

УДК 616-092.9

## Динамика биохимических показателей при моделировании неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести

Брус Т.В., Васильев А.Г.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

**Целью** данного исследования было выявить специфические биохимические показатели для верификации степени тяжести неалкогольной жировой болезни печени.

**Материалы и методы.** В эксперименте использовал два варианта модели неалкогольной жировой болезни печени: лёгкий – неалкогольный стеатоз, и тяжёлый вариант – неалкогольный стеатогепатит. Измеряли следующие биохимические показатели: активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), концентрации глюкозы, общего билирубина (Обил) и его прямой фракции (ПБ), общего белка (ОБ), концентрации гомоцистеина, триацилглицеридов (ТГ), общего холестерина (ОХ), супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (Кат) и малонового диальдегида (МДА).

**Результаты.** Степень тяжести развившихся стеатоза и стеатогепатита в экспериментальных группах была напрямую связана со способом моделирования неалкогольной жировой болезни печени. На модели стеатогепатита дисфункция печени была выражена в большей степени, чем в модели стеатоза; это различие проявлялось в более выраженном повышении АСТ, АЛТ, ЩФ, Обил, ОХ, МДА ( $p < 0,001$ ) и снижении СОД, Кат ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Исследование продемонстрировало целесообразность определения биохимических маркеров, в том числе уровней АЛТ, АСТ, Обил, ТГ, МДА и СОД для оптимизации методологии лабораторной диагностики степени тяжести жировой дистрофии печени.

**Ключевые слова:** биомоделирование; крысы; неалкогольная жировая болезнь печени; стеатоз; стеатогепатит.

**Для цитирования:** Брус Т.В., Васильев А.Г. Динамика биохимических показателей при моделировании неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести. *Патогенез.* 2024; 22(2): 39–43.

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2024.02.39-43

**Для корреспонденции:** Брус Татьяна Викторовна, e-mail: bant.90@mail.ru

**Финансирование.** При отсутствии «Исследование не имеет спонсорской поддержки».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 28.04.2024.

## Dynamics of biochemical parameters when simulating non-alcoholic fatty liver disease of different degrees of severity

Brus T.V., Vasiliev A.G.

St. Petersburg State Pediatric Medical University  
Litovskaya str. 2, St. Petersburg 194100, Russian Federation

**The aim** of this study was to identify biochemical markers to determine the severity of non-alcoholic fatty liver disease.

**Materials and methods.** In the experiment, we used two variants of the non-alcoholic fatty liver disease model: a mild one – non-alcoholic steatosis and a severe variant – non-alcoholic steatohepatitis. The following biochemical parameters were measured: enzyme activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), plasma glucose concentration, total protein (TP), total bilirubin (TBil) and its direct fraction (DF), plasma concentrations of homocysteine, total cholesterol (TC), triacylglycerides (TG), catalase (Cat), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA).

**Results.** The severity of developing steatosis and steatohepatitis in the experimental groups was directly related to the way non-alcoholic fatty liver disease was modeled. In the model of steatohepatitis, liver function was impaired to a much greater extent than with steatosis; this difference was manifested in a statistically significant increase in ALT, AST, ALP, TC, Obil, MDA ( $p < 0.001$ ) and a decrease in Cat, SOD ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** The study demonstrated the feasibility of determining biochemical markers, including the levels of ALT, AST, Obil, TG, MDA and SOD to optimize the methodology for laboratory diagnosis of the severity of fatty liver disease.

**Keywords:** biomodelling; rats; non-alcoholic fatty liver disease; steatosis; steatohepatitis.

**For citation:** Brus T.V., Vasiliev A.G. [Dynamics of biochemical parameters when simulating non-alcoholic fatty liver disease of different degrees of severity]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2024; 22(2): 39–43. (in Russian)

**DOI:** 10.25557/2310-0435.2024.02.39-43

**For correspondence:** Brus Tatyana Viktorovna, e-mail: bant.90@mail.ru

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Received:** 28.04.2024.

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является не только преобладающей патологией печени в мире, но и компонентом метаболического синдрома [1]. Недавние скрининговые исследования в России выявили НАЖБП у 27% людей, при этом у 80% этих больных был диагностирован неалкогольный стеатоз (НАС), у 17% – неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), и у 3% выявлен цирроз печени. До 80% всех случаев цирроза печени в России непосредственно вызваны НАЖБП. Проявления НАЖБП и метаболического синдрома встречаются у 30% всех терапевтических пациентов в России [2]. Повышенная частота НАЖБП напрямую коррелирует с повышенной сердечно-сосудистой и эндокринной патологией [3]. Такая высокая распространенность НАЖБП связана с современными тенденциями в питании и преобладании среди населения малоподвижного образа жизни.

