

На правах рукописи

Комар Александра Андреевна

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

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Томск - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, заведующая лабораторией исследований гомеостаза отдела диагностики сердечно-сосудистых заболеваний ФГБНУ "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний"

Груздева Ольга Викторовна

доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной терапии с курсом реабилитации, физиотерапии и спортивной медицины ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Беспалова Инна Давидовна

Ведущая организация: ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита состоится «___» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.068.01 при ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2 С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://ssmu.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

Степень разработанности темы. Известно, что при ожирении в ответ на избыток питательных веществ, в митохондриях печени компенсаторно увеличивается активность β -окисления, цикла Кребса и дыхательной цепи митохондрий [Mello A. H. et al., 2018]. В свою очередь, эти процессы способствуют развитию окислительного стресса и воспаления, что, как следствие, сопровождается формированием стеатоза и стеатогепатита [Sergi D. et al., 2019]. В понятие структурно-функционального состояния митохондрий входят такие показатели, как динамика и биогенез. Динамика митохондрий обусловлена делением и слиянием этих органелл [Yaffe M., 1999], а биогенез включает в себя скоординированную репликацию митохондриальной ДНК (мтДНК) и синтез белков, ответственных за электрон-транспортную цепь митохондрий [Touyz R.M., 2012; Tsiloulis T., Watt M.J., 2015; Bhatti J.S. et al., 2017]. В литературе приводятся противоречивые данные об изменениях динамики митохондрий у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров [Lee K. et

al., 2018; Staňková P. et al., 2020; Takeichi Y. et al., 2021]. При этом имеются достаточно скудные и противоречивые данные о структурных и функциональных изменениях митохондрий ткани печени у человека при ожирении, которые описывают состояние митохондрий, в целом, без конкретизации отдельных компонентов (изменения экспрессии конкретных генов и белков) [Koliaki C. et al., 2015; Trebicka J., Schierwagen R., 2016; Diao L. et al., 2018; Wang J. et al., 2020]. Также в литературе мало описано взаимовлияние плазменных цитокинов и компонентов митохондриального биогенеза, что позволило бы найти новые терапевтические и профилактические мишени в отношении поддержания структурно-функционального статуса митохондрий [Bournat J.C., Brown C.W., 2010; Simões I.C.M. et al., 2018; Rocha M. et al., 2020; Prasun P. et al., 2021]. В связи с этим, для более полного понимания роли митохондрий в патогенезе НАЖБП, необходимо расширенное комплексное изучение экспрессии митохондриальных генов печени при ожирении, а также оценка роли плазменных факторов в этом процессе.

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

В рамках указанной цели ставились следующие **задачи:**

1. Оценить показатели структурно-функционального состояния митохондрий (содержание мтДНК, экспрессию митохондриальных генов *TFAM*, *SOD1*, *MFN2*, *MT-ND4*, *BAX*, *NF-κβ1*, *DNM1L* и концентрацию кодируемых ими белков) во взаимосвязи с морфологическими изменениями в печени при неалкогольной жировой болезни печени у больных с ожирением и сахарным диабетом 2 типа и без него.
2. Проанализировать взаимосвязь структурно-функционального состояния митохондрий клеток печени с содержанием медиаторов sLIGHT/TNFSF14, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra в крови при неалкогольной жировой болезни печени у больных с ожирением и сахарным диабетом 2 типа и без него.
3. Выявить общие закономерности и особенности структурно-функциональных нарушений митохондрий клеток печени и изменений плазменной концентрации цитокинов в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени при ожирении в сочетании с сахарным диабетом 2 типа и без него.

Научная новизна. Научную ценность представляют данные об особенностях структурно-функциональных нарушений митохондрий в клетках печени при формировании неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) у больных ожирением и сахарным диабетом (СД) 2 типа. Впервые показано, что у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа рост площади липидных капель в гепатоцитах обеспечивают: высокий уровень экспрессии гена *MT-ND4* (кодирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий) на фоне уменьшения числа копий мтДНК и низкой транскрипции гена *DNM1L* (кодирует деление митохондрий) и его белка DRP1 в ткани печени. Впервые выявлено, что у больных НАЖБП с морбидным ожирением, независимо от состояния углеводного обмена, увеличение площади стеатоза в гепатоцитах коррелирует с низким уровнем экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в ткани печени. Оригинальными являются данные, свидетельствующие, что высокое содержание белка NF-κβ/p65 (компонент неканонического пути NF-κβ) и низкая экспрессия гена *NF-κβ1* (компонент канонического пути NF-κβ) в ткани печени у больных ожирением с НАЖБП без СД 2 типа ассоциированы с менее выраженными показателями площади стеатоза и лимфоцитарной инфильтрации печени.

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

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены знания фундаментального характера о закономерностях и особенностях структурно-функциональных нарушений митохондрий в клетках печени, а также о роли гуморальных факторов в их формировании при неалкогольной жировой болезни печени, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа. Практическая значимость работы обусловлена доказательством причинно-следственных взаимосвязей между структурно-функциональными нарушениями митохондрий с морфологическими изменениями в печени и продукцией цитокинов, которые могут быть использованы для разработки новых методов профилактики и/или лечения неалкогольной жировой болезни печени, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа.

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

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

Основные методы исследования:

1. Комплексное исследование биохимических показателей (оценка углеводного, белкового, пигментного и жирового обменов, определение сывороточных уровней активности печеночных ферментов) методом биохимического анализа.
2. Исследование биоптатов печени (гистологическое исследование).
3. Оценка экспрессии мРНК генов *TFAM*, *SOD1*, *MFN2*, *MT-ND4*, *BAX*, *NF-κβ1*, *DMNIL* в ткани печени методом количественной ПЦР.
4. Исследование содержания белков TFAM, SOD1, MFN2, BAX, NF-κβ/p65, DRP1 в ткани печени методом Western Blotting.
5. Количественная оценка числа мтДНК в ткани печени методом цифровой капельной ПЦР.
6. Определение содержания цитокинов sLIGHT/TNFSF14, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra в плазме крови методом проточной флуориметрии.
7. Статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Увеличение площади стеатоза в гепатоцитах при неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) с ожирением и сахарным диабетом (СД) 2 типа взаимосвязано с высоким уровнем экспрессии гена *MT-ND4*, низкой экспрессией гена

DNM1L и его белка *DRP1*, а также уменьшением числа копий мтДНК в ткани печени и снижением концентрации плазменных факторов *gp130/sIL-6Rb*, *IL-6*, *IL-6RA*, *IL-10* и *sTNFSF14/LIGHT*. При НАЖБП с индексом массы тела (ИМТ) более 40 кг/м² рост площади липидных капель в гепатоцитах опосредован низким уровнем экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в ткани печени независимо от наличия СД 2 типа.

2. У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа установлены менее выраженные проявления стеатоза гепатоцитов и лимфоцитарной инфильтрации печени, сочетающиеся с высокой концентрацией белка *NF-κβ/p65*, низким уровнем экспрессии генов *NF-κβ1* и *BAX* в ткани печени, а также с высоким содержанием цитокинов *gp130/sIL-6Rb*, *IL-6*, *IL-6RA*, *IL-10* и *sTNFSF14/LIGHT* в крови.

3. В патогенезе НАЖБП у больных ожирением с СД 2 типа и без него установлены разнонаправленные изменения структурно-функционального состояния митохондрий в клетках печени и содержания регуляторных медиаторов в крови.

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

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

Публикации

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

Структура и объем диссертации

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

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планирования эксперимента. Результаты получены, проанализированы и обобщены в выводах и положениях автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

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

Таблица 1 - Основные клинические показатели исследуемых групп

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

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

В настоящем исследовании были использованы следующие **критерии включения**: возраст от 18 до 65 лет; поставленный в условиях стационара диагноз - ожирение без нарушений углеводного обмена; поставленный в условиях стационара диагноз – ожирение, ассоциированное с верифицированным диагнозом - СД 2 типа; поставленный в условиях стационара диагноз НАЖБП; диагноз ожирение - не более 10 лет; наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании и использование биологического материала в целях исследования. **К критериям исключения** относились следующие пункты: возраст до 18 лет и после 66 лет; нарушение мозгового кровообращения, острый инфаркт миокарда, заболевания щитовидной железы, аутоиммунные и инфекционные заболевания, воспалительные очаги любой локализации, онкологические и наследственные заболевания, психические заболевания, длительный прием гиполлипидемических препаратов, алкогольная и наркотическая зависимости; больные, которые отказывались от врачебного и лабораторного контроля в ходе исследования.

В анамнезе лиц группы контроля отсутствовали аллергические заболевания, обострения хронических воспалительных процессов, инфекционных заболеваний, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление курением,

алкоголем, наркотическая зависимость. От момента последнего эпизода ОРВИ прошло более двух месяцев. Все обследованные лица этой группы не имели кардиоваскулярной патологии, нарушений углеводного, белкового и липидного обменов.

