и оцененных с помощью эластографии сдвиговой волны печени с НАЖБП и различными нарушениями углеводного обмена.
- 4. Изучить экспрессию фарнезоидного X рецептора в ткани печени, как регулятора метаболизма липидов и глюкозы, при помощи молекулярно-биологического анализа у пациентов с НАЖБП и различными нарушениями углеводного обмена.
- 5. Изучить экспрессию толл-подобных рецепторов, провоспалительных цитокинов в ткани печени при помощи молекулярно-биологического анализа у пациентов с НАЖБП, различными нарушениями углеводного обмена, учитывая роль воспалительного процесса в патогенезе заболевания.

Научная новизна исследования

- Впервые в Российской Федерации была проведена оценка ИР, методом гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста, являющегося наиболее точным способом определения ИР, у пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом НАЖБП.
- Впервые в Российской Федерации были сопоставлены методы оценки ИР эугликемический гиперинсулинемический клэмп-тест и с использованием математической модели гомеостаза глюкозы (HOMA-IR) у пациентов с морфологически подтвержденным диагнозом НАЖБП.
- Впервые в Российской Федерации проанализировано влияние ИР, оцененной методом гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста, на прогрессирование НАЖБП.
- Впервые в Российской Федерации соотнесены данные по оценке фиброза печени методом эластографии сдвиговой волны и морфологическим исследованием у пациентов изучаемых групп.
- Впервые в Российской Федерации оценена экспрессия фарнезоидного X рецептора в ткани печени, полученной в ходе биопсии печени тремя различными методами.
- Впервые в Российской Федерации был проведен анализ экспрессии толл-подобных рецепторов в биоптатах печени: TLR2, TLR3 и TLR4, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 у пациентов изучаемых групп.

Теоретическая и практическая значимость

Ценность научных работ соискателя заключается в определении чувствительности к инсулину у пациентов с различными формами НАЖБП при помощи математических моделей гомеостаза глюкозы и/или гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста у пациентов с подтвержденным диагнозом НАЖБП по данным биопсии печени с различными нарушениями углеводного обмена и без них, оценке вклада инсулинорезистентности в развитие и прогрессирование НАЖБП. Показано, что морфологические изменения в печени при НАЖБП взаимосвязаны с показателями чувствительности к инсулину. В ходе работы показана высокая диагностическая значимость эластографии сдвиговой волны для верификации диагноза фиброза печени. Исследован профиль органокинов и определена их связь с показателями углеводного обмена, что свидетельствует об их вкладе в развитие нарушений углеводного обмена. В ходе проведения молекулярно-биологического анализа выявлен вклад фарнезоидных X рецепторов в развитии инсулинорезистентности у пациентов с НАСГ. Продемонстрирована роль толл-подобных рецепторов в развитии НАЖБП.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автор лично провел анализ состояния научной проблемы в мире на основании литературных данных, сформулировал цель, задачи и дизайн диссертационной работы, принимал непосредственное участие в работе с пациентами — сборе анамнестических данных,

самостоятельном проведении перорального глюкозотолерантного теста, гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста (в том числе подготовка технического оборудования и катетеризация кубитальных вен), организации проведения лабораторных и инструментальных исследований, принимал участие в проведении молекулярно-биологического анализа. Основной объем работы по подготовке базы пациентов, статистической обработке данных и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций и докладов по теме работы выполнены лично автором.

Основные положения, выносимые на защиту

- ИР является важным фактором развития НАЖБП, однако ее степень не влияет на прогрессирование НАЖБП
- В данной когорте пациентов в рутинной клинической практике возможно использование математической модели гомеостаза глюкозы HOMA-IR для оценки ИР.
- На данный момент нет установленной лабораторной и неинвазивной инструментальной методики для оценки НАСГ.
- Уровень фиброза может быть оценен неинвазивно, однако необходимы крупномасштабные исследования для подтверждения этого факта.
- Органокины оказывают влияние на возникновение и прогрессирование НАЖБП, ИР и нарушений углеводного обмена.
- Данные по изучению фарнезоидного X рецептора могут быть использованы для разработки препаратов для лечения НАЖБП.
- Процессы воспаления играют важную роль в прогрессировании НАЖБП.

Апробация результатов

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 13.12.2022г. на расширенном заседании межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Результаты работы представлены на российских и международных медицинских и медикобиологических конференциях и конгрессах: II международное заседание Российского общества молодых эндокринологов, Ереван, Армения, 2017; VIII (XXV) Всероссийский диабетологический конгресс с международным участием — Москва, Россия, 2018; 54-ая ежегодная конференция EASD (Берлин, Германия, 2018); 43-ий конгресс Федерации Европейских биохимических обществ (Прага, Чехия, 2018); конгресс International Diabetes Federation 2019 (Пусан, Южная Корея, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе: 2 полнотекстовые статьи в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень изданий, рекомендуемых ВАК для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, 3 тезиса в сборниках российских конференций, 2 тезиса в сборниках зарубежных конференций, результаты работы представлены в виде устных докладов на российской и зарубежной конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 182 страницах, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, условных обозначений и списка литературы. Библиография включает 193 источника литературы (24 отечественные и 169 зарубежных). Диссертация иллюстрирована 51 таблицей и 27 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучаемая популяция и дизайн исследования

Исследование являлось двухцентровым одномоментным активным исследованием по принципу «случай-контроль». Целевая популяция включена в исследование путем сплошного способа формирования выборки согласно критериям включения и невключения.

Дизайн исследования

Исследование состояло из двух частей – из клинической и молекулярно-биологической.

Объектом исследования являлись 87 пациентов с избыточной массой тела (ИМТ более 27,5 кг/м²)/ожирением без сахароснижающей терапии. Включение и обследование пациентов проводилось с июня 2017 г. по июнь 2019 г. Всем пациентам проведена клиническая часть исследования, 60 из них - молекулярно-биологическая часть, после чего были сформированы три группы исследования (рис.1).

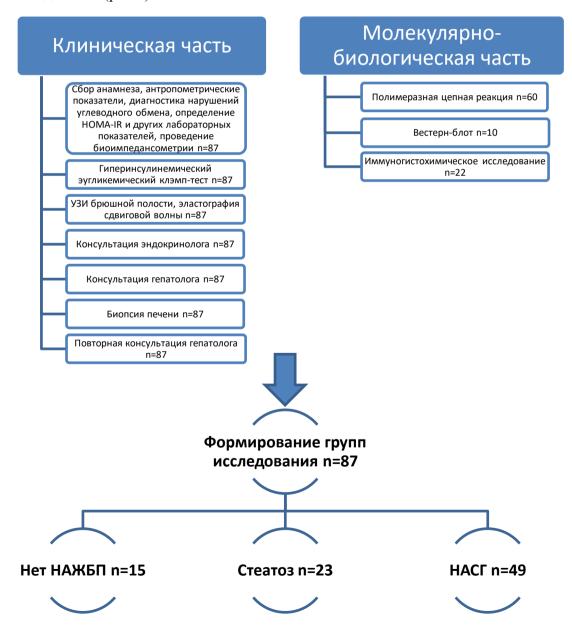


Рисунок 1. Дизайн исследования

Условия проведения

Клиническая часть исследования, включая набор пациентов, лабораторные, инструментальные исследования были проведены на базах: ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России и ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», а молекулярно-биологическая часть была проведена на базах ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН и ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Критерии соответствия

Критерии включения: возраст от 18 до 65 лет; пациенты без сахароснижающей терапии; ИМТ более 27.5 кг/м^2 ; подписанное информированное согласие; наличие диагноза «нет НАЖБП» или «стеатоз» или «НАСГ».

Критерии невключения: СД1 и другие специфические типы СД; онкологические заболевания в анамнезе; перенесенное ОРВИ или обострение хронического заболевания в течение последнего месяца, тяжелые заболевания сердечно-сосудистой системы за последние 6 месяцев (инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия, коронарное шунтирование, коронарная ангиопластика, застойная сердечная недостаточность III-IV по NYHA); наличие причин вторичного накопления жира в печени, таких как избыточное потребление алкоголя (более 21 усл. ед. в неделю для мужчин и более 14 усл. ед. в неделю для женщин, 1 усл. ед. — 10 г чистого спирта), использование препаратов, влияющих на накопление жира (глюкокортикоиды, метотрексат, амиодарон, синтетические эстрогены, тамоксифен, дилтиазем), наследственные и вирусные заболевания печени, гипотиреоз различной этиологии; беременность, планирование беременности.

Описание вмешательства

Клиническая часть

В ходе клинической части исследования всем пациентам проведен сбор анамнеза (длительность избыточной массы тела/ожирения, наличие сопутствующих заболеваний, получаемые медикаментозные препараты, отсутствие анамнестических данных о наличии СД) и изучена полученная медицинская документация.

Определение антропометрических показателей

У всех пациентов проведено антропометрическое обследование.