Отсутствие эффективных методов лечения и профилактики НАЖБП обусловлено недостаточным пониманием её этиологии и патогенеза. Биопсия печени до сих пор является «золотым стандартом» диагностики НАЖБП. Но её применение не всегда целесообразно, и она не может быть использована у всех пациентов [4]. Таким образом, актуальность исследования заключается в валидации имеющихся моделей повреждения печени, а также выяснении аспектов развития патологического процесса в динамике с использованием ряда биохимических показателей. Учитывая вышеизложенное, мы определили **цель** настоящего исследования: выявить специфические биохимические маркёры для верификации степени тяжести неалкогольной жировой болезни печени.

## Материалы и методы исследования

Перед началом эксперимента план исследования, стандартизированные рабочие процедуры и сопроводительная документация были одобрены Локальным этическим комитетом Минздрава России (протокол №1/1 от 16.01.2017).

В исследовании использовали 62 крысы-самца с массой тела 220–240 г, разделенные на 3 группы:

Контроль ( $n = 20$ ) – интактные здоровые животные, необходимые для расчета референсных показателей крови. Они получали стандартный рацион питания и имели свободный доступ к питьевой воде;

«Стеатоз печени» ( $n = 21$ ) – крысы, которые получали стандартный рацион, идентичный контрольной группе, но вместо питьевой воды, животные получали 10%-й раствор фруктозы.

«Стеатогепатит» ( $n = 21$ ) – крысы, которые на протяжении всего исследования получали в качестве питания пищевые брикеты, состоящие из 21% белка, 5% животного жира, 60% фруктозы, 8% целлюлозы, 5% минеральных веществ и 1% витаминов. В наших предыдущих морфологических исследованиях было показано, что

эта процедура через 3–4 недели вызывает тяжелый фиброз печени [5].

Пробы от контрольных животных отбирали в первые сутки эксперимента, а от крыс групп «Стеатоз печени» и «Стеатогепатит» – на 21-е, 28-е и 37-е сутки эксперимента. Предварительно животные этих групп были объединены в три подгруппы по 7 особей в каждой.

Биохимические исследования крови проводились общепринятыми методами при помощи анализатора StatFax 3300 и набора реактивов ООО «Парма». Определяли: концентрацию глюкозы (Glu), общего билирубина (ОБил) и прямого билирубина (ПБ), общего белка (ОБ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ), гомоцистеина (ГЦ). Интенсивность ПОЛ и состояние антиоксидантной системы оценивали по уровню в плазме супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (Кат) и малонового альдегида (МДА).

Все результаты были статистически обработаны с помощью пакета SPSS для Windows 13.0. Дисперсионный анализ ANOVA использовался для сравнения средних значений зависимых выборок,  $p < 0,05$  считали достоверным уровнем различия, который является стандартным для биомедицинских экспериментов. Все полученные данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки ( $M \pm SE$ ).

## Результаты исследования и обсуждение

У животных группы «Стеатогепатит» наблюдалось планомерное достоверное увеличение концентрации ОБ в крови за счет его прямой фракции ( $p = 0,037$ ) начиная с 21-х суток эксперимента. Это увеличение, по-видимому, отражает нарастание дисфункции печени с параллельным развитием стеатогепатита. Этот тезис подтверждает отсутствие достоверного синхронного повышения ПБ в крови по сравнению с группой «Контроль» ( $p = 0,363$ ).

В отличие от стеатогепатита, стеатоз печени, вызывал умеренное, но достоверное повышением концентрации общего билирубина в крови ( $p = 0,040$ ) без существенных колебаний концентрации прямого билирубина, свидетельствующих о развитии легкой дисфункции гепатоцитов.

Анализ данных активности клеточных ферментов, характеризующих развитие синдрома цитолиза, в крови крыс с развившимся стеатогепатитом (АСТ и АЛТ), выявил параллельное их повышение, достигающее статистически достоверного уровня различий по сравнению с группой «Контроль» с самого начала исследования (АЛТ:  $p < 0,001$ , АСТ:  $p < 0,001$ ) с непрерывным приростом в течение всего эксперимента.