Материалом исследования являлась венозная кровь (отобранная натощак в вакуумные пробирки с фиолетовой и красной маркировкой Vacuette) и биоптаты печени. Взятие биологического материала (ткань печени) у больных НАЖБП и ожирением, вне зависимости от состояния углеводного обмена, проводили при проведении бариатрических операций (гастрошунтирование или продольная резекция). Биоптаты печени у контрольной группы были взяты при проведении рутинных лапароскопических операций: паховая грыжа справа или слева, бедренная, диафрагмальная и вентральная грыжи, нефроптоз; образцы крови у контрольной группы были получены натощак перед проведением оперативных вмешательств. Перед проведением операции за 36 часов пациенты с ожирением прекращали прием лекарственных препаратов, влияющих на углеводный и липидный обмены.

Измерение биохимических показателей: АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза, Гамма-ГТ, общий белок, глюкоза, триглицериды, холестерин, ЛПВП, ЛПНП, общий и прямой билирубин, С-реактивный белок, гликированный гемоглобин в крови было проведено фотометрическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе Furuno CA-180 («Furuno Electric Company», Япония) с использованием коммерческих тест-систем DiaSys («DiaSys Diagnostic Systems», Германия).

Ткань печени, полученную интраоперационно при инцизионной биопсии из левой доли печени, фиксировали в нейтральном забуференном формалине и далее передавали на гистологическое исследование (создание парафиновых срезов, окрашивание образцов) д.м.н., заведующей лабораторией иммуногистохимии БФУ им. И. Канта, профессору Волковой Л.В. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и анализировали их с помощью микроскопа Leica DM3000 со встроенным программным обеспечением Pannoramic 250 FLASH. Далее, с помощью программного обеспечения Image-J Software, оценивали количественные показатели: площадь липидных капель, количество лимфоцитов в препаратах ткани печени.

Количественное определение цитокинов (sLIGHT/TNFSF14, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra) в крови оценивали методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном на двухлучевом лазерном автоматическом анализаторе (Bio-Plex® 200 Systems, «Bio-Rad», США), используя коммерческие тест-системы (Bio-Plex Pro Human Inflammation Cytokine 37-plex Assay, «Bio-Rad», США). По стандартной кривой (динамический диапазон составлял 2-32 000 пг/мл) определяли концентрацию исследуемых молекул. *Результаты выражали в пг/мл.*

Выделение тотальной РНК из образцов ткани печени, а также постановку реакции обратной транскрипции проводили с использованием наборов реагентов ExtractRNA и MMLV RT kit, соответственно («Евроген», Россия). Для определения уровней относительной экспрессии генов проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами. Матрицей для определения уровня экспрессии генов *TFAM*, *MFN2*, *BAX*, *DMN1L*, *SOD1*, *NF-κβ* и *MT-ND4* служила тотальная РНК. Ген *RPLPO* был использован в качестве референсного гена [Vandesompele J., et al., 2002], а ген *β2-microglobulin* - в качестве нормировочного. Нуклеотидные последовательности и первичные транскрипты (Таблица 2) изучаемых

генов были конструированы с помощью программ «Primer.3», «Oligo Analyzer», «Primer-BLAST» и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ПЦР проводилась на амплификаторе CFX96 («BioRad», США) в объеме 25 мкл. Протокол амплификации (шаг нагревания 5°C, 39 циклов): 3 минуты при 96° С; 10 секунд при 96°C; 30 секунд при 60-62 °С; 15 секунд при 72°C; 5 минут 72 °С.

Расчеты уровня относительной экспрессии исследуемых генов по результатам ПЦР в реальном времени производили с помощью модифицированной формулы Пфаффа для разных эффективностей амплификации (<https://toptipbio.com/pfaffl-method-qpcr/>).

Таблица 2 - Последовательность олигонуклеотидных праймеров, используемых в эксперименте

Ген	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер продукта, п.н.
RPLPO	F: 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAАСТ-3'	20
	R: 5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'	20
	Bgl635-5'-ATCTGCTGCATCTGCTTGGAGCCCA-3'-BHQ-2	25
SOD1	F: 5'-CGTGGCTGTGGTGGCTTC-3'	18
	R: 5'-CGTGGTGTCTGTGTGGT-3'	18
	FAM-5'-CCTCCCCGACCTGCCCTACGACTA-3'-BHQ-1	24
MFN2	F: 5'-CCAGCGTCCCATCCCTCT-3'	18
	R: 5'-TCCACACCACTCCTCCAACA-3'	20
	FAM-5'-ACAGGGCTCGCTCACCCAGGAG-3'-BHQ-1	22
MT-ND4	F: 5'- GCTCCATCTGCCTACGACAAA -3'	21
	R: 5'- TGCGACTGTGAGTGC GTTC -3'	19
	FAM-5'- ТААCAGCCATTCTCATCCAAACCCC -3'-BHQ-1	25
BAX	F: 5'-AGTAACATGGAGCTGCAGAGGA-3'	22
	R: 5'- CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGAA -3'	22
	FAM-5'-TGATTGCCGCCGTGGACACAGACT-3'-BHQ-1	24
DMN1L	F: 5'-TCTGGAGGTGGTGGGGTTG-3'	19
	R: 5'- TGGGTTTTGATTTTTCTTCTGCTAAT -3'	26
	FAM-5'-ACCAACCACAGGCAACTGGAGAGGA-3'-BHQ-1	25
NF-κβ1	F: 5'-CAGGAAGATGTGGTGGAGGA-3'	20
	R: 5'- TGGGGTGGTCAAGAAGTAGTG-3'	22
	FAM-5'-CCTTCTGGACCGCTTGGGTAАСТCTGT-3'-BHQ-1	27
TFAM	F: 5'-CGCTCCCCCTTCAGTTTTGT-3'	20
	R: 5'-TACCTGCCACTCCGCCCTAT-3'	20
	FAM-5'-CGAGGTGGTTTTCATCTGTCTTGGCA-3'-BHQ-1	26

Для постановки цифровой капельной ПЦР выделяли ДНК из ткани печени с использованием коммерческих наборов «QIAamp DNA Mini Kit» согласно протоколу производителя («QIAGEN»). Концентрацию ДНК в образцах измерили с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer на длине волны 260 нм. Качество экстрагированной ДНК определяли по соотношению поглощений на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280} > 1,8$). Подсчет количества копий мтДНК в расчете на 1 клетку определяли методом мультиплексной *цифровой капельной ПЦР* (цкПЦР) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System, BioRad. Реакционную смесь из коммерческого ddPCR MasterMix (Bio-Rad, Pleasanton, США), праймеров, зондов и самой ДНК загружали в автоматический генератор капель (Bio-Rad, Pleasanton, CA) для эмульсифицирования примерно по 15–20 тысяч капель на один

нанолитр. Эмульсифицированная кцПЦР смесь переносилась в стандартные 96-луночные планшеты и амплифицировалась в термоциклире (Bio-Rad T100 thermal cycler) по следующему температурному протоколу: 95 °С 10 минут, 40 циклов 94 °С 30 секунд и 53 °С 60 секунд и заключительный цикл 98 °С 10 минут. После реакции амплификации проводилась регистрация флуоресцентных сигналов по конечной точке с использованием модуля (QX200 Droplet Reader, Bio-Rad, Pleasanton, США). Применение новейшего метода обусловлено подсчетом абсолютной количественной оценки таргентных молекул мтДНК, что необходимо для выявления закономерностей изменения числа копий мтДНК.

Полученные данные кцПЦР с модуля X200™ Droplet Digital™ PCR System анализировались в программе QuantaSoft (версия 1.7.4.0917). Абсолютное количество копий мтДНК в расчете на клетку вычисляли по формуле:

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

Выделение суммарного белка из гомогенизированной ткани печени проводилось с помощью лизирующего буфера RIPA (Thermo Scientific, USA). Для проведения электрофореза использовали коммерческие полиакриламидные гели (mini-PROTEAN TGX Stein-Free Gels, Bio-Rad, USA). Перед загрузкой в гели образцы прогревали при 95°С в течение 5 минут с добавлением буфера для загрузки проб Tris-Glycine SDS 2x (novex, USA) и DDT (Thermo Fisher Scientific, USA). Электрофорез проводили в течение часа при 200V. Далее «сэндвич», состоящий из губок, PVDF-мембраны и геля помещали в электрофорезную камеру для полусухого переноса Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA) на режим Turbo (2,5 A, 25V). После проведения инкубации с первичными специфическими антителами против исследуемых белков (TFAM, MFN2, BAX, DRP1, SOD1, NF-κβ/p65 и GAPDH) и со вторичными, меченные пероксидазой хрена, антителами проводили инкубацию PVDF-мембраны в растворе ECL (Thermo Scientific, USA) и детектировали бэнды белков с помощью Chemi Doc (Bio-Rad, USA) в режиме Optimal Auto-exposure. Полученные данные анализировали с помощью программы ImageLab (Bio-Rad, USA). Продукцию белков оценивали при соотношении значений денситометрии исследуемого белка и референсного – GAPDH.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

НАЖБП одно из распространенных заболеваний в гепатологии [Parthasarathy G. et al., 2020; Pafili K., Roden M., 2021]. Инсулинорезистентность (ИР) и окислительный стресс играют ключевую роль в патогенезе НАЖБП [Parthasarathy G.

et al., 2020]. Несмотря на понимание того, как липиды накапливаются в печени, механизмы развития стеатогепатита и фиброза до сих пор мало изучены.