- 1) Рост измеряли утром с помощью ростомера.
- 2) Массу тела измеряли утром натощак во время биоимпедансометрии.
- 3) Расчет ИМТ производился по формуле отношения массы тела в килограммах к квадратному значению роста, выраженному в метрах ($\kappa \Gamma/M^2$).
- 4) Измерение окружности талии (ОТ) проводили в средней точке между нижним краем последнего прощупываемого ребра и верхней частью гребня подвздошной кости с помощью сантиметровой ленты.
- 5) Измерение окружности бедер (ОБ) проводили путем обхвата сантиметровой лентой самой широкой части ягодиц.
- 6) Путем математического вычисления определено отношение ОТ к ОБ.

Определение показателей углеводного обмена

Всем 87 больным проведено определение уровня гликированного гемоглобина и глюкозы (сыворотка), проведен пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) с 82,5 г моногидрата глюкозы, тест выполнен с соблюдением требований его проведения, для подтверждения/исключения СД. Данное исследование позволило определить диагноз

нарушения углеводного обмена – без нарушений углеводного обмена, предиабет (нарушенная гликемия натощак/нарушенная толерантность к глюкозе), СД2. На основании определения глюкозы и гликированного гемоглобина диагноз СД поставлен 30 пациентам, на основании проведения ПГТТ диагноз НТГ/НГН поставлен 26 пациентам, СД – 2 пациентам, отсутствие нарушений углеводного обмена выявлено у 28 пациентов.

- 1) Гликированный гемоглобин (референсные значения 4–6%) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на анализаторе D10 (BioRad, CША).
- 2) Анализ глюкозы сыворотки (референсные значения натощак 3,1–6,1 ммоль/л) проводился на биохимическом анализаторе Architect c4000 (Abbott Diagnostics, Abbotpark, IL, США) стандартными наборами фирмы.
- 3) Проведение перорального глюкозотолерантного тест (ПГТТ) с 82,5 г моногидрата глюкозы. Исследование проводилось угром натощак на фоне не менее чем 3-дневного неограниченного питания (более 150 г углеводов в сутки) и обычной физической активности. После забора крови натощак для определения глюкозы пациент не более чем за 5 мин выпивал 82,5 г моногидрата глюкозы, растворенных в 250 мл воды. Через 2 часа осуществлялся повторный забор крови для определения глюкозы. Кровь была центрифугирована сразу после взятия. Анализ глюкозы сыворотки проводился на биохимическом анализаторе Architect c4000 (Abbott Diagnostics, Abbotpark, IL, США) стандартными наборами фирмы.

Забор крови для определения вышеперечисленных лабораторных показателей проводился утром натощак из кубитальной вены.

Определение инсулинорезистентности

ИР определялась двумя способами:

- 1) расчетным методом с использованием математической модели гомеостаза глюкозы HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment Insulin Resistance);
- 2) методом гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста, который является «золотым стандартом» определения ИР.

Расчет производился по математической модели гомеостаза глюкозы HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance) и в ходе гиперинсулинемического эугликемического клэмп-теста. Для определения индекса HOMA-IR использовалась следующая формула, разработанная D.Matthews:

Индекс ИР = ИРИО (мкЕд/мл) × ГПН (ммоль/л) / 22,5,

*ИРИО – иммунореактивный инсулин натощак, ГПН – глюкоза плазмы натощак.

По данным литературы показатель HOMA-IR более 2,77 является отражением ИР.

В ходе проведения клэмп-теста был получен коэффициент утилизации (М-индекс), степени выраженности ИР в зависимости от М-индекса представлены в таблице 1.

Таолица 1	. Степени вы	раженности ИН	' в зависимости от 1	VI-индекса.
-----------	--------------	---------------	-----------------------------	-------------

Степень выраженности	М-индекс
Тяжелая	≤2 мг/кг/мин
Средняя	2-4 мг/кг/мин
Легкая	4-6 мг/кг/мин
Нет ИР	>6 мг/кг/мин

Определение специфических показателей

Определение уровней FGF-21 (набор Human Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) ELISA); фетуина A (набор Human Fetuin A ELISA); фетуина В (набор Human Fetuin B ELISA), бетатрофина (набор Betatrophin ELISA); ангиопоэтинподобного белка (RayBio (США), чувствительность 20 пг/мл); ретинол-связывающего белка 4 (Assaypro LLC, референс 20-35 мкг/мл); цитокератина-18 (набор Human Cytokeratin 18-M30, CK 18-M30 ELISA)- Cusabio человеческого гепассоцина (фибриноген-подобного белка-1) (набор Human Hepassocin/HFREP-1 ELISA) - RayBio, чувствительность 3,1 нг/мл); Fas-лигандА (набор Human sFas ligand ELISA) - affymetrix eBioscince (Австрия), чувствительность 0,07 нг/мл); Nтерминального пропептида проколлагена III (набор Procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP) ELISA) - Cloud-Clone, чувствительность 2,14 нг/мл); гиалуроновой кислоты (набор Hyaluronic Acid ELISA)-corgenix (США), чувствительность 50 нг/мл); адипоцитарного протеина, связывающего свободные жирные кислоты (FABP 4) (набор Fatty Acid Binding Protein 4 Adipocyte ELISA) - BioVendor (Чехия), чувствительность 9,08 нг/мл); адипонектина (набор Human Adiponectin, ADP ELISA) - BioVendor (Чехия), чувствительность 26 нг/мл); резистин (набор Resistin ELISA) - BioVendor (Чехия), чувствительность 0,012 нг/мл); висфатина (набор Human Visfatin ELISA) - RayBiotech, чувствительность 0,778 нг/мл); лептина (набор Human Leptin ELISA) Diagnostics Biochem Canada, чувствительность 0,5 нг/мл).

Забор крови для определения вышеперечисленных лабораторных показателей проводился утром натощак из кубитальной вены.

Образцы полученной крови центрифугировались (лабораторная центрифуга Eppendorf 5810R с комплектом роторов) однократно в течение 15 минут с частотой 3000 оборотов в минуту, после чего отделенная пипетатором плазма распределялась в эппендорфы объемом по 0,5 мл с последующим замораживанием при температуре минус 80 °C до периода окончания сбора материала.

Определение композиционного состава тела

Для оценки количества подкожного и висцерального жира всем больным проведена биоимпедансометрия при помощи анализатора InBody-770.

Определение общеклинических показателей

Клинико-лабораторные исследования включали оценку липидного спектра (уровни общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП, ЛПВП), «печеночных» маркеров (АЛТ, АСТ, общий билирубин, щелочная фосфатаза, ГГТ), почечной функции (креатинин, с расчетом СКФ по ЕРІ, мочевина), кальция, ферритина, общего белка, альбумина, мочевой кислоты. Гормональные исследования включали определение ТТГ, С-пептида, иммунореактивного инсулина (ИРИ). Также для оценки воспаления, наличия анемии, уровня тромбоцитов проводился общеклинический анализ крови. Для исключения вирусных заболеваний печени проведено определение поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к антигенам вируса гепатита С. Анализ биохимических показателей, определение поверхностного антигена вируса гепатита В, антител к антигенам вируса гепатита С был выполнен на биохимическом анализаторе Architect c8000 (Abbott, США) стандартными наборами фирмы. Гормональные показатели определялись на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas 6000 (Roche, Швейцария) стандартными наборами фирмы. Общеклинический анализ крови производился на автоматическом анализаторе «Sysmex XE-2100 D» по стандартным использованием реагентов производителя.

Ультразвуковая диагностика

Ультразвуковое исследование брюшной полости для оценки размеров печени и структурных изменений печени проводилось на аппарате Voluson E8 (GE, США), эластография сдвиговой волны для оценки ее упругости - на аппарате Super Sonic Imagine's Aixplorer®

(SuperSonicImagine, Франция). В таблице 2 представлено соответствие значений эластичности, полученных при проведении эластографии сдвиговой волны, стадии фиброза.

Таблица 2. Значения эластичности печени при различных стадиях ее фиброза.

Стадия фиброза (Metavir)	Значения эластичности, кПа
F0	1,5-5,8
F1	5,9 – 7,2
F2	7,3 – 9,5
F3	9,6 – 12,5
F4	>12,6

Оценка наличия и стадии неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП)

Всем больным выполнена чрескожная пункционная биопсия под непрерывным ультразвуковым контролем с использованием допплерографических методов с дальнейшим гистологическим исследованием биоптата печени. Пункционная биопсия печени выполнялась стандартным набором инструментов одноразового применения с использованием пункционной иглы "Hepafix" (типа Menghini) диаметром 1,4-1,6 мм. Манипуляция выполнялась в стандартном положении больного лежа на спине с наклоном влево. Место пункции выбирали с помощью перкуссии и ультразвукового сканирования. Место прокола локализовалось в 8-9 межреберье справа по среднеподмышечной линии. Перед пункцией печени проводилась местная инфильтрационная анестезия 0,5% раствором новокаина или 2% раствором лидокаина. Полученный материал фиксировался в стандартном забуфференном растворе 10% формалина по методу Лилли и направлялся на гистологическое исследование. После процедуры больному в течение 4 часов предписывался строгий постельный режим, на область пункции накладывался пузырь со льдом на 2 часа, через 6 часов контролировались показатели гемограммы: гемоглобин, гематокрит, содержание эритроцитов. Гистологическое исследование биоптата печени. Материал, полученный в результате пункционной биопсии печени, заливался в парафин. С каждого блока приготовлялось 25-30 срезов, смонтированных на нескольких стеклах по группам. Окрашивание материала проводилось гематоксилин-эозином и пикрофуксином по методу ван Гизона. После приготовления серии микропрепаратов печеночной паренхимы проводили гистологический анализ с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss). Оценивались структурные изменения ткани: индекс гистологической активности (ИГА), индекс фиброза, а также наличие и степень выраженности стеатоза гепатоцитов. Вычисление ИГА проводилось полуколичественным методом с использованием балльной шкалы Knodell (1981г.), согласно которой оценивается выраженность трех основных характеристик – некроза, клеточной дистрофии и воспалительной инфильтрации (табл. 3). Этот метод оценки степени выраженности воспаления, некроза и фиброза печени, известный сегодня как ИГА стеатогепатита.