В группе «Стеатоз печени» активность АЛТ, АСТ увеличивалась медленнее. Лишь на 37-е сутки они достигли достоверного отличия от группы «Контроль» (АСТ:  $p = 0,002$ , АЛТ:  $p = 0,001$ ). Синдром цитолиза при

стеатозе был значительно ниже, что подтверждалось менее выраженным повышением АСТ и АЛТ у животных этой группы по сравнению с животными со стеатогепатитом (АЛТ ниже 13,4 МЕ/л ( $p = 0,004$ ), АСТ ниже на 8,5 МЕ/л ( $p = 0,011$ ) по сравнению с группой «Стеатогепатит»). Этот факт подтверждает достоверность различий степени тяжести двух выбранных моделей НАЖБП.

В исследованиях других авторов высокие уровни АСТ и АЛТ в экспериментальных группах были аналогичны нашим данным [6-7], однако степени нарушений пигментного и липидного обменов существенно выше по нашим результатам.

Уровень ЩФ у животных группы «Стеатогепатит» также был достоверно повышен по сравнению с группой «Контроль» ( $p < 0,001$ ), что подтверждает развитие синдрома холестаза. У животных группы «Стеатогепатит» уровень глюкозы увеличивался медленно и достиг достоверной разницы с группой «Контроль» лишь к 37-му дню исследования ( $p = 0,015$ ). Уровень глюкозы в группе «Стеатоз печени» достоверно не отличался от такового в группе «Контроль». Уровень гомоцистеина в крови животных со стеатогепатитом был достоверно повышен ( $p = 0,001$ ), в отличие группы «Стеатоз печени».

Выраженная печеночная дисфункция подтверждалась как при моделировании стеатогепатита, так и при моделировании стеатоза глубокими нарушениями метаболизма липидов и приводила к развитию гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии. Концентрация ОХ в крови в животных со стеатогепатитом значительно увеличилась по сравнению с показателями группы «Контроль» еще в начале эксперимента ( $p < 0,001$ ) с параллельным ещё более существенным повышением уровня ТАГ в крови ( $p < 0,001$ ).

У животных со стеатозом печени также регистрировалось повышение уровня ОХ и ТАГ в плазме крови. Но увеличение было плавным и не таким высоким, как в группе со стеатогепатитом (ОХ:  $p = 0,003$ ; ТАГ:  $p = 0,002$ ).

Предполагается, что в основе патогенеза НАЖБП лежит выраженный дисбаланс метаболизма липидов с формированием гипертриглицеридемии и гиперхолестеринемии. Согласно нашим данным, на 37-й день наблюдения уровень ТГ в группе животных со стеатогепатитом стал в 4 раза выше, чем в контрольной группе. Это несколько выше, чем в эксперименте З. Аккермана [8]: на 35-й день наблюдений показатель увеличился на 223%. Уровень ОХ к концу эксперимента увеличился на 167%, тогда как в исследованиях того же автора этот показатель увеличился на 89%.

Серьезные метаболические нарушения, сопровождающие развитие НАЖБП у экспериментальных животных, отражались биохимическими изменениями плазмы крови, характеризующими активизацию ПОЛ и значительную депрессию антиоксидантной системы. Эти нарушения проявлялись прогрессирующим увеличением концентрации МДА в крови как в модели НАС, так и в модели НАСГ с параллельным снижением активности основных ферментов антиоксидантной системы (каталазы, СОД) (табл. 1).

Уровень МДА в крови в группе «Стеатогепатит» нарастал стремительно и достоверно ( $p < 0,001$ ) с первых дней эксперимента, отражая активизацию ПОЛ (табл. 1). Интенсивность ПОЛ у крыс со стеатозом печени была существенно ниже, чем у животных группы «Стеатогепатит»: уровень МДА у животных группы «Стеатоз печени» рос медленно ( $p = 0,010$ ), но к концу исследования (37-е сутки) среднее значение МДА статистически превышало на 9,8 ммоль/л показатель группы «Контроль» ( $p = 0,001$ ), однако было на 11 ммоль/л ниже, чем у животных с НАСГ ( $p = 0,001$ ).