Согласно современной теории «множественных параллельных ударов» [Buzzetti E. et al., 2016], ИР, окислительный стресс и активация провоспалительных и фиброгенных путей (включая активацию клеток Купфера и звездчатых клеток печени) происходят параллельно, приводя, в итоге, к неалкогольному стеатогепатиту и фиброзу [Burne S. D. et al., 2015]. Известно, что при НАЖБП в крови увеличивается содержание печеночных показателей: АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ, общего белка, всех фракций билирубина [Pafili K., Roden M., 2021]. В данном исследовании вышеперечисленные показатели не выходили за рамки референсных значений, однако достоверно увеличивались у всех больных НАЖБП с ожирением по сравнению с контролем (Таблица 3). У всех больных НАЖБП (кроме группы без СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м²), значения суммарной площади жировых включений в гепатоцитах были выше, чем в контроле (Рисунок 1А). У всех пациентов с НАЖБП были обнаружены лимфоциты в ткани печени (Рисунок 1Б). У больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² с СД 2 типа число лимфоцитов в печени превышало аналогичные показатели в группе пациентов без СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² (Рисунок 1, Б). В группе больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² без СД 2 типа число лимфоцитов в печени оказалось ниже, чем у лиц с ИМТ < 40 кг/м² (Рисунок 1Б). Таким образом, у больных НАЖБП с морбидным ожирением на фоне СД 2 типа регистрируются более выраженные признаки воспаления в ткани печени.

Таблица 3 - Биохимические показатели и содержание инсулина в крови в исследуемых группах

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

ГГТ (до 32,0 е/л)	15,50 (13,13-19,45)	21,25 (17,50-29,38) $p_1 < 0,001^*$	28,50 (20,00-50,20) $p_1 < 0,001^*$	40,50 (22,00-61,20) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$	39,50 (28,10-56,35) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$ $p_3 = 0,006^*$
Общий белок (66,0-88,0 г/л)	79,00 (74,95-80,00)	73,85 (70,02-77,85) $p_1 = 0,004^*$	73,90 (71,10-77,40) $p_1 < 0,001^*$	72,50 (66,60-75,70) $p_1 < 0,001^*$	69,80 (65,10-74,20) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,005^*$ $p_3 < 0,001^*$
Глюкоза (3,9-6,4 ммоль/л)	5,14 (4,91-5,35)	5,66 (4,87-6,48) $p_1 = 0,009^*$	5,12 (4,67-6,01)	6,64 (5,59-8,12) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,004^*$ $p_3 < 0,001^*$	7,30 (5,98-9,83) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 < 0,001^*$ $p_3 < 0,001^*$
Инсулин, пг/мл	45,93 (39,26-61,25)	93,42 (44,41-170,50)	134,30 (67,79-237,10) $p_1 = 0,003^*$	502,20 (255,70-1248,00) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,010^*$ $p_3 = 0,004^*$	262,20 (134,00-530,70) $p_1 < 0,001^*$ $p_2 = 0,030^*$ $p_3 = 0,020^*$

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

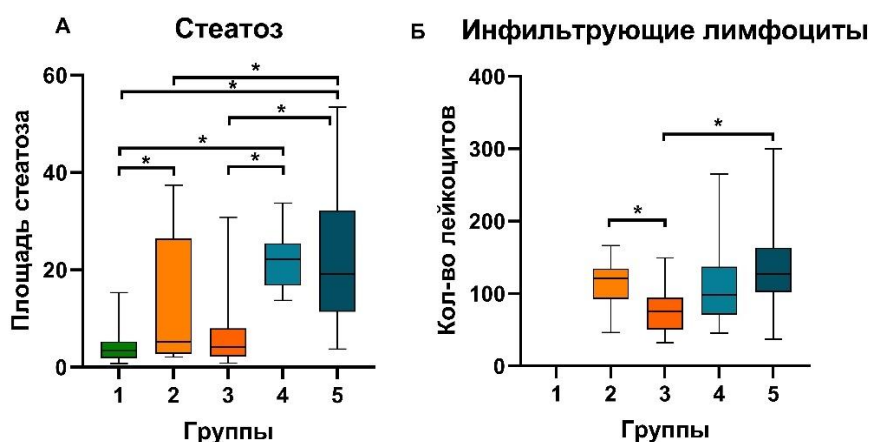


Рисунок 1 - Изменение показателей гистологического исследования ткани печени: А – площади липидных капель в печени; Б – количества лимфоцитов в паренхиме печени. 1-контрольная группа; 2-больные ожирением без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м²; 3-с ИМТ>40 кг/м²; 4-больные ожирением с СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м²; 5-с ИМТ>40 кг/м². «*» - статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Апоптоз гепатоцитов является механизмом прогрессирования НАЖБП [Akazawa Y., Nakaо K. J., 2018], способствуя повреждению печени и формированию фиброза [Alkhourі N. et al., 2011; Akazawa Y., Nakaо K. J., 2018]. Процесс апоптоза запускается и регулируется несколькими механизмами. Проапоптотический белок ВАХ относится к митохондриальному пути апоптоза. В здоровых клетках ВАХ локализуется в основном в цитозоле; во время апоптоза перемещается к митохондриям и встраивается во внешнюю митохондриальную мембрану, переходя в активированную форму [Westphal D. et al., 2011]. Нами было выявлено более высокое

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

Важным регулятором иммунных и воспалительных реакций является фактор транскрипции NF- κ B, который усиливает выработку провоспалительных цитокинов, в частности - TNF α и IL-1 [Giridharan S. et al., 2018; Morgan M. J. et al., 2011]. Существует два пути активации сигналинга NF- κ B: канонический и неканонический [Chen Q. et al., 2021]. Канонический путь хорошо изучен и зависит от деградации I κ B α [Sun S.-C., 2017]. Активация неканонического сигнального пути NF- κ B зависит от процессинга p100 [Sun S.-C., 2011; Tilborghs S. et al., 2017]. Киназа, индуцирующая NF- κ B (NIK), является центральным и специфическим сигнальным компонентом в неканоническом сигнальном пути NF- κ B [Tilborghs S. et al., 2017]. Нами было выявлено, что экспрессия гена *NF- κ B1* (компонент канонического сигнального пути) в клетках печени была снижена у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² относительно контроля и пациентов с НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² (Рисунок 2В). При этом содержание белка NF- κ B/p65 в печени у больных НАЖБП без СД 2 типа было выше в сравнении с контролем (Рисунок 2Г). В подтверждение потенциальных протекторных функций неканонического пути NF- κ B, нами была выявлена отрицательная корреляция между площадью липидных капель в гепатоцитах и содержанием белка NF- κ B/p65 у больных НАЖБП с ИМТ>40 кг/м² ($r=-0,76$, $p<0,05$). Мы предполагаем, что при НАЖБП происходит переключение активации NF- κ B с канонического пути на неканонический, который может нивелировать проявления стеатоза и воспаления при НАЖБП (Рисунок 6).

Помимо повышенного накопления внутриклеточных липидов и апоптоза гепатоцитов, НАЖБП характеризуется высоким уровнем АФК в гепатоцитах и адипоцитах [Li R. et al., 2020]. При НАЖБП повышенная продукция АФК митохондриями и снижение активности механизмов поглощения АФК (например, GSH, SOD2 и каталазы), могут усиливать эффекты окислительного стресса за счет окисления полиненасыщенных жирных кислот, что приводит к образованию побочных продуктов альдегида, таких как 4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид [Li R. et al., 2020]. SOD1 является известным внутриклеточным антиоксидантным ферментом. Значения экспрессии гена *SOD1* в печени у больных НАЖБП с ИМТ>40 кг/м² с СД 2 типа/без него были значимо ниже, чем в контроле (Рисунок 2Д), что свидетельствует о снижении содержания компонента антиоксидантной защиты в зависимости от массы ЖТ ($r=-0,78$, $p<0,05$). У больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ<40 кг/м² и с СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² была обнаружена отрицательная корреляция между содержанием белка SOD1 (Рисунок 2Е) и площадью жировых включений в печени ($r=-0,89$ и $r=-0,79$, $p<0,05$,

соответственно). Также у больных НАЖБП с ИМТ > 40 кг/м² с СД 2 типа / без него снижение уровня экспрессии гена *SOD1* в биоптатах печени было взаимосвязано с низкой экспрессией гена *BAX* ($r=0,62$ и $r=0,64$, $p<0,05$, соответственно) и *NF-κβ1* ($r=0,63$ и $r=0,65$, $p<0,05$, соответственно). Таким образом, выявленное нами снижение экспрессии генов компонентов антиоксидантной защиты и апоптоза у всех больных НАЖБП с морбидным ожирением, может свидетельствовать об истощении компенсаторных протекторных механизмов в печени (Рисунки 6, 7).