Таблица 3. Полуколичественный анализ определения индекса гистологической активности по шкале Knodell.

І. Перипортальные и мостовидные некрозы гепатоцитов		
а) отсутствуют	0	
б) слабо выраженные ступенчатые некрозы	1	
в) умеренные ступенчатые некрозы (до 50% портальных трактов)	3	
г) выраженные ступенчатые некрозы (свыше 50% портальных трактов)	4	
д) умеренные ступенчатые + мостовидные некрозы	5	

е) выраженные ступенчатые + мостовидные некрозы	6
II. Внутридольковая дегенерация и очаговые некрозы	Баллы
а) отсутствуют	0
б) слабые (ацидофильные тельца, баллонная дегенерация, фокусы гепатоцеллюлярного некроза в 33% долек)	1
в) умеренные (вовлечены 33 - 66% долек)	3
г) выраженные (вовлечены более 66% долек)	4
III. Портальное воспаление	Баллы
а) отсутствует	0
б) слабое (клетки воспалительного инфильтрата присутствуют менее чем в 33% портальных трактов)	1
в) умеренное (воспалительная инфильтрация в 33 - 66% портальных трактов)	3
г) выраженное (обильная воспалительная инфильтрация более чем в 66% портальных трактов)	4
IV. Фиброз	Баллы
а) отсутствует	0
б) фиброз портальных трактов	1
в) мостовидный фиброз (порто-портальный или порто-центральный)	3
г) цирроз	4

Степень активности стеатогепатита отражают первые три компонента (выраженность перипортального и/или мостовидного некроза печеночных долек, некроз долей печени и портальное воспаление), четвертый - стадию процесса. ИГА, равный 0 баллов, свидетельствует об отсутствии воспаления; 1 - 3 балла соответствуют минимальной активности патологического процесса; 4 - 8 - слабовыраженной; 9 - 12 - умеренной и 13 - 18 - значительной выраженной активности процесса.

Оценка индекса фиброза проводилась по методу К.G. Ishak (1994 г.) (табл. 4).

Таблица 4. Оценка фиброза по шкале Ishak

Морфологические изменения	Индекс
Фиброза нет	0
Распространение фиброза на некоторые портальные тракты ± короткие фиброзные септы	1
Распространение фиброза на большинство портальных трактов \pm короткие фиброзные септы	2
Распространение фиброза на большинство портальных трактов и единичные портопортальные септы	3
Распространение фиброза на портальные тракты с множественными портопортальными и портоцентральными септами	4
Выраженный мостовидный фиброз с единичными узлами (неполный цирроз)	5
Вероятный или определенный цирроз	6

Также оценка фиброза проводилась по шкале Metavir (1993г., P.Bedossa) (табл.5). Metavir — это аббревиатура от «метаанализ гистологических данных при вирусном гепатите», изначально определялась у пациентов с вирусным гепатитом С.

Таблица 5. Степени фиброза по шкале Metavir

Описание	Название
Отсутствие фиброза	F0
Фиброз (звездчатое расширение портальных трактов, без образования септ)	F1
Фиброз с единичными септами	F2
Фиброз с множественными септами без цирроза	F3
Фиброз с множественными септами с циррозом	F4

При наличии жировых вакуолей в гепатоците, занимающих более 5% площади клетки, был диагностирован стеатоз гепатоцитов (стеатоз по Brunt, выражается в процентах) [160]. Выделены следующие степени стеатоза: S0 – стеатоз менее 10%, S1 – стеатоз более 33%, S3 – стеатоз более 66% гепатоцитов.

Для определения степени поражения печени использовалась классификация NAS (NAFLD activity score) (2005 г.) (табл. 6), позволяет оценить степень морфологических изменений в баллах (от 0 до 8): выраженность стеатоза печени, внутридолькового (лобулярного) воспаления, баллонной дистрофии гепатоцитов и стадию фиброза.

Таблица 6. Шкала активности НАЖБП (NAS – NAFLD Activity Score).

	Степень активности= S+L+B (диапазон 0 - 8)							
Стеатоз	оз Показатель S Лобулярное Показатель 1		Показатель L	Баллонная	Показатель В			
		воспаление		дистрофия				
<5%	0	нет	0	нет	0			
5-33%	1	<2	1	Несколько клеток	1			
33-66%	2	2-4	2	Много клеток	2			
>66%	3	>4	3					
Стадия фи	иброза при НАС	<u>Έ</u>		Стадия				
нет				0				
Умеренный перисинуидальный фиброз зона 3				1a				
Средний п	ерисинуидальны	й фиброз зона 3		1b				
Только пор	тальный/перипс	ртальный фиброз		1c				
Перисинуидальный фиброз зона 3 и портальный/				2				
перипортальный фиброз								
Мостовидный фиброз			3					
Цирроз				4				

Молекулярно-биологическая часть.

При проведении биопсии печени (ввиду малого количества материала, полученного при проведении биопсии печени суммарное количество проб составило 60) часть ткани была заморожена при температуре -80 °C для дальнейшего молекулярно-биологического анализа. Образцы замороженной ткани печени были использованы для выделения РНК и белков с разделением ядерной и цитоплазматической фракции.

Тотальную РНК из ткани печени выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Реакция обратной транскрипции проводилась с использованием 2 мкг суммарной РНК и набора MMLV RT (Евроген, Россия).

Количественный ПЦР-анализ проводили на приборе Applied Biosystems 7500 с использованием набора qPCRmix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия).

Анализ количества белка FXR проводили методом Вестерн-блот с использованием анти-FXR антител (PA5-30951, Thermo Scientific). Лизат разделяли методом белкового электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Полученный гель подвергали электроблоттингу на нитроцеллюлозную мембрану. Для визуализации белков использовали раствор Понсо S. Визуализацию иммунохимического сигнала проводили при помощи метода ECL (Enhanced ChemiLuminescence) с использованием набора SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). Хемилюминесценцию документировали при помощи рентгеновской пленки Kodak MXB Film.

Иммуногистохимический анализ экспрессии FXR был проведен на приборе Leica Bond Autostainer (Германия) с использованием антител против FXR (sc-13063, Santa Cruz) и системы визуализации на основе полимера Leica Bond. Из парафиновых блоков подготавливались серийные срезы толщиной 3–4 мкм, которые помещались на полилизиновые стекла (Leica, Германия), которые были инкубированы в термостате при температуре 37°С в течение 12 часов. Далее срезы последовательно депарафинизировались. Затем препараты окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Для полуколичественной оценки экспрессии некоторых представителей Толл-подобных рецепторов (TLR (TLR2-4)), а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в пробах биопсий печени пациентов (24 пробы) с различными формами НАЖБП проведен ПЦР в реальном времени с параметрами программы, аналогичными таковым для анализа экспрессии NR1H4: нагревание до 95°C (10 мин.), 40 циклов амплификации: 95°C – 20 сек., 60° С – 20 сек. и 72° С – 20 сек., финальная элонгация при 72°C в течение 10 минут. Относительную экспрессию TLR2-4 определяли с использованием метода $\Delta\Delta$ Сt и нормализовывали на уровень экспрессии β -актина.

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России (выписка из протокола №11 от 14 октября 2015г.). Все пациенты, включенные в исследование, подписывали информированное согласие.

Статистический анализ

Статистический анализ проведен в программном пакете Statistica 13 (Tibco, США).

Описательная статистика количественных данных представлена медианами, первым и третьим квартилями в виде Ме [Q1; Q3], качественных в виде абсолютных и относительных частот.

Сравнение двух независимых групп для количественных данных выполнялось с помощью критерия Манна-Уитни (U-тест), трех и более групп с помощью критерия Краскела-Уоллиса с дальнейшим post-hoc анализом. Частоты качественных признаков сравнивались между собой с помощью критерия χ 2 и двустороннего точного критерия Фишера.

Корреляционный анализ выполнялся с помощью метода корреляции Спирмена.

Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез принят равным 0,05. При множественных сравнениях применялась поправка Бонферрони путем коррекции критического уровня значимости. Значения между новым критическим уровнем значимости и 0,05 интерпретировались, как статистическая тенденция.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Клиническая характеристика исследуемых пациентов

Анализ антропометрических параметров исследуемых

Всего в исследование было включено 87 человек: 15 (17%) пациентов без НАЖБП, 23 (26%) пациентов со стеатозом, 49 (56%) пациентов с НАСГ. Три группы пациентов были сопоставимы по основным антропометрическим характеристикам.

В таблице 7 отражены результаты сравнительного анализа групп пациентов, включенных в исследование, по демографическим и антропометрическим характеристикам.

Таблица 7. Сравнительный анализ участников исследования по демографическим и

антропометрическим параметрам (n=87).

Признак	Без НАЖБП (n=15) Ме [Q1; Q3] (группа 1)	Cmeamo3 (n=23) Me [Q1; Q3] (группа 2)	НАСГ (n=49) Ме [Q1; Q3] (группа 3)	р, критерий Краскела- Уоллиса	p, post-hoc
Пол (М/Ж)	8 (53%)/ 7 (47%)	17 (74%)/ 6 (26%)	20 (41%)/ 29 (59%)	0,032	p ₁₋₂ =0,573 p ₁₋₃ =1,000 p ₂₋₃ =0,026
Возраст, лет	52 [37; 55]	45 [43; 53]	49 [42; 56]	0,724	
Масса тела (кг)	104,9 [90; 110]	98 [89,6; 106,4]	96 [88; 109]	0,701	
$ИМТ$ (кг/ M^2)	33,4 [31,5; 35,5]	32,3 [30,4; 34,6]	34,8 [31,6; 38]	0,290	
ОТ (см)	110 [104; 110]	107 [102; 112]	108 [103; 112]	0,590	
ОБ (см)	110 [108; 113]	106 [105; 115]	111 [106; 117]	0,303	
ОТ/ОБ	0,97 [0,91; 1,00]	0,96 [0,94; 1,02]	0,96 [0,94; 1,01]	0,674	

Примечания: Поправка Бонферрони P₀=0,05/53=0,001

 ${\rm HA}{\rm W}{\rm F}{\rm \Pi}$ — неалкогольная жировая болезнь печени; ${\rm HAC}{\rm \Gamma}$ — неалкогольный стеатогепатит; ${\rm M}$ — мужчины; ${\rm W}$ — женщины; ${\rm UMT}$ — индекс массы тела; ${\rm OT}$ — окружность талии; ${\rm OF}$ — окружность бедер; ${\rm OT}/{\rm OF}$ — отношение объема талии к объему бедер.

Особенности биохимических показателей

При анализе биохимических показателей воспаления: показатель АЛТ повышен у 4 (27%) пациентов в группе без НАЖБП, у 6 (26%) в группе стеатоза, у 26 (53%) в группе НАСГ; показатель АСТ повышен у 5 (33%) пациентов в группе без НАЖБП, у 6 (26%) в группе стеатоза, у 26 (53%) в группе НАСГ. Показатель гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) повышен у 4 (27%) пациентов в группе без НАЖБП, у 11 (48%) в группе стеатоза, у 19 (39%) в группе НАСГ; показатель щелочной фосфатазы повышен у 2 (13%) пациентов в группе без НАЖБП, у 7 (30%) в группе стеатоза, у 4 (8%) в группе НАСГ; показатель общего билирубина повышен у 7 (47%) пациентов в группе без НАЖБП, у 4 (17%) в группе стеатоза, у 3 (6%) в группе НАСГ. Гиперферритинемия регистрировалась у 4 (27%) пациентов в группе без НАЖБП, у 7 (30%) в группе стеатоза, у 17 (35%) в группе НАСГ, при дополнительном анализе показателей обмена железа и генетическом исследовании был исключен наследственный гемохроматоз.

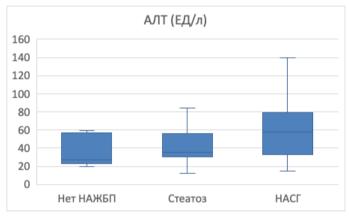
При оценке липидного спектра выявлены следующие изменения: показатель общего холестерина повышен у 13 (87%) пациентов в группе без НАЖБП, у 16 (70%) в группе стеатоза, у 33 (67%) в группе НАСГ; показатель триглицеридов повышен у 4 (27%) пациентов в группе без НАЖБП, у 15 (65%) в группе стеатоза, у 28 (57%) в группе НАСГ; ЛПВП в пределах референсного интервала/выше референсного интервала у всех пациентов в группе без НАЖБП, у 4 человек (17%) снижен показатель ЛПВП в группе пациентов стеатоза, у 12 человек (24%)

снижен показатель ЛПВП в группе НАСГ.

При оценке пуринового обмена выявлены следующие изменения: показатель мочевой кислоты повышена у 4 (27%) пациентов в группе без НАЖБП, у 5 (22%) в группе стеатоза, у 17 (35%) в группе НАСГ.

При оценке почечной функции, кальциевого обмена, признаков воспаления (общий анализ крови), функции щитовидной железы значимых изменений выявлено не было.

С учетом поправки Бонферрони различия на уровне статистических тенденций наблюдаются по следующим показателям: АЛТ – показатель выше в группе пациентов с НАСГ, чем в группе пациентов с отсутствием НАЖБП (рис. 2) АСТ – показатель выше в группе пациентов с НАСГ, чем в группе пациентов со стеатозом (рис. 3); общий холестерин – показатель ниже в группе пациентов с НАСГ, чем в группе пациентов со стеатозом; триглицериды – показатель выше в группе пациентов со стеатозом, чем в группе пациентов с отсутствием НАЖБП.

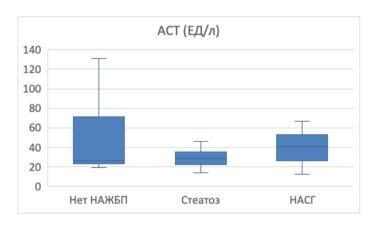


p=0,016 P₀=0,001

Рисунок 2. Сравнительный анализ групп пациентов с НАЖБП, стеатозом и НАСГ по показателю АЛТ (n=87)

Примечания:

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ – неалкогольный стеатогепатит



p=0.040 $P_0=0.001$

Рисунок 3. Сравнительный анализ групп пациентов с НАЖБП, стеатозом и НАСГ по показателю АСТ (n=87)

Примечания:

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ – неалкогольный стеатогепатит

2. Результаты проведенных исследований

Анализ углеводного обмена и инсулинорезистентности

У пациентов без НАЖБП у 7 (47%) не диагностировано нарушений углеводного обмена, у 6 (40%) диагностирован предиабет, у 2 (13%) — СД2; у пациентов со стеатозом у 9 (39%) не диагностировано нарушений углеводного обмена, у 6 (26%) диагностирован предиабет, у 8 (35%) — СД2; у пациентов с НАСГ у 12 (24%) не диагностировано нарушений углеводного обмена, у 14 (29%) диагностирован предиабет, у 23 (47%) — СД2.

При проведении сравнительного анализа групп без НАЖБП, стеатоза, НАСГ с учетом поправки Бонферрони различий по распространенности различных нарушений углеводного обмена не наблюдается (рис. 4).

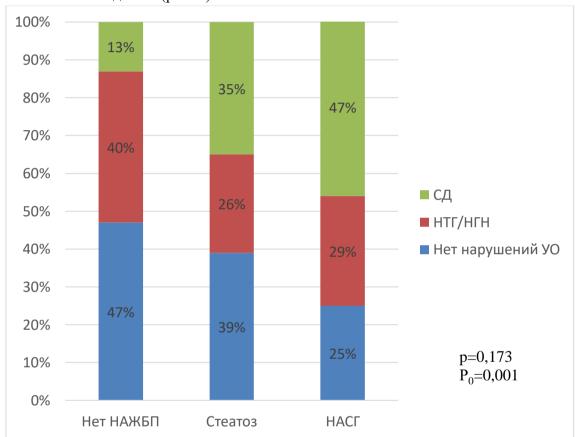


Рисунок 4. Сравнительный анализ групп пациентов с без НАЖБП, стеатозом и НАСГ по нарушениям углеводного обмена (n=87)

Примечания: Поправка Бонферрони Р₀=0,05/54=0,001

СД – сахарный диабет, НТГ – нарушенная толерантность к глюкозе, НГН – нарушенная гликемия натощак, УО – углеводный обмен

При оценке ИР с учетом поправки Бонферрони статистические значимые различия наблюдаются по М-индексу — в группе пациентов с отсутствием НАЖБП статистически значимо выше показатель М-индекса, чем в группах пациентов со стеатозом и НАСГ. Однако значимых различий в группе пациентов со стеатозом и в группе пациентов с НАСГ обнаружено не было.

С учетом поправки Бонферрони статистические значимые различия наблюдаются по данным математической модели гомеостаза глюкозы HOMA-IR – в группе пациентов с НАСГ статистически значимо выше показатель HOMA-IR, чем в группе пациентов со стеатозом и отсутствием НАЖБП.