Параллельно с активацией ПОЛ в обеих экспериментальных группах значительно снижалась концентрация основных ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталаза). Уровень СОД у животных с НАСГ был достоверно ниже ( $p < 0,001$ ), как и концентрация

Таблица 1

Активность ферментов антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления у крыс с НАЖБП различной степени тяжести (M±SE)

Группа	День эксперимента	n	Биохимические параметры		
			СОД, МЕ/мл	Каталаза, ммоль/л	МДА, ммоль/л
Контроль	0	20	6,7±0,10	0,17±0,01	10,1±0,14
«Стеатоз печени» (НАС)	21	7	6,1±0,26	0,17±0,01	14,4±0,74
	28	7	6,0±0,07 <sup>1</sup>	0,15±0,01	17,8±0,90 <sup>1</sup>
	37	7	5,6±0,10 <sup>1</sup>	0,14±0,01 <sup>1</sup>	19,9±0,28 <sup>1,2</sup>
«Стеатогепатит» (НАСГ)	21	7	6,1±0,19 <sup>1</sup>	0,15±0,01	16,5±1,44 <sup>1</sup>
	28	7	5,8±0,15 <sup>1</sup>	0,12±0,01 <sup>1</sup>	23,2±2,08 <sup>1</sup>
	37	7	4,8±0,23 <sup>1</sup>	0,08±0,01 <sup>1</sup>	31,9±3,63 <sup>1</sup>

Примечание. Статистическая значимость отличий ( $p < 0,05$ ): 1 – от группы контроля, 2 – от группы «Стеатогепатит».

каталазы с первых дней эксперимента ( $p = 0,001$ ), чем в контрольной группе.

Уровень тех же ферментов в крови животных с НАС снижался медленнее: СОД на 28-й день ( $p = 0,002$ ); каталаза: на 37-й день ( $p = 0,009$ ) и не столь существенно.

Метаболические нарушения организма животных, сопровождающие развитие НАЖБП в нашем эксперименте, приводят к снижению активности антиоксидантной системы организма и активации ПОЛ. Это отражается в прогрессивном повышении уровня МДА в крови крыс на обеих моделях НАЖБП и снижении содержания основных антиоксидантных ферментов (каталазы, СОД), что сопоставимо с результатами исследований других авторов. Pereira и соавт. на фоне НАЖБП также наблюдалось достоверное снижение уровня антиоксидантных ферментов СОД и каталазы [9].

### Заключение

Оценка биохимических маркеров плазмы крови экспериментальных животных, характеризующих функции печени, подтверждает обоснованность моделей НАЖБП лёгкой степени тяжести (НАС) и тяжёлой степени (НАСГ). Выявлено достоверное расхождение в динамике этих маркеров между группами с различной степенью тяжести процесса. Функции печени у животных со стеатогепатитом были нарушены более выражено, чем у животных со стеатозом печени: нарушения метаболизма липидов и билирубина, а также цитолитический и холестатический синдромы, гипергомоцистемия в первой группе были достоверно глубже, чем во второй.

Результаты настоящего исследования подтверждают обоснованность выбора моделей НАЖБП различной степени тяжести. Данные этих экспериментов могут быть адекватно экстраполированы на патологию человека, поскольку отражают все компоненты НАЖБП (гиперхолестеринемия, инсулинорезистентность, метаболический синдром).

**Авторский вклад:** авторы внесли равный вклад в написание данной статьи.

### Список литературы

1. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 5: 16. DOI: 10.21037/tgh.2019.09.08
2. Брус Т.В., Васильев А.Г., Трашков А.П. Основные биохимические маркеры при неалкогольной жировой болезни печени (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 44–51. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.44-51
3. Schmidt N.H, Svendsen P., Albarrán-Juárez J., Moestrup S.K., Bentzon J.B. High-fructose feeding does not induce steatosis or non-alcoholic fatty liver disease in pigs. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 2807. DOI: 10.1038/s41598-021-82208-1