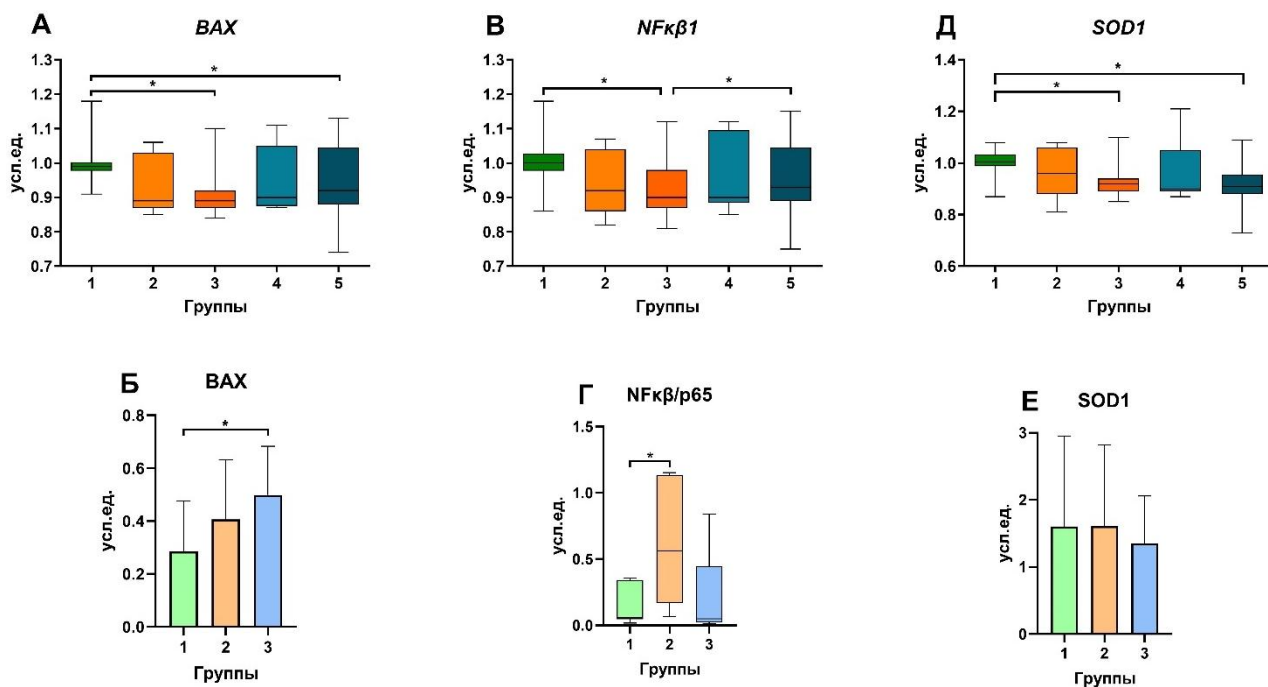


Рисунок 2 – Изменение уровня экспрессии генов *BAX* (А), *NF-κβ1* (В), *SOD1* (Г) в клетках печени в исследуемых группах. Примечание: здесь и в рисунках 3,4,5 - 1-контрольная группа; 2-больные ожирением без СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м²; 3-с ИМТ > 40 кг/м²; 4-больные ожирением с СД 2 типа с ИМТ < 40 кг/м²; 5-с ИМТ > 40 кг/м²) и содержания соответствующих белков (Б,Г,Е): здесь и в рисунках 3,4 - 1-контрольная группа; 2-больные ожирением; 3-больные ожирением и СД 2 типа). «*» - статистически значимые различия, $p<0,05$.

Измененный липидный обмен и окислительный стресс при ожирении вовлечены в дисфункцию митохондрий клеток печени [Lee J. et al., 2019]. Индуцированный ИР приток ЖК приводит к стеатозу печени и адаптивному увеличению их окисления в митохондриях печени [Wang J. et al., 2020]. Однако метаболическая гибкость митохондрий клеток печени со временем теряется. В образцах печени, полученных у больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа и без него, нами обнаружен более высокий (относительно контроля) уровень экспрессии гена *MT-ND4*, кодирующего субъединицу Комплекса I дыхательной цепи (Рисунок 3А). Комплекс I является одним из нескольких ферментных комплексов, необходимых для окислительного фосфорилирования [García-Ruiz I. et al., 2010]. Вероятно, увеличение уровня первого компонента дыхательной цепи митохондрий в клетках печени является компенсаторным механизмом в ответ на избыточное поступление СЖК в гепатоциты (Рисунки 6, 7). Окислительный стресс в клетках, который возникает вследствие ожирения, может вызывать изменение количества мтДНК и возникновение их мутаций [Lee J. et al., 2019]. МтДНК чувствительна к

окислительному повреждению, так как непосредственно примыкает к месту продукции АФК и систем репарации ДНК [Lee J. et al., 2019]. НАЖБП характеризуется истощением мтДНК и повышенным уровнем 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG/окисленная форма дезоксигуанозина) [Lee J. et al., 2019; Wang J. et al., 2020]. Нами было показано снижение (более чем в 2 раза) количества копий мтДНК в ткани печени у всех больных НАЖБП относительно контроля (Рисунок 3Б).

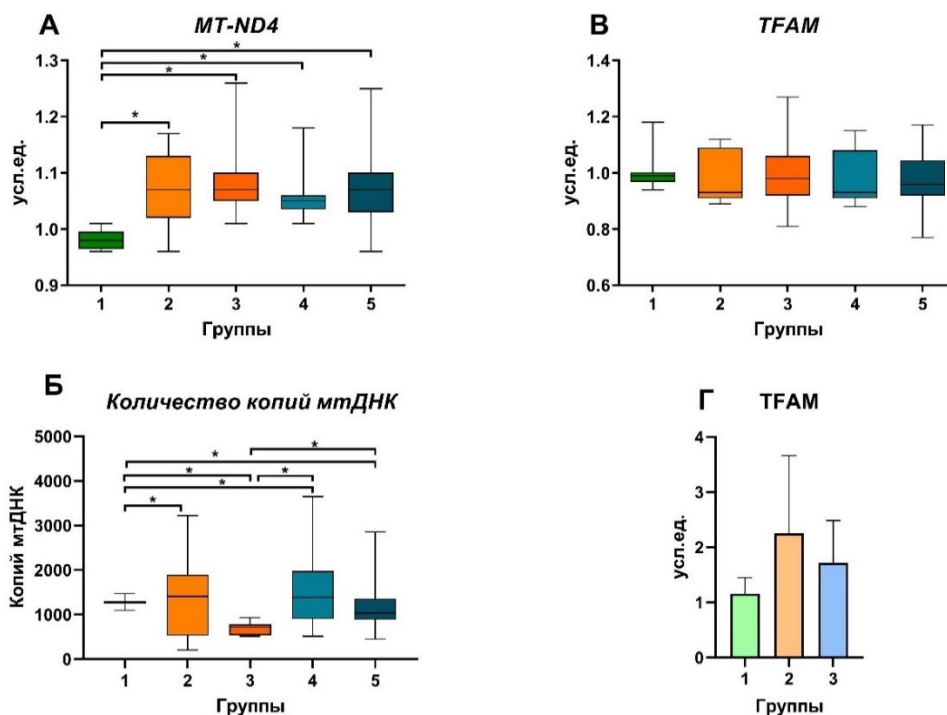


Рисунок 3 - Изменение уровня экспрессии генов *MT-ND4* (А), *TFAM* (В) и содержания белка *TFAM* (Г), а также числа копий мтДНК в клетках печени в исследуемых группах. «*» - статистически значимые различия, $p < 0,05$.

У всех больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа обнаружена взаимосвязь количества мтДНК в печени с уровнем инсулина в крови ($r = -0,53$, $p < 0,05$) и НОМА-IR ($r = -0,54$, $p < 0,05$), что может указывать на связь снижения копийности мтДНК в печени с развитием ИР. Также у всех больных НАЖБП с ожирением была найдена отрицательная взаимосвязь количества копий мтДНК с площадью стеатоза в гепатоцитах ($r = -0,58$, $p < 0,05$). Кроме того, количество мтДНК отрицательно коррелировало с уровнем экспрессии мРНК гена *MT-ND4* в печени ($r = -0,51$, $p < 0,05$) у больных НАЖБП без СД 2 типа. Так, с увеличением площади стеатоза, возрастает элемент митохондриального дыхания (Комплекс I), что приводит к снижению копийности мтДНК в печени у пациентов с НАЖБП. В дополнение, у всех больных НАЖБП без СД 2 типа были найдены положительные корреляции между количеством копий мтДНК и содержанием белка *SOD1* ($r = 0,63$, $p < 0,05$), отрицательные: между копийностью мтДНК и площадью стеатоза в гепатоцитах ($r = -0,46$, $p < 0,05$), что может свидетельствовать о зависимости мтДНК от активности антиоксидантной системы (Рисунки 6, 7).