Учитывая полученные данные, можно сделать вывод, что ИР выявлена во всех исследуемых группах, как по данным гиперинсулинемического эугликемического клэмп-

теста, так и по данным математической модели гомеостаза глюкозы HOMA-IR (показатели более 2,77). Выявлены статистически значимые различия по ИР в группе без НАЖБП по сравнению с НАСГ и со стетозом (табл.8).

Таблица 8. Сравнительный анализ групп пациентов со стеатозом, НАСГ и без НАЖБП по параметрам инсулинорезистентности (n=87).

Признак	Без НАЖБП (n=15) Ме [Q1; Q3] (группа 1)	Стеатоз (n=23) Me [Q1; Q3] (группа 2)	НАСГ (n=49) Ме [Q1; Q3] (группа 3)	р, критерий Краскела -Уоллиса	p, post- hoc
М-индекс (мг/кг/мин)	5,6 [3,3; 6,9]	2,7 [1,5; 3,7]	2,3 [1,4; 3,4]	<0,001	p ₁₋₂ = 0,018 p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ =0,895
HOMA-IR	3,5 [2,38; 4,24]	3,4 [2,64; 4,98]	8 [4,25; 11,62]	<0,001	p ₁₋₂ =1,000 p ₁₋₃ = 0,001 p ₂₋₃ < 0,001

Примечания: Поправка Бонферрони Р₀=0,05/51=0,001

 $HAЖБ\Pi$ — неалкогольная жировая болезнь печени; $HAC\Gamma$ — неалкогольный стеатогепатит; Миндекс — индекс инсулинорезистентности; HOMA-IR — индекс инсулинорезистентности (Homeostasis model assessment of insulin resistance)

Показатели М-индекса и HOMA-IR обладают статистически значимой отрицательной умеренной корреляцией (рис.5).

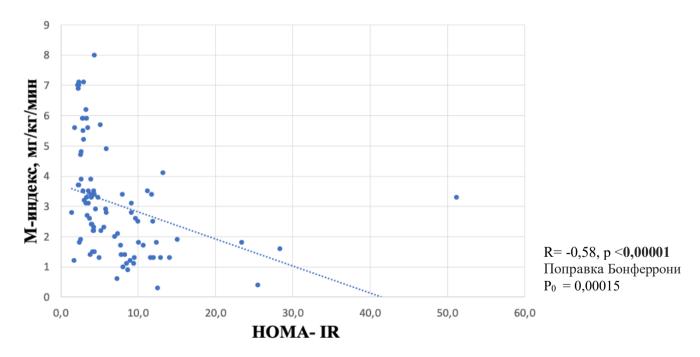


Рисунок 5. Корреляционный анализ М-индекса и HOMA-IR всей группы пациентов (n=87) *Примечания:* Поправка Бонферрони $P_0 = 0.05/331 = 0.00015$ HOMA-IR — индекс инсулинорезистентности (Homeostasis model assessment of insulin resistance); М-индекс — индекс инсулинорезистентности.

Отсутствие ИР и легкая степень ИР статистически значимо чаще у пациентов с отсутствием НАЖБП по сравнению с группами пациентов со стеатозом и НАСГ, тяжелая степень ИР, напротив, встречается реже у пациентов с отсутствием НАЖБП (рис. 6).

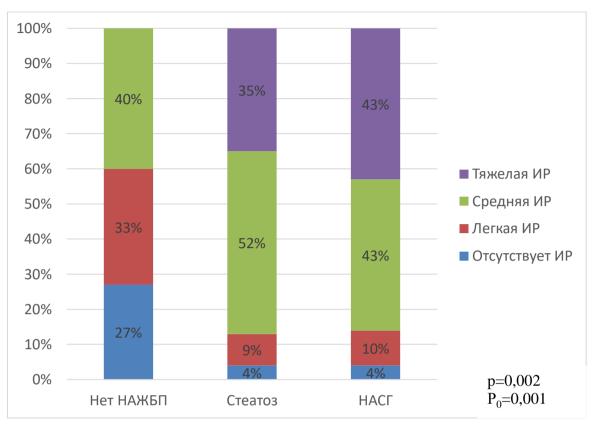


Рисунок 6. Сравнительный анализ групп пациентов с НАЖБП, стеатозом и НАСГ по степени ИР (n=87)

Примечания: Поправка Бонферрони Р₀=0,05/51=0,001

 ${
m HAЖБ\Pi}$ — неалкогольная жировая болезнь печени; ${
m HAC\Gamma}$ — неалкогольный стеатогепатит; ${
m HP}$ — инсулинорезистентность

Анализ композиционного состава тела

При сравнении общей массы жировой ткани выявлены различия на уровне тенденции между тремя исследуемыми группами, при попарном сравнении показатель общего процента жира выше у пациентов с НАСГ по сравнению с пациентами со стеатозом (табл.9).

Таблица 9. Сравнительный анализ композиционного состава тела групп пациентов без НАЖБП, стеатозом и НАСГ (n=87)

Признак	Без НАЖБП (n=15) Ме [Q1; Q3] (группа 1)	Стеатоз (n=23) Me [Q1; Q3] (группа 2)	НАСГ (n=49) Ме [Q1; Q3] (группа 3)	р, критерий Краскела -Уоллиса	p, post-hoc
Общий	37,1 [31,1; 40,0]	32,5 [30,3; 37,1]	38,7 [35,5; 41,0]	0,005	p ₁₋₂ =0,347 p ₁₋₃ =0,933
процент жира (%)	40,0]	37,1]	41,0]		p ₁₋₃ =0,933 p ₂₋₃ =0,003

Примечания: Поправка Бонферрони $P_0=0.05/54=0.001$

 ${
m HAЖБ\Pi}$ — неалкогольная жировая болезнь печени; ${
m HAC\Gamma}$ — неалкогольный стеатогепатит; ${
m HP}$ - инсулинорезистентность

Анализ данных гистологического исследования биоптатов печени

При оценке степени активности процесса: в группе пациентов без НАЖБП минимальное воспаление выявлено (ИГА от 0 до 3 баллов по Knodell) у 11 пациентов (73%), у 4 пациентов (27%) – слабовыраженная степень гистологической активности (ИГА от 4 до 8 баллов по Knodell), умеренное воспаление выявлено не было (0%) (ИГА от 9 до 12 баллов по Knodell); в группе пациентов со стеатозом минимальное воспаление выявлено (ИГА от 0 до 3 баллов по Knodell) у 18 пациентов (78%), у 4 пациентов (17%) – слабовыраженная степень гистологической активности (ИГА от 4 до 8 баллов по Knodell), у 1 пациента (4%) результаты соответствовали умеренному воспалению (ИГА от 9 до 12 баллов по Knodell); в группе пациентов с НАСГ минимальное воспаление выявлено (ИГА от 0 до 3 баллов по Knodell) у 35 пациентов (71%), у 12 пациентов (24%) – слабовыраженная степень гистологической активности (ИГА от 4 до 8 баллов по Knodell), у 2 пациентов (4%) результаты соответствовали умеренному воспалению (ИГА от 9 до 12 баллов по Knodell). Стеатоз гепатоцитов был обнаружен в группе пациентов без НАЖБП у 4 пациентов (27%), в группе пациентов со стеатозом у 23 пациентов (100%), в группе пациентов с НАСГ у 49 пациентов (100%). Фиброз печени по Ishak выявлен у 3 пациентов (5 баллов) -3,4%, у 2 пациентов (4 балла) -2,3%, у 1 пациента (3 балла) -1,1%, у 6 пациентов (2 балла) -6.9%, у 73 пациентов (1 балл) -83.9%, у 2 пациентов (2,3%) не выявлено фибротических изменений. Фиброз печени по Metavir выявлен у 3 пациентов (4 балла) – 3,4%, у 2 пациентов (3 балла) -2,3%, у 5 пациентов (2 балла) -5,7%, у остальных пациентов -1 балл по шкале Metavir.

Анализ данных ультразвукового исследования и эластографии сдвиговой волны

При проведении УЗИ органов брюшной полости у 15 (17%) пациентов не выявлено признаков НАЖБП, у 72 (83%) пациентов диагностирована НАЖБП. Признаков объемных образований печени у пациентов не выявлено.

Значимых различий по данным эластографии сдвиговой волны между исследуемыми группами не выявлено. Соотношение стадий фиброза печени по шкале Metavir на основании результатов эластографии представлено следующим образом: в группе пациентов без НАЖБП F1 y 15 пациентов (100%); в группе пациентов со стеатозом F1 y 21 пациента (91%), F2 y 1 пациента (4%), F3 y 1 пациента (4%); в группе пациентов с НАСГ F1 y 41 пациента (84%), F2 y 4 пациентов (8%), F3 y 1 пациента (2%), F4 y 3 пациентов (6%).