4. Chang Y., Cho Y.K., Kim Y., Sung E., Ahn J., Jung H.S., Yun K.E., Shin H., Ryu S. Nonheavy Drinking and Worsening of Noninvasive Fibrosis Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Cohort Study. *Hepatology.* 2019; 69(1): 64–75. DOI: 10.1002/hep.30170
5. Брус Т.В., Васильев А.Г., Кравцова А.А., Васильева А.В., Брус Ю.С., Баннова А.В. Биомоделирование жировой дистрофии печени смешанной этиологии. *Педиатрия.* 2023. 14(5): 25–32. DOI: 10.17816/PED625940
6. Steenson S., Shojaee-Moradie F., Whyte M.B., Jackson K.G., Lovegrove J.A., Fielding B.A., Umpleb A.M. The effect of fructose feeding on intestinal triacylglycerol production and de novo fatty acid synthesis in humans. *Nutrients.* 2020; 12(6): 1781. DOI: 10.3390/nu12061781
7. Perrar I., Buyken A.E., Penczynski K.J., Remer T., Kuhnle G.G., Herder C., Roden M., Della Corte K., Nöthlings U., Alexy U. Relevance of fructose intake in adolescence for fatty liver indices in young adulthood. *Eur. J. Nutr.* 2021; 60(6): 3029–3041. DOI: 10.1007/s00394-020-02463-2
8. Ackerman Z., Oron-Herman M., Grozovski M., Rosenthal T., Pappo O., Link G., Sela B.A. Fructose-Induced Fatty Liver Disease Hepatic Effects of Blood Pressure and Plasma Triglyceride. Reduction. *Hypertension.* 2005.45:1012-1018, DOI: 10.1161/01.HYP.0000164570.20420.67
9. Pereira E.N.G.D.S, Silveiras R.R., Flores E.E.I., Rodrigues K.L., Ramos I.P., da Silva I.J., Machado M.P., Miranda R.A., Pazos-Moura C.C., Gonçalves-de-Albuquerque C.F., Faria-Neto H.C.C., Tibirica E., Daliry A. Hepatic microvascular dysfunction and increased advanced glycation end products are components of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0179654. DOI: 10.1371/journal.pone.0179654

### References

1. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 5: 16. DOI: 10.21037/tgh.2019.09.08
2. Brus T.V., Vasil'ev A.G., Trashkov A.P. [Main biochemical markers in non-alcoholic fatty liver disease (experimental study)]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy].* 2022; 66(1): 44–51. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.44-51 (in Russian)
3. Schmidt N.H, Svendsen P., Albarrán-Juárez J., Moestrup S.K., Bentzon J.B. High-fructose feeding does not induce steatosis or non-alcoholic fatty liver disease in pigs. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 2807. DOI: 10.1038/s41598-021-82208-1
4. Chang Y., Cho Y.K., Kim Y., Sung E., Ahn J., Jung H.S., Yun K.E., Shin H., Ryu S. Nonheavy Drinking and Worsening of Noninvasive Fibrosis Markers in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Cohort Study. *Hepatology.* 2019; 69(1): 64–75. DOI: 10.1002/hep.30170
5. Brus T.V., Vasil'ev A.G., Kravcova A.A., Vasil'eva A.V., Brus YU.S., Bannova A.V. [Biomodeling of liquid liver dystrophy of mixed etiology]. *Pediatr [Pediatrician].* 2023. 14(5): 25–32. DOI: 10.17816/PED625940 (in Russian)
6. Steenson S., Shojaee-Moradie F., Whyte M.B., Jackson K.G., Lovegrove J.A., Fielding B.A., Umpleb A.M. The effect of fructose feeding on intestinal triacylglycerol production and de novo fatty acid synthesis in humans. *Nutrients.* 2020; 12(6): 1781. DOI: 10.3390/nu12061781
7. Perrar I., Buyken A.E., Penczynski K.J., Remer T., Kuhnle G.G., Herder C., Roden M., Della Corte K., Nöthlings U., Alexy U. Relevance of fructose intake in adolescence for fatty liver indices in young adulthood. *Eur. J. Nutr.* 2021; 60(6): 3029–3041. DOI: 10.1007/s00394-020-02463-2
8. Ackerman Z., Oron-Herman M., Grozovski M., Rosenthal T., Pappo O., Link G., Sela B.A. Fructose-Induced Fatty Liver Disease Hepatic Effects of Blood Pressure and Plasma Triglyceride. Reduction. *Hypertension.* 2005.45:1012-1018, DOI: 10.1161/01.HYP.0000164570.20420.67
9. Pereira E.N.G.D.S, Silveiras R.R., Flores E.E.I., Rodrigues K.L., Ramos I.P., da Silva I.J., Machado M.P., Miranda R.A., Pazos-Moura C.C., Gonçalves-de-Albuquerque C.F., Faria-Neto H.C.C., Tibirica E., Daliry A. Hepatic microvascular dysfunction and increased advanced glycation end products are components of non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0179654. DOI: 10.1371/journal.pone.0179654

---

**Сведения об авторах:**

*Брус Татьяна Викторовна* — кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии с курсом иммунопатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0001-7468-8563>

*Васильев Андрей Глебович* — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии с курсом иммунопатологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0002-8539-7128>