

4

2018

MEDICINE
ISSN 2074-5982

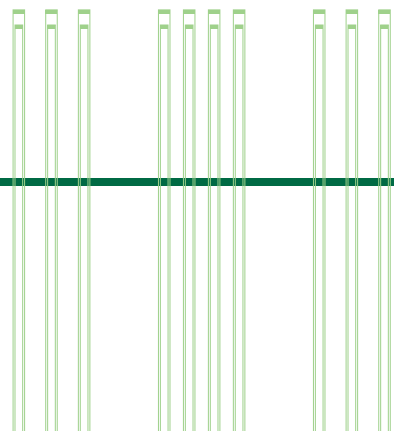
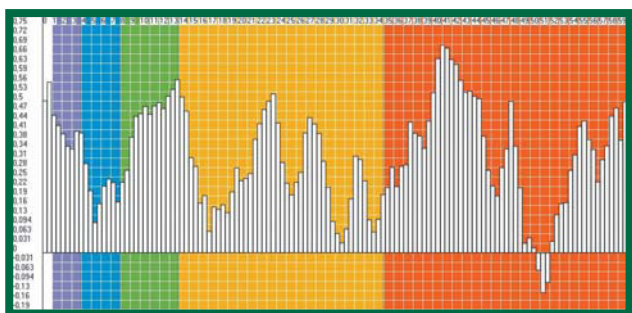
2018

4

БИОМЕДИЦИНА

Научный журнал

БИОМЕДИЦИНА



НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОМЕДИЦИНСКИХ
ТЕХНОЛОГИЙ
ФМБА РОССИИ

Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных

С.В. Оковитый¹, Е.Б. Шустов², М.А. Белых¹, Н.В. Кириллова¹,
О.М. Спасенкова¹, А.Г. Иванов¹, А.В. Караваева¹, А.В. Ткачева¹

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, Санкт-Петербург

² – ФГБУН «Институт токсикологии ФМБА России», Санкт-Петербург

Контактная информация: д.м.н. Оковитый Сергей Владимирович, sergey.okovity@pharminnotech.com

В статье представлен анализ некоторых изменений, происходящих в организме лабораторных мышей при моделировании неалкогольной жировой болезни печени путем 6-месячного скормливания им высоколипидного пищевого рациона. Показано, что в течение этого периода в организме животных происходит перестройка метаболизма на преимущественную утилизацию липидов, сопровождающуюся выраженным нарушением углеводного обмена в печени и скелетных мышцах, активацией процессов перекисного окисления липидов при индукции активности каталазы, накоплении основных карбонильных групп белков. Выявленная перестройка энергетического обмена дополняется двукратным снижением физической работоспособности животных в тесте вынужденного плавания с грузом, двигательной активности и мотивационного компонента ориентировочной реакции в тесте «Открытое поле». Наиболее отчетливое ухудшение состояния животных происходит в конце 3-4-го месяца моделирования стеатоза печени.

Ключевые слова: биологическое моделирование, неалкогольная жировая болезнь печени, стеатоз печени, энергетический обмен.

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП) является одним из наиболее распространенных заболеваний гепатобилиарной системы. В США на ее долю приходится 20-30% в структуре популяции, в азиатских странах – 12-24% [10, 21]. По результатам Всероссийского эпидемиологического исследования, которое проводилось в 16-ти городах РФ в 2013-2014 гг. и в котором приняли участие более 50 тыс