У всех больных НАЖБП с ожирением уровень экспрессии гена *TFAM* в печени значимо не изменялся, однако наблюдалась тенденция к его снижению (Рисунок 3В). Напротив, содержание белка *TFAM* в печени, имело тенденцию к увеличению у больных НАЖБП с СД 2 типа (Рисунок 3Г).

Наряду с биогенезом митохондрий, при ожирении наблюдается нарушение процессов деления и слияния митохондрий. Динамические изменения морфологии митохондрий необходимы для нормального функционирования клетки в изменчивых условиях [Ren L. et al., 2020]. Деление митохондрий опосредуется привлечением DRP1 на внешнюю митохондриальную мембрану из цитоплазмы клетки. Нарушение регуляции белков, участвующих в делении митохондрий существенно изменяет морфологию митохондрий и нарушает их функции [Hogbay R. et al., 2016]. У больных НАЖБП с СД 2 типа (ИМТ>40 кг/м²) уровень экспрессии гена *DMN1L* в клетках печени был ниже контроля, что было сопоставимо с содержанием белка DRP1 в ткани печени (Рисунок 4А,Б). Были выявлены отрицательные корреляции между содержанием белка DRP1 и площадью стеатоза в гепатоцитах у больных НАЖБП с СД 2 типа и без него (ИМТ>40 кг/м²) ($r=-0,88$ и $r=-0,76$, $p<0,05$, соответственно). Также у всех больных НАЖБП были обнаружены отрицательные взаимосвязи экспрессии гена *DMN1L* и продукции белка DRP1 в печени с плазменным уровнем инсулина ($r=-0,57$ и $r=-0,54$, $p<0,05$, соответственно) и индексом НОМА-IR ($r=-0,83$ и $r=-0,76$, $p<0,05$, соответственно). Это демонстрирует, что прогрессия стеатоза, а также развитие ИР приводят к уменьшению деления митохондрий, а значит, происходит нарушение баланса динамики митохондрий при НАЖБП.

У больных НАЖБП с СД 2 типа (ИМТ>40 кг/м²) были найдены взаимосвязи между содержанием белков DRP1 и SOD1 в клетках печени ($r=0,88$, $p<0,05$). У больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ>40 кг/м² также наблюдалась тенденция к снижению деления митохондрий, ассоциированная со снижением компонента антиоксидантной системы (корреляция экспрессии гена *DMN1L* и уровня экспрессии гена *SOD1* $r=0,67$, $p<0,05$). Таким образом, снижение эффективности антиоксидантной защиты, наряду с ИР при ожирении (ИМТ>40 кг/м²), приводит к снижению митохондриального деления в клетках печени (Рисунок 7). Слияние митохондрий в клетках млекопитающих опосредуется белками MFN1 и MFN2 [Ding M. et al., 2020]. Слияние позволяет поврежденным митохондриям с окисленными липидами, белками и мутантной митохондриальной ДНК смешиваться со здоровыми, что помогает восстановить функции митохондрий и поддерживать клеточный гомеостаз [Li R. et al., 2020]. Согласно полученным нами данным, у больных НАЖБП уровень экспрессии гена *MFN2* в печени не изменялся (Рисунок 4В,Г). Таким образом, митохондриям клеток печени отводится основная роль в утилизации и клиренсе избыточных липидов. При ожирении возникает ситуация, когда в гепатоцитах истощаются ресурсы для переработки высокого уровня СЖК. В первую очередь, компенсаторно увеличивается дыхание митохондрий, за счет увеличения экспрессии генов дыхательного комплекса, в частности, комплекса 1 (ген *MT-ND4*), что опосредует высокий уровень АФК, за счет утечки электронов. Одной из мишеней свободных радикалов является мтДНК, что ведет к уменьшению ее копииности. Нами было выявлено, что при увеличении ИМТ>40 кг/м², снижается активность компонента антиоксидантной системы, способствуя уменьшению мтДНК в клетках печени. Все вышеперечисленные процессы ведут к увеличению образования липидных капель и инфильтрации ткани печени лимфоцитами. В итоге, динамика митохондрий при ожирении претерпевает изменения, а именно, с ростом ИМТ и развитием ИР деление митохондрий значительно уменьшается (Рисунки 6, 7).

Как уже упоминалось ранее, в патогенез ожирения и ИР вовлечен ряд секреторируемых факторов [Braunersreuther V. et al., 2012; Niederreiter L. et al., 2018], одним из которых является TNFSF14/LIGHT [Otterdal K. et al., 2015]. Было показано,

что TNFSF14/LIGHT может изменять гомеостаз и функцию печени за счет уменьшения накопления воспалительных клеток и стимуляции секреции воспалительных цитокинов [Herrero-Cervera A. et al., 2019].

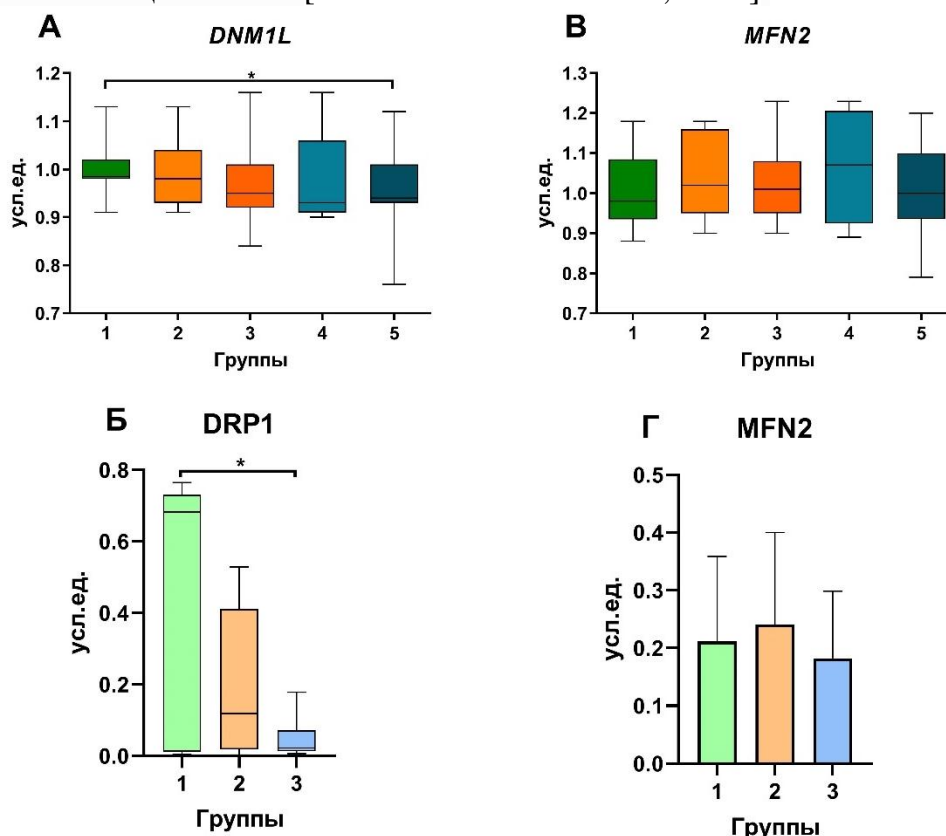


Рисунок 4 - Изменение экспрессии генов *DNM1L* (А) и *MFN2* (В) в клетках печени в исследуемых группах и содержания соответствующих белков (Б,Г). «*» - статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Исследования J. Bassols et al. (2010) продемонстрировали более высокий уровень TNFSF14/LIGHT в плазме крови у пациентов с ожирением, в сравнении с контролем [Bassols J. et al., 2010]. Вышесказанное коррелирует с нашими данными, где у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа уровень sTNFSF14/LIGHT в крови повышался относительно контроля и больных НАЖБП с СД 2 типа (Рисунок 5А). У последних уровень sTNFSF14/LIGHT, напротив, был ниже, чем в контроле и у больных НАЖБП без СД 2 типа (Рисунок 5А). У всех пациентов с НАЖБП с ожирением уровень sTNFSF14/LIGHT в крови отрицательно коррелировал с концентрациями инсулина ($r = 0,41$, $p < 0,05$) и HOMA-IR ($r = 0,65$, $p < 0,05$), а также с содержанием глюкозы ($r = -0,41$, $p < 0,05$). В исследовании Y. Kou и др. (2018) было показано, что TNFSF14/LIGHT связывается с рецептором $LT\beta R$ на преадипоцитах, и, далее, может напрямую блокировать MAPK и активацию JNK [Kou Y. et al., 2019]. Таким образом, высокий уровень sTNFSF14/LIGHT в крови способен поддерживать взаимодействие инсулина со своим рецептором через блокирование JNK в печени у больных НАЖБП без СД 2 типа (Рисунок 6). У всех больных НАЖБП была выявлена взаимосвязь содержания sTNFSF14/LIGHT в крови с уровнем экспрессии гена *MT-ND4* в печени ($r = 0,28$, $p < 0,05$). Мы предполагаем, что содержание sTNFSF14/LIGHT в крови может оказывать влияние на биогенез митохондрий в клетках печени, через воздействие на уровень экспрессии гена *MT-ND4*. Выявлена отрицательная взаимосвязь между концентрацией sTNFSF14/LIGHT в крови и уровнем экспрессии