Корреляционный анализ данных гистологического исследования и данных эластографии сдвиговой волны

С учетом поправки Бонферрони P_0 =0,000064 положительные корреляции на уровне статистических тенденций установлены между показателем «фиброз (Metavir)» и показателями «эластография (кПа)», «эластография (стадия фиброза)» (табл. 10).

Таблица 10. Корреляционный анализ показателей фиброза и эластографии в группе пациентов с НАЖБП, стеатозом и НАСГ (n=87)

Признаки	N	r	р, метод Спирмена	Примечание
Фиброз (Metavir) & Эластография, кПа	87	0,53	<0,0001	Положительная умеренная корреляция
Фиброз (Metavir) & Эластография, (стадия фиброза)	87	0,74	<0,0001	Положительная умеренная корреляция

Примечания: Поправка Бонферрони P₀=0,05/2=0,025 кПа – килопаскаль, единица измерения эластичности.

3. Изучение взаимосвязей различных параметров

Оценка влияния массы тела на стадию НАЖБП

При оценке влияния массы тела на степень развития НАЖБП до более тяжелых стадий статистически значимых различий не выявлено, можно предположить об отсутствии влияния увеличения массы тела (вплоть до морбидного) на тяжесть течения НАЖБП (рис.7).

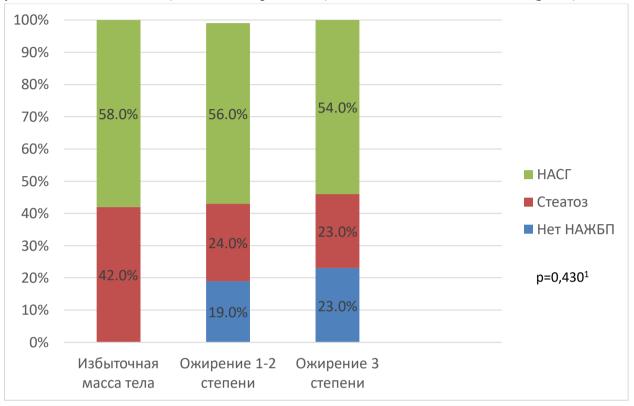


Рисунок 7. Сравнительный анализ групп с различными степенями ожирения по частоте стадий НАЖБП (n=87).

¹Точный критерий Фишера

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ – неалкогольный стеатогепатит

Ассоциация нарушений углеводного обмена и НАЖБП

При оценке влияния нарушения углеводного обмена (или его отсутствия) на степень развития НАЖБП до более тяжелых стадий статистически значимых различий не выявлено, можно предположить об отсутствии значимой разницы во встречаемости различных нарушений углеводного обмена в изучаемых группах (табл.11).

Таблица 11. Сравнительный анализ групп пациентов без нарушения углеводного обмена, НТГ/НГН, СД по частоте стадий НАЖБП (n=87)

Признак		Нет нарушений УО (n=28) n (%)	HTF/HFH (n=26) n (%)	СД (n=33) n (%)	р, критерий χ ²	p, post- hoc
Наличие/отсутствие НАЖБП	Нет НАЖБП	7 (25%)	6 (23%)	2 (6%)		
	Стеатоз	9 (32%)	6 (23%)	8 (24%)	0,173	-
	НАСГ	12 (43%)	14 (54%)	23 (70%)		

Примечания: Поправка Бонферрони $P_0=0.05/3=0.017$

НАЖБП — неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ — неалкогольный стеатогепатит; НТГ — нарушенная толерантность к глюкозе; НГН — нарушенная гликемия натощак; СД — сахарный диабет

Изучение взаимосвязей между антропометрическими параметрами, параметрами углеводного и липидного обмена, и морфологической картиной печени у пациентов с НАЖБП и без.

При оценке морфологической картины мы использовали следующие параметры:

- 1) шкалу оценки активности заболевания NAS (баллы по NAS), которая оценивается в баллах и включает в себя оценку степени стеатоза (в баллах), лобулярного воспаления (в баллах), баллонной дистрофии (в баллах). Также в шкалу оценки активности заболевания NAS входит оценка стадии фиброза (фиброз NAS);
- 2) ИГА (Knodell) метод ранговой оценки степени выраженности воспаления, некроза и фиброза печени оценивается в баллах;
- 3) фиброз оценивался по нескольким шкалам фиброз (Metavir), фиброз (Ishak), фиброз (NAS). Первые две шкалы представлены в баллах, третья по стадиям;
- 4) стеатоз гепатоцитов оценивался в процентах (по Brunt), также в зависимости от процентного содержания жира выделены следующие степени S0 стеатоз менее 10%, S1 стеатоз более 10%, S2 стеатоз более 33%, S3 стеатоз более 66% гепатоцитов.

При проведении корреляционного анализа между антропометрическими параметрами и морфологическими изменениями печени при НАЖБП у всех обследованных пациентов (n=87), были выявлены взаимодействия на уровне тенденций.

При проведении корреляционного анализа между параметрами липидного обмена и морфологическими изменениями печени при НАЖБП, были выявлены взаимодействия на уровне тенденций.

При проведении корреляционного анализа между параметрами углеводного обмена и морфологическими изменениями печени при НАЖБП, были выявлены следующие взаимодействия: статистически значимые корреляции между показателем ИРИ и баллонной дистрофией; показателем ИРИ и шкалой активности НАЖБП (NAFLD Activity Score) (табл.12).

Таблица 12. Корреляционный анализ параметров углеводного обмена и показателей морфологических параметров всей группы пациентов (n=87)

Признаки	N	r	р, метод Спирмена	Примечание
ИРИ (мкЕД/мл) & Баллы по NAS	87	0,44	0,000017	Положительная
				умеренная корреляция
ИРИ (мкЕД/мл) & Баллонная	87	0,45	0,000011	Положительная
дистрофия				умеренная корреляция

Примечания: Поправка Бонферрони $P_0=0.05/313=0.00015$

ИРИ – иммунореактивный инсулин; $И\Gamma A$ – индекс гистологической активности; NAS – NAFLD activity score – шкала активности $HAЖБ\Pi$.

При проведении корреляционного анализа между показателями ИР и морфологическими изменениями печени при НАЖБП статистически значимая корреляция выявлена между HOMA-IR и баллами по шкале активности НАЖБП (NAFLD Activity Score) и показателем баллонной дистрофии (рис. 8, 9), (табл.13). Ассоциации на уровне статистической тенденции были выявлены следующие: отрицательная умеренная корреляция М-индекса и % стеатоза; М-индекса и степени стеатоза; М-индекса и баллов по NAS; М-индекса и фиброза по классификации Ishak. Отрицательная слабая корреляция обнаружена у показателей М-индекса и лобулярного воспаления; М-индекса и баллонной дистрофии. Положительная умеренная корреляция наблюдается между показателями HOMA-IR и фиброзом (Ishak), HOMA-IR и

процентом стеатоза, степенью стеатоза. Положительные слабые корреляции обнаружены между показателями HOMA-IR и фиброзом (Metavir), NAS.

Таблица 13. Корреляционный анализ М-индекса, НОМА-индекса и показателей

морфологических параметров всей группы пациентов (n=87)

Признаки	N	r	р, метод Спирмена	Примечание
HOMA- IR & Баллы по NAS	87	0,42	0,000042	Положительная умеренная корреляция
HOMA-IR & Баллонная дистрофия	87	0,40	0,000109	Положительная умеренная корреляция

Примечания: Поправка Бонферрони $P_0=0.05/313=0.00015$

HOMA-IR — индекс инсулинорезистентности (Homeostasis model assessment of insulin resistance); NAS — NAFLD activity score — шкала активности $HAЖБ\Pi$; M-индекс — индекс инсулинорезистентности

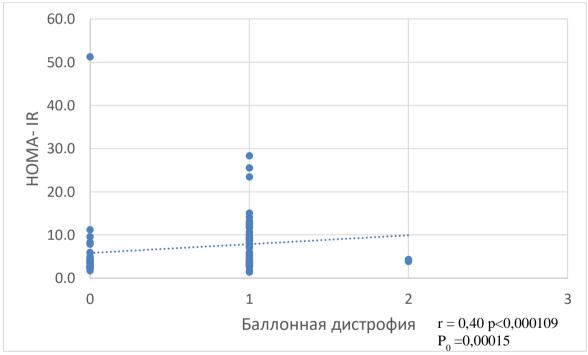


Рисунок 8. Корреляционный анализ HOMA-IR и показателя баллонной дистрофии (n=87) *Примечания:* HOMA-IR – индекс инсулинорезистентности (Homeostasis model assessment of insulin resistance)

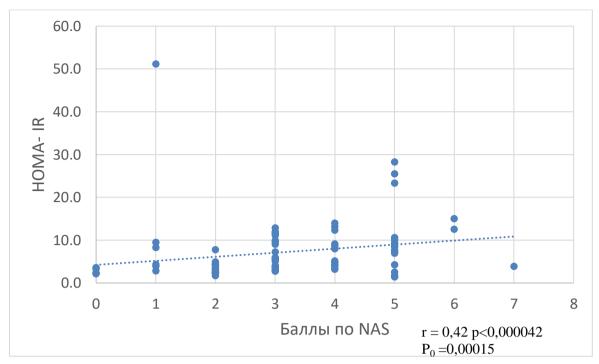


Рисунок 9. Корреляционный анализ НОМА-индекса и степени активности НАЖБП (n=87) *Примечания:* HOMA-IR – индекс инсулинорезистентности (Homeostasis model assessment of insulin resistance), NAS – NAFLD activity score – шкала активности НАЖБП.

Анализ показателей органокинов в различных исследуемых группах

При анализе органокинов у пациентов в группах «без НАЖБП», «стеатоз», «НАСГ» с учетом поправки Бонферрони различия на уровне статистических тенденций наблюдаются по показателям HFREP1 — в группе пациентов со стеатозом выше показатель HFREP1, чем в группе пациентов с отсутствием НАЖБП; гиалуроновая кислота — в группе пациентов с НАСГ выше показатель гиалуроновой кислоты, чем в группе пациентов со стеатозом; лептин — в группе пациентов с НАСГ выше показатель лептина, чем в группе пациентов со стеатозом. При анализе показателя бетатрофина выявлены статистические тенденции к различиям между группами, однако при попарном сравнении различий между группами не обнаружено.

При сравнении пациентов с различной степенью ИР по уровню органокинов выявлены различия на уровне статистических тенденций по показателям: адипонектин — в группе пациентов с тяжелой степенью ИР ниже показатель адипонектина, чем в группе пациентов с отсутствием ИР; резистин — в группе пациентов с тяжелой степенью ИР ниже показатель резистина, чем в группе пациентов с отсутствием ИР. При сравнении групп с различной степенью ИР показатель РШПР оказался статистически значимым, однако при попарном сравнении групп статистически значимые различия не обнаружены.

Статистически значимые различия наблюдались по показателю: ангиопоэтинподобный белок – в группе пациентов без нарушений УО показатель ангиопоэтинподобного белка выше, чем в группах пациентов с НТГ/НГН и СД (табл. 14).

Различия на уровне статистических тенденций наблюдаются по следующим показателям: фетуин A — в группе пациентов с НТГ/НГН выше показатель фетуина A, чем в группе пациентов без нарушений углеводного обмена; гиалуроновая кислота — в группе пациентов с СД выше показатель гиалуроновой кислоты, чем в группе пациентов с НТГ/НГН; адипонектин — в группе пациентов с СД ниже показатель адипонектина, чем в группе пациентов без нарушений углеводного обмена; резистин — в группе пациентов с СД ниже показатель резистина, чем в группе пациентов без нарушений углеводного обмена.

Таблица 14. Сравнительный анализ органокинов в группах нарушений углеводного обмена (n=87).

Признак	Нет нарушений УО (n=28) Ме [Q1; Q3]	ΗΤΓ/ΗΓΗ (n=26) Me [Q1; Q3]	СД (n=33) Me [Q1; Q3]	p	p, post- hoc
Ангиопоэтин- подобный белок нг/мл	3,455 [2,015; 6,325]	0,79 [0,71; 1,87]	1,73 [1,09; 2,56]	<0,0011	p ₁₋₂ <0,001 p ₁₋₃ =0,020 p ₂₋₃ =0,185

Примечания: 1 Критерий Краскела-Уоллиса

Поправка Бонферрони $P_0=0,05/21=0,002$

4. Молекулярно-биологическая часть исследования Результаты экспрессии FXR методом Вестерн-блот

Анализ количества белка FXR в биоптатах печени проводили методом Вестерн-блот. Было показано, что в лизате биоптата печени присутствует множество изоформ белка FXR (рис. 10), однако ввиду малого количества белка FXR в лизате биоптата печени и отсутствия коммерчески доступных высокоспецифичных антител к нему полуколичественная оценка экспрессии FXR данным методом невозможна. Был сделан вывод, что в дальнейшем метод Вестерн-блот целесообразно использовать лишь при обнаружении значительных отличий в экспрессии FXR на уровне мРНК методом ПЦР в реальном времени.

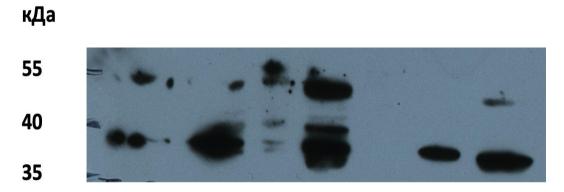


Рисунок 10. Экспрессия FXR в цитоплазматической фракции клеток печени, оцененная методом Вестерн-блот.

Результаты экспрессии FXR при помощи ПЦР в реальном времени

Далее для оценки экспрессии в набранной выборке биоптатов печени проанализирована экспрессия FXR на уровне мРНК методом ПЦР в реальном времени, количество полученных биоптатов – 60.

В выборке из 60 пациентов, уровень экспрессии FXR не различался между тремя исследуемыми группами (пациенты без НАЖБП, со стеатозом и НАСГ (рис.11).

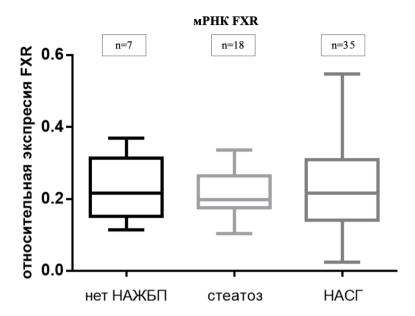


Рисунок 11. Уровень относительной экспрессии мРНК NR1H4 (FXR) в группах пациентов с различными стадиями НАЖБП.

В то же время, у ряда пациентов с НАСГ наблюдался атипично высокий (по сравнению с межквартильным диапазоном во всех трех группах) уровень относительной экспрессии FXR. Эти пациенты не вносили существенного вклада в изменение среднего значения экспрессии FXR (и, соответственно, не приводили к значительным межгрупповым различиям). Тем не менее, это позволило нам выделить в группе пациентов с НАСГ подгруппы с высокой и низкой экспрессией FXR.

При анализе связи экспрессии FXR в образцах биопсии печени с клиническими и лабораторными параметрами у пациентов с НАСГ обнаружена статистически значимая связь экспрессии мРНК FXR в печени с сывороточным ИРИ (коэффициент корреляции $0,44, p = 0,022, P_0=0,025$) (рис.12). Биологическое и клиническое значение обнаруженного явления требует дальнейшего изучения.

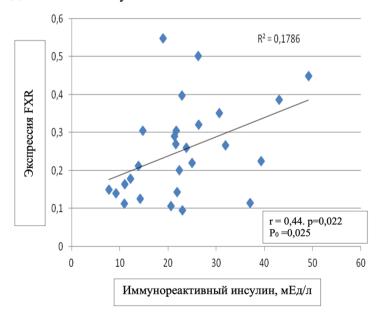


Рисунок 12. Анализ корреляции между экспрессией FXR (ось ординат) и уровнем иммунореактивного инсулина (ось абсцисс) у пациентов с НАСГ.

Была также изучена возможная связь между экспрессией FXR и выраженностью ИР (М-индекс), однако ассоциации между данными параметрами выявлено не было.

Результаты экспрессии FXR при помощи иммуногистохимического исследования

Также в нашей работе для оценки экспрессии FXR был проведен иммуногистохимический анализ. Ввиду того, что парафиновые блоки биопсии печени содержат малое количество материала, а также используются для рутинной оценки тяжести НАЖБП и фиброза, нами был получены парафиновые блоки для 22 пациентов из выборки.

При проведении иммуногистохимического анализа (рис. 13) экспрессии FXR наличие специфического окрашивания ядер антителами против FXR было продемонстрировано для всех проанализированных образцов, однако полуколичественный анализ уровня экспрессии FXR не был успешным из-за небольшого количества образцов, а также из-за сложности его оценки из-за наличия краевого окрашивания. Поскольку срезы образцов биопсии печени довольно малы и часто характеризуются многочисленными краевыми повреждениями, невозможно достоверно оценить вклад краевого окрашивания в общую картину.

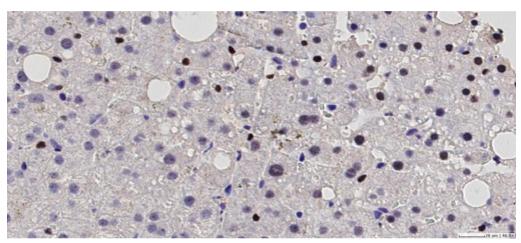


Рисунок 13. Иммуногистохимическое окрашивание биопсий печени пациентов с различными стадиями НАЖБП при помощи антител, специфичных к FXR.

Результаты экспрессии толл-подобных рецепторов и провоспалительных цитокинов

Поскольку воспаление, сопровождающее прогрессию НАЖБП, может быть связано с сигналингом толл-подобных рецепторов, нами было проведено исследование экспрессии этих рецепторов, а также провоспалительных цитокинов в пробах печени пациентов. Был проведен анализ экспрессии трех Толл-подобных рецепторов - TLR2, TLR3, TLR4, а также провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в пробах печени больных НАЖБП. Экспрессия всех Толл-подобных рецепторов увеличивается в ходе прогрессии заболевания (рис.14). Статистически значимые различия наблюдаются между группой с НАСГ и контролем для всех исследуемых рецепторов. В то же время, различия между двумя стадиями НАЖБП, НАСГ и стеатозом, являются статистически значимыми для TLR3 и TLR4; в случае TLR2 такая тенденция прослеживается, однако не является статистически значимой.

Статистически значимых различий между уровнями экспрессии провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах печени пациентов НАЖБП и контрольными пробами показать не удалось (рис.15).

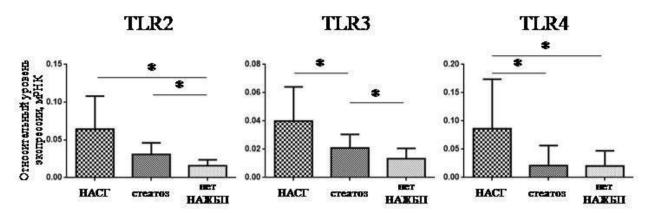


Рисунок 14. Уровень относительной экспрессии мРНК толл-подобных рецепторов TLR2, TLR3, TLR4 в биоптатах печени с НАЖБП (НАСГ, n=10, стеатоз, n=10) и контрольных образцах (n=4). *p<0.05 по U-критерию Манна-Уитни.

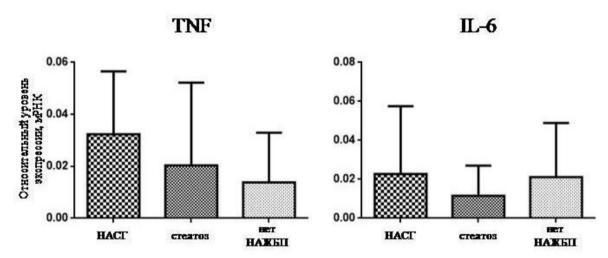


Рисунок 15. Уровень относительной экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах печени с НАЖБП (НАСГ, n=10, стеатоз, n=10) и контрольных образцах (n=4). *p<0.05 по U-критерию Манна-Уитни.

ВЫВОДЫ

- 1. Чувствительность к инсулину вносит вклад в развитие и прогрессирование морфологически подтвержденной НАЖБП: степень инсулинорезистентности выражена сильнее у пациентов с более тяжелыми формами НАЖБП. Подтверждена статистически значимая корреляция (r= -0,58, p<0,00001) показателей чувствительности к инсулину, полученных при использовании клэмп-метода (М-индекс) и на основании математической модели гомеостаза глюкозы (HOMA-IR).
- 2. При начальных нарушениях углеводного обмена, таких как предиабет и впервые выявленный СД2, не обнаружено влияния уровня гликемического контроля на развитие НАЖБП.
- 3. Показатель эластичности печени по данным эластографии сдвиговой волны коррелирует с показателем фиброза печени по Metavir по данным пункционной биопсии печени (r=0,53, p<0,0001), что предполагает высокую диагностическую значимость данного неинвазивного метода для верификации диагноза фиброза печени.
- 4. Экспресия фарнезоидных X рецепторов, оказывающих роль на липидный и углеводный обмен, не зависит от степени тяжести НАЖБП. Однако, их экспрессия в печени взаимосвязана с концентрацией иммунореактивного инсулина (r = 0,44, p = 0,022), что может свидетельствовать о роли фарнезоидных X рецепторов в развитии инсулинорезистентности у пациентов с неалкогольным стеатогепатитом.
- 5. Экспрессия толл-подобных рецепторов (TLR2, TLR3 и TLR4) увеличивается в ходе прогрессирования НАЖБП (p<0,05). Морфологические показатели поражения печени, такие как показатель стеатоза (по Brunt), степень гистологической активности и баллонной дистрофии, статистически значимо коррелируют с увеличением экспрессии толл-подобных рецепторов (p<0,05), что говорит о патогенетической роли воспалительных сигнальных путей в развитии заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. Пациентам со сниженной чувствительностью к инсулину рекомендовано проведение УЗИ брюшной полости и эластографии печени для выявления стеатоза и фиброза.
- 2. Пациенты с подтвержденным диагнозом НАЖБП должны пройти обследование на выявление нарушений углеводного обмена.

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

- 1. Bogolyubova A., Mishina E., Belousov P., Bogomolov P., Matsievich M., Kokina K., Mayorov A. Farnesoid X receptor mRNA expression in non-alcoholic fatty liver disease is inversely associated with the severity of liver damage and degree of insulin resistance. FEBS Open Bio. 2018;8(Suppl 1):282.
- 2. Боголюбова А.В., Мишина Е.Е., Богомолов П.О., Мациевич М.В., Кокина К.Ю., Майоров А.Ю., Белоусов П.В. экспрессия Toll-подобных рецепторов TLR2, TLR3, TLR4 и провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в биоптатах пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. Медицинская иммунология. 2019;21(5):945-952.
- 3. Богомолов П.О., Кокина К.Ю., Майоров А.Ю., Мишина Е.Е. Генетические аспекты неалкогольной жировой болезни печени. Вопросы современной педиатрии. 2018;17(6):442-448.
- 4. Мишина Е.Е., Майоров А.Ю., Боголюбова А.В., Богомолов П.О., Мациевич М.В., Кокина К.Ю. Взгляд на новые терапевтические возможности у больных с неалкогольной жировой болезнью печени. Ожирение и метаболизм. 2019;16(3):37-45.
- 5. Богомолов П.О., Буеверов А.О., Древаль А.В., Нечаева О.А., Майоров А.Ю., Мишина Е.Е., Федосьина Е.А., Коблов С.В., Сумцова О.В., Джаллоу А., Дубровина Д.А., Трошина Е.А., Комшилова К.А., Арапова М.В., Вачеишвили Н.Г., Люсина Е.О. Предварительные результаты применения дулаглутида у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (исследование ДЕМОС). Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019;(9):4-10.
- 6. Мишина Е.Е., Майоров А.Ю., Богомолов П.О., Люсина Е.О., Буеверов А.О. Ассоциация инсулинорезистентности и неалкогольной жировой болезни печени. Сахарный диабет. 2020. Т. 23. № 5. С. 412-423.
- 7. Маевская М.В., Котовская Ю.В., Ивашкин В.Т., Ткачева О.Н., Трошина Е.А., Шестакова М.В., Бредер В.В., Гейвандова Н.И., Дощицин В.Л., Дудинская Е.Н., Ершова Е.В., Кодзоева Х.Б., Комшилова К.А., Корочанская Н.В., Майоров А.Ю., Мишина Е.Е., Надинская М.Ю., Никитин И.Г., Погосова Н.В., Тарзиманова А.И. и др. Национальный консенсус для врачей по ведению взрослых пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и ее основными коморбидными состояниями. Терапевтический архив. 2022. Т. 94. № 2. С. 216-253.

Список сокращений и условных обозначений

АЛТ - аланинаминотрансфераза

АСТ - аспартатаминотрансфераза

арГПП-1 - агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1

ГГТ - гамма-глутамилтранспептидаза

ИГА – индекс гистологической активности

ИЛ-6 – интерлейкин-6

ИМТ – индекс массы тела

ИР – инсулинорезистентность

ИРИ - иммунореактивный инсулин

ИФА - иммуноферментный анализ

КПГ - конечные продукты гликирования

КТ – компьютерная томография

ЛР – лептинорезистентность

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

М-индекс – индекс инсулинорезистентности

МАЖБП - метаболически-ассоциированная жировая болезнь печени

МРТ – магнитно-резонансная томография

НАЖБП - неалкогольная жировая болезнь печени

НАСГ - неалкогольный стеатогепатит

НТГ – нарушенная толерантность к глюкозе

НГН – нарушенная гликемия натощак

ОТ – окружность талии

ОБ – окружность бедер

ПГТТ - пероральный глюкозотолерантный тест

СД – сахарный диабет

СД2 – сахарный диабет 2 типа

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

ТГ - триглицериды

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

УО - углеводный обмен

ФНО - фактор некроза опухоли

ЩФ – щелочная фосфатаза

ELF - Enhanced Liver Fibrosis

FABP4 – белок, связывающий жирные кислоты 4

FGF21 - фактор роста фибробластов 21

FXR - фарнезоидный X-рецептор

НвА1с – гликированный гемоглобин

HFREP1 — гепассоцин, гепатоцитарный фибриногенподобный белок-RBP4 - ретинолсвязывающий белок-4

HOMA-IR - Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance

гомеостатическая модельная оценки инсулинорезистентности

Human FAS Ligand - человеческий Fas лиганд

NAFLD activity score — NAS - Шкала оценки активности НАЖБП

PIIINP - N-терминальный пропептида проколлаген III

QUICKI - Quantitave Insulin sensitivity Check Index - количественный индекс чувствительности к инсулину

TLR – толл-подобный рецептор

Type I cytoskeletal 18 fragment - цитокератин-18, СК-18