гена *DMNIL* ($r=-0,35$, $p<0,05$) в печени у всех пациентов с НАЖБП без СД 2 типа. Так, у больных НАЖБП без СД 2 типа *sTNFSF14/LIGHT* может вносить вклад в процессы деления митохондрий печени, через поддержание фосфорилирования *DRP1* (Рисунок 6). Эффекты *sTNFSF14/LIGHT* могут быть опосредованы его взаимодействием с другими цитокинами, в частности, *IL-6* и *IL-10*, играющими важную роль патогенезе хронических заболеваний печени. Нами была обнаружена корреляция содержания *sTNFSF14/LIGHT* с *IL-10* в крови у всех больных НАЖБП с ИМТ >40 кг/м² ($r=0,53$ и $r=0,41$, $p<0,05$, соответственно). Следует отметить, что концентрация *IL-10* в плазме крови у больных НАЖБП без СД 2 типа была значительно выше контроля и значений больных СД 2 типа (Рисунок 5Г). Выявлено, что *IL-10* способствует подавлению воспаления, ингибируя синтез и действие провоспалительных цитокинов, в том числе *TNF- α* , *IL-1 β* и *IL-6*, а также снижая активацию макрофагов [Zahran W. E. et al., 2013]. У пациентов с НАЖБП без СД 2 типа (ИМТ >40 кг/м²) и больных СД 2 типа (ИМТ <40 кг/м²) была выявлена взаимосвязь между плазменным уровнем *IL-10* и уровнем экспрессии гена *MT-ND4* в печени ($r=-0,51$ и $r=-0,73$, $p<0,05$, соответственно). Обобщая вышесказанное, снижение содержания *sTNFSF14/LIGHT* и *IL-10* в крови у больных НАЖБП и СД 2 типа может играть критическую роль в прогрессировании осложнений при ожирении (Рисунок 7). Также, в нашем исследовании были выявлены взаимосвязи между концентрацией *sTNFSF14/LIGHT* в крови и двумя растворимыми рецепторами к *IL-6*: *IL-6Ra* и гликопротеином 130 (*gp130/sIL6-Rb*) в крови у больных НАЖБП с ИМТ >40 кг/м² ($r=0,58$ и $r=0,57$, $p<0,05$, соответственно) и у больных НАЖБП с СД 2 типа ИМТ <40 кг/м² ($r=0,38$ и $r=0,40$, $p<0,05$, соответственно; *sTNFSF14/LIGHT* и *IL-6*, $r=0,42$, $p<0,05$).

IL-6 является одним из основных цитокинов хронического субклинического воспаления и является молекулой с разнонаправленным действием. *IL-6* способствует развитию ИР и нарушает гомеостаз глюкозы [Bastard J. P. et al., 2000; Sarbijani H. M. et al., 2016]. В проведенном исследовании, у всех больных НАЖБП уровень *IL-6* в крови был выше в сравнении с контролем (Рисунок 5Б). Самые низкие значения *IL-6* регистрировались у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м². В нашем исследовании была выявлена отрицательная корреляция между уровнем *IL-6* и содержанием белка *VAX* (у всех больных ожирением, $r=-0,34$) и с уровнем экспрессии гена *SOD1* в ткани печени (у больных ожирением с СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м², $r=-0,80$). Следовательно, на фоне повышения плазменного уровня *IL-6*, *VAX*-опосредованная клеточная гибель гепатоцитов снижается, однако супероксиддисмутаза не подавляет развитие стеатогепатита у пациентов с СД 2 типа. В нашей работе у больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м² было выявлено снижение экспрессии гена *DMNIL* и содержания белка *DRP-1* в печени, а также *IL-6*, *sIL-6Ra* и *gp130/sIL-6Rb* в крови. Вышесказанное может свидетельствовать о влиянии низких концентраций *IL-6* и его растворимых рецепторов на развитие дисфункции митохондрий печени у больных НАЖБП с СД 2 типа (Рисунок 7). Все цитокины семейства *IL-6* (кроме *IL-31*) используют мембранный гликопротеин *gp130* в качестве рецептора и последующего сигналинга [Scheller J. et al., 2011]. Существует два пути активации сигналов от *IL-6*: классический и транс-сигналинг [Rose-John S. et al., 2018]. Противовоспалительные и регенеративные свойства *IL-6* опосредуются классическим сигнальным путем, в то время как провоспалительные реакции во многих патологических состояниях включают транс-сигнализацию [Scheller J. et al., 2011]. Плазменный уровень *sIL-6Ra* повышался у больных НАЖБП без СД 2 типа

относительно контроля и больных с СД 2 типа (Рисунок 5В). Тогда как у больных НАЖБП с СД 2 типа концентрация sIL-6Ra была ниже, чем в контроле (Рисунок 5В).

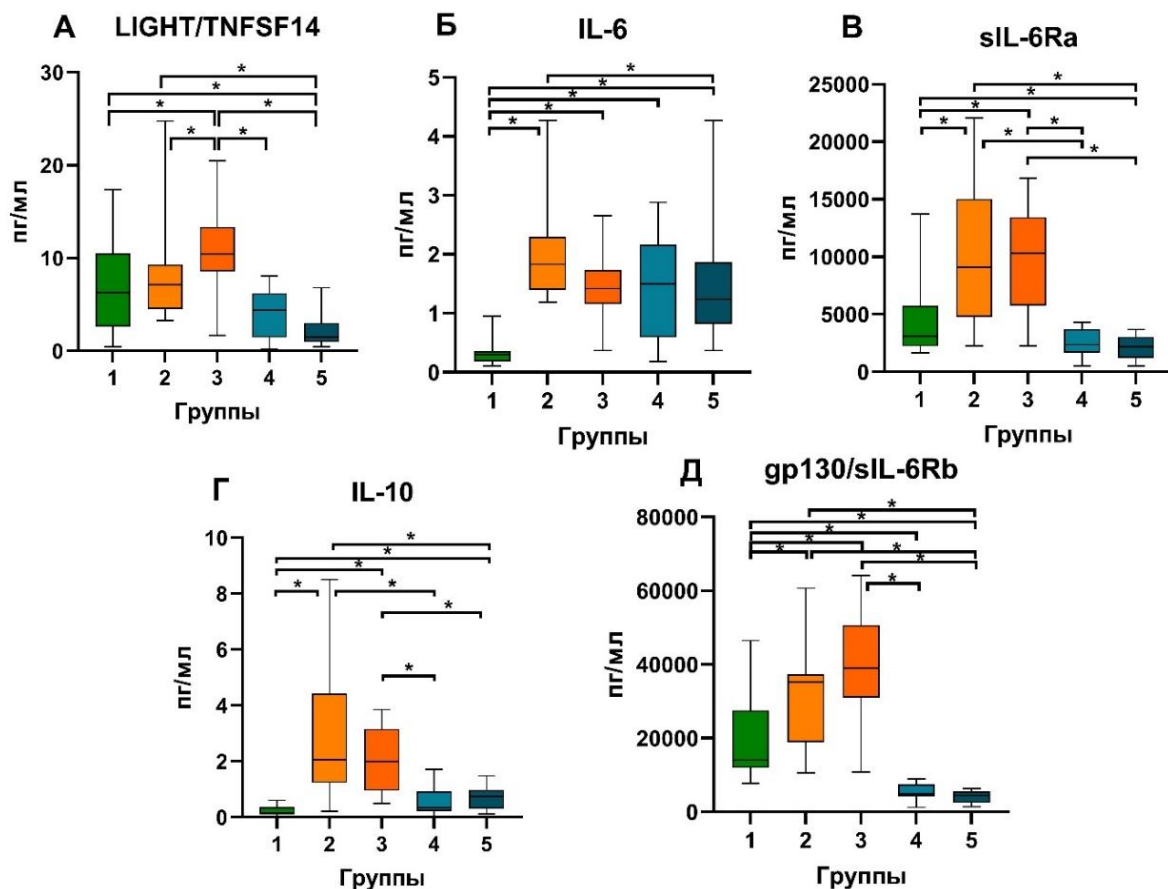


Рисунок 5 - Изменение содержания цитокинов sLIGHT/TNFSF14 (А), IL-6 (Б), sIL-6Ra (В), IL-10 (Г) и gp130/sIL-6Rb (Д) в крови у исследуемых групп. «*» - статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Нами установлено, что плазменный уровень gp130/sIL6-Rb был выше (относительно контроля) у больных НАЖБП без СД 2 типа и, напротив, ниже у больных НАЖБП с СД 2 типа (Рисунок 5Д). Учитывая, что у больных НАЖБП без СД 2 типа уровень gp130/sIL6-Rb в плазме крови повышен относительно других групп (Рисунок 5Д), мы предполагаем, что происходит ингибирование трансигналинга и активация классической передачи сигналов IL-6, что оказывает протекторный эффект на гепатоциты (Рисунок 6).

У больных НАЖБП с СД 2 типа уровень плазменного gp130/sIL-6Rb был ниже по сравнению с больными НАЖБП без СД 2 типа и группой контроля, что свидетельствует о преобладании транс-сигналинга. В подтверждение, у больных НАЖБП с СД 2 типа была найдена взаимосвязь между увеличением количества лимфоцитов в печени и уменьшением плазменных уровней gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra ($r = -0,33$ и $r = -0,29$, $p < 0,05$, соответственно). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ > 40 кг/м² площадь жировых включений была взаимосвязана с содержанием IL-6 ($r = 0,38$, $p < 0,05$), gp130/sIL-6Rb ($r = 0,55$, $p < 0,05$) и sIL-6Ra ($r = 0,63$, $p < 0,05$) в крови. Также у больных НАЖБП с СД 2 типа / без него с ИМТ < 40 кг/м² были выявлены взаимосвязи между плазменными цитокинами gp130/sIL-6Rb и IL-10 ($r = 0,79$ и $r = 0,62$, $p < 0,05$, соответственно) (Рисунок 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе изучены общие закономерности и особенности структурно-функциональных нарушений митохондрий в патогенезе НАЖБП, ассоциированной с ожирением и сахарным диабетом 2 типа и без него (Рисунки 6, 7). Выявлено, что у больных НАЖБП без СД 2 типа с ИМТ >40 кг/м², низкая лимфоцитарная инфильтрация в печени ассоциирована с ростом содержания белка NF- κ B/p65, на фоне низкого уровня экспрессии гена *NF- κ B1*, что может свидетельствовать о возможных протекторных функциях неканонического пути NF- κ B (Рисунок 6). У всех больных НАЖБП при увеличении ИМТ >40 кг/м² регистрируется снижение уровня экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в гепатоцитах (Рисунок 6, 7). При ожирении у всех больных НАЖБП в клетках печени увеличивается экспрессия гена *MT-ND4*, что связано с избыточным поступлением СЖК в гепатоциты, на фоне низких значений числа копий мтДНК (относительно контроля). У больных НАЖБП с СД 2 типа с ИМТ <40 кг/м² выявлено снижение экспрессии гена *DNM1L* и белка DRP1 (Рисунок 7), ответственных за деление митохондрий. Все вышеперечисленные факторы позволяют говорить о критическом разобщении биогенеза и динамики митохондрий при НАЖБП. Выявлено, что у больных ожирением без СД 2 типа IL-6 оказывает протекторное действие посредством классического сигнального пути, за счет образования комплексов gp130/IL-6Ra/IL-6 (Рисунок 6). Активация путей передачи сигналов JAK/STAT, ERK и PI3K посредством sIL-6 может приводить к фосфорилированию белка DRP1, поддерживая, тем самым, компенсаторное деление митохондрий в условиях избыточного поступления СЖК. Вклад в поддержание митохондриального гомеостаза у больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа вносит также высокий уровень IL-10, который запускает p38MAPK, опосредуя фосфорилирование DRP1. Кроме того, выявленный у данной категории пациентов высокий уровень sTNFSF14/LIGHT в крови влияет на функции митохондрий через экспрессию *MT-ND4* и *DNM1L*. В целом, факторы: высокое содержание IL-10 и sTNFSF14/LIGHT в крови, а также активация классического пути передачи сигналов IL-6, поддерживают биогенез митохондрий. При развитии СД 2 типа у больных НАЖБП низкие уровни исследуемых цитокинов в крови: sTNFSF14/LIGHT, IL-10, IL-6, gp130/sIL-6Rb, sIL-6Ra ассоциированы с прогрессированием стеатоза и стеатогепатита в печени (Рисунок 7). Снижение концентрации IL-6 и его растворимых рецепторов (gp130/sIL-6Rb и sIL-6Ra), в свою очередь, приводит к активации транс-сигналинга, опосредующего активацию провоспалительных реакций, усугубляющих течение стеатоза и воспаление печени (Рисунок 7).

Таким образом, для больных НАЖБП без СД 2 типа характерна активация протекторных механизмов, таких как: переключение на неканонический путь NF- κ B, активация классического сигналинга IL-6, высокая продукция IL-10 и sTNFSF14/LIGHT (Рисунок 6). При развитии СД 2 типа перечисленные выше защитные механизмы снижены/угнетены, что связано с изменением динамики митохондрий в сторону снижения деления. Так, высокие значения площади стеатоза и инфильтрация лимфоцитами в печени связаны с развитием толерантности к глюкозе (Рисунок 7). В связи с тем, что митохондриальные процессы зависят от плазменных факторов, регуляция их содержания может быть способом предотвращения развития патологических реакций при ожирении.

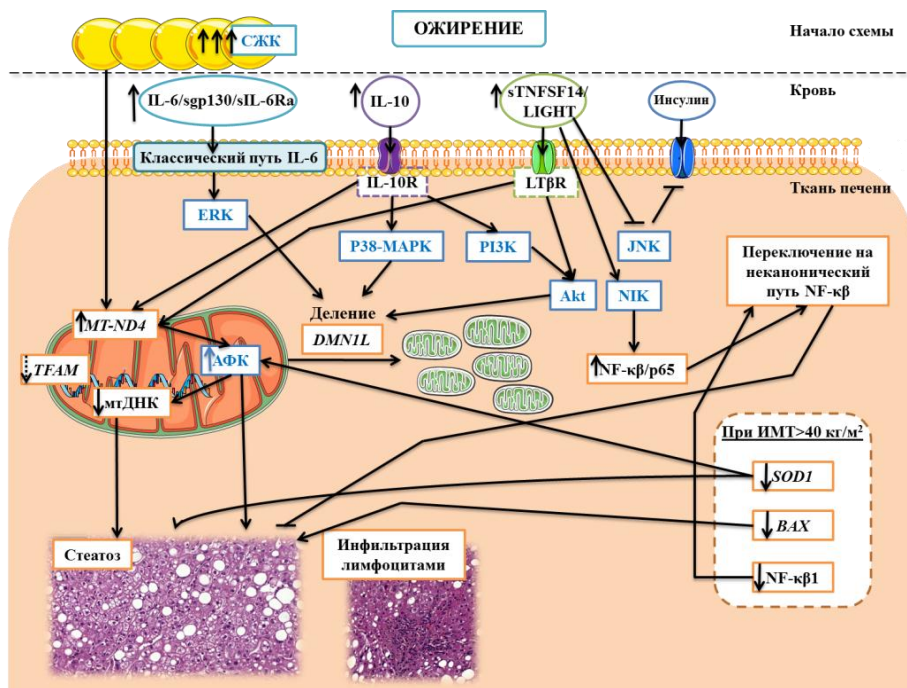


Рисунок 6 - Схема, отражающая роль структурно-функциональных нарушений митохондрий клеток печени в механизмах формирования неалкогольной жировой болезни печени у больных ожирением без сахарного диабета 2 типа. Черным обозначены стрелки, отражающие результаты работы, синим контуром - данные литературы.

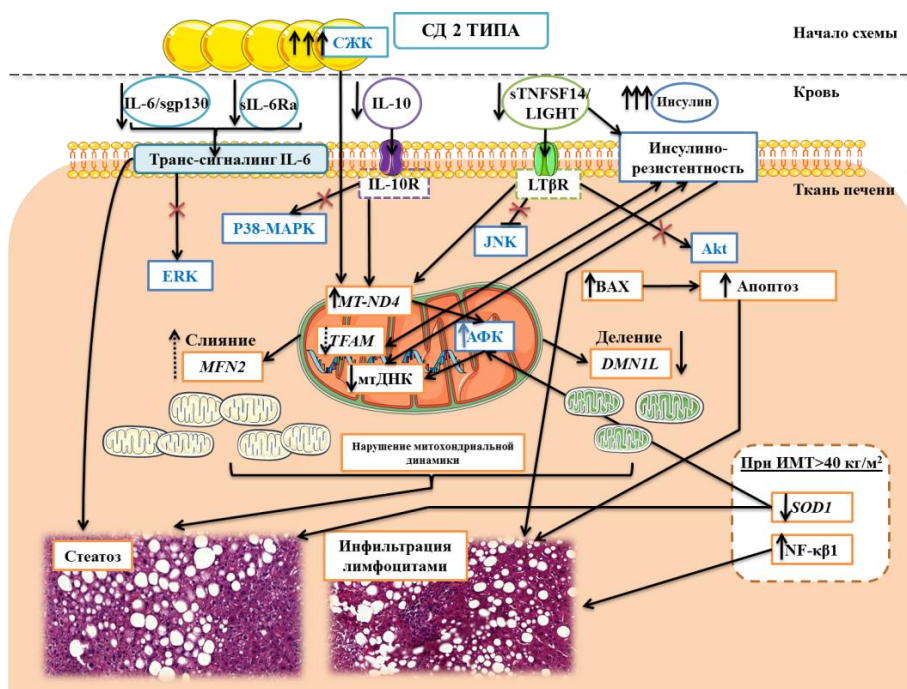


Рисунок 7 - Схема, отражающая роль структурно-функциональных нарушений митохондрий клеток печени в механизмах формирования неалкогольной жировой болезни печени у больных ожирением с сахарным диабетом 2 типа. Черным обозначены стрелки, отражающие результаты работы, синим контуром - данные литературы.

ВЫВОДЫ

1. У больных неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) с ожирением и сахарным диабетом (СД) 2 типа высокая экспрессия гена *MT-ND4* (кодирует комплекс I дыхательной цепи), низкая экспрессия гена *DNM1L* (кодирует деление митохондрий) и гипопродукция белка DRP1, наряду с уменьшением числа копий мтДНК в ткани печени, сочетаются с увеличением площади стеатоза в гепатоцитах.
2. У больных НАЖБП с индексом массы тела (ИМТ) более 40 кг/м² независимо от наличия СД 2 типа увеличение площади стеатоза в гепатоцитах коррелирует с низким уровнем экспрессии генов *SOD1* и *BAX* в ткани печени.
3. У больных НАЖБП с ожирением без СД 2 типа показатели площади стеатоза и лимфоцитарной инфильтрации коррелируют с высоким содержанием белка NF-κB/p65 и низкой экспрессией генов *NF-κB1* и *BAX* в печени и менее выражены, чем у больных СД 2 типа.
4. Высокое содержание плазменных факторов gp130/sIL-6Rb, IL-6, IL-6RA, sTNFSF14/LIGHT и IL-10 в крови у больных НАЖБП без СД 2 типа ассоциировано с экспрессией гена *DNM1L* и содержанием белка DRP1, обеспечивающими процесс деления митохондрий.
5. У больных НАЖБП с ожирением и СД 2 типа низкая концентрация sTNFSF14/LIGHT в крови (по сравнению с таковой у группы контроля и больных НАЖБП без СД 2 типа) сочетается со снижением экспрессии гена *DMN1L* (кодирует деление митохондрий) и увеличением экспрессии гена *MT-ND4* (кодирует комплекс I дыхательной цепи митохондрий) в ткани печени.
6. У больных ожирением нарушения структурно-функционального состояния митохондрий в клетках печени, проявляющиеся снижением экспрессии гена антиоксидантной защиты (*SOD1*), гена деления митохондрий (*DMN1L*) и копийности мтДНК в печени, увеличением экспрессии гена комплекса I дыхательной цепи (*MT-ND4*), а также низкое содержание плазменных факторов gp130/sIL-6Rb, IL-6, IL-6RA, sTNFSF14/LIGHT и IL-10 играют негативную роль в патогенезе НАЖБП, ассоциированной с СД 2 типа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Скуратовская Д.А., **Комар А.А.**, Вульф М.А., Болотов А.П., Затолокин П.А., Литвинова Л.С. Исследование изменения экспрессии генов митохондриальной динамики при сахарном диабете 2 типа // Материалы международной научной конференции «Наука. Исследования. Практика», Санкт-Петербург, август 2019. – С. 16-18.
2. **Комар А.А.**, Шунькина (Скуратовская) Д.А., Вульф М.А., Ву Х. К., Тодосенко Н.М., Затолокин П.А., Кириенкова Е.В., Газатова Н.Д., Литвинова Л.С. **Изменение печеночной экспрессии гена SOD1 в патогенезе НАЖБП при ожирении** // Медицинская иммунология. – 2021. – Т.23, №4. – С. 317-322. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,740).
3. Литвинова, Л. С. Патофизиология обмена веществ: учебно-методическое пособие / Л.С. Литвинова, М.А. Вульф, Д.А. Шунькина (Скуратовская), **А.А. Комар**, Н.М. Тодосенко, П.А. Затолокин, Н.И. Миронюк, Н.Д. Газатова, Е.В. Кириенкова – Калининград: Издательство БФУ им. И. Канта, 2021. – 111 с.
4. **Комар А.А.**, Скуратовская Д.А., Вульф М.А., Ву Х.К., Даринская А., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Затолокин П.А., Кириенкова Е.В., Литвинова Л.С. Влияние sTNFSF14 на митохондриальную динамику в печени у пациентов с ожирением //

- Бюллетень сибирской медицины.** – 2021. – Т.20, №3. – С.62-71. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ 0,756).
5. **Комар А.**, Skuratovskaia D., Vulf M., Litvinova L. WNT5A and IL10 in obese patients with insulin resistance // *Материалы международной конференции «8th International Conference on Human Genetics and Genetic diseases & 13th International Conference on Genomics & Pharmacogenomics»*, Madrid, Spain, November 25-26. – 2019. – P. 18.
 6. Skuratovskaia D., **Комар А.**, Vulf M., Zatalokin P., Litvinova L. The role of mitochondrial dynamics in liver of patients with type 2 diabetes // *Материалы международной конференции «8th International Conference on Human Genetics and Genetic diseases & 13th International Conference on Genomics & Pharmacogenomics»*, Madrid, Spain, November 25-26. – 2019. – P. 12.
 7. Skuratovskaia D., **Комар А.**, Vulf, M., Litvinova L. Mitochondrial destiny in type 2 diabetes: the effects of oxidative stress on the dynamics and biogenesis of mitochondria // *PeerJ.* – 2020. – V.8. – P.:e9741. (Q1 WoS, JCR = 0.98).
 8. Skuratovskaia D., Vulf M., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., **Комар А.**, Shunkin E., Shupletsova V., Goncharov A., Urazova O., Litvinova L. Tissue-Specific Role of Macrophages in Noninfectious Inflammatory Disorders // *Biomedicines.* – 2020. – V.8. – P. 400. (Q1 WoS, JCR = 1.51).
 9. Skuratovskaia D., **Комар А.**, Vulf M., Quang H., Shunkin E., Volkova L., Gazatova N., Zatalokin P., Litvinova L. IL-6 Reduces Mitochondrial Replication, and IL-6 Receptors Reduce Chronic Inflammation in NAFLD and Type 2 Diabetes // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – V. 22, №4. – P. 1774. (Q1 WoS, JCR =1.46).
 10. Vulf M., Shunkina D., **Комар А.**, Bograya M., Zatalokin P., Kirienkova E., Gazatova N., Kozlov I., Litvinova L. Analysis of miRNAs Profiles in Serum of Patients With Steatosis and Steatohepatitis // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* – 2021. – V. 9. - P. 2398. (Q1 WoS, JCR =2.452).
 11. Shunkina (Skuratovskaia) D., **Комар А.**, Vulf, M.; Quang H.V., Shunkin E., Kirienkova E., Dakhnevich A., Malkov D., Zatalokin P., Litvinova L. Tumour Necrosis Receptor Superfamily Interact with the Mitochondrial Dynamics in Adipose Tissue in Obese Patients without Type 2 Diabetes // *Biomedicines.* – 2021. – V. 9. – P. 1260. (Q1 WoS, JCR = 1.51).
 12. Vulf M., **Комар А.**, Skuratovskaia D., Vu H., Zatalokin P., Kirienkova E., Litvinova L. The role of antioxidant protection associated with liver mitochondrial biogenesis in obese patients // *DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS.* – 2021. – V. 23. – P. A58. (Q1 WoS, JCR = 4.40).

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ИМТ – индекс массы тела

ИР – инсулинрезистентность

мтДНК – митохондриальная ДНК

НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени

СД 2 типа – сахарный диабет 2 типа

СЖК – свободные жирные кислоты

СРБ – С-реактивный белок

IL – интерлейкин

TNFSF – фактор суперсемейства фактора некроза опухоли (*Tumor necrosis factor superfamily member 14*)

Комар Александра Андреевна

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

3.3.3. Патологическая физиология

Подписано в печать __.__.2021
формат 60X90 1/16. Усл. печ. листов 0,65. Тираж 100 экз. Заказ №
Отпечатано полиграфическим отделом
Издательства Балтийского федерального университета им. И. Канта
236041, г. Калининград, ул. А. Невского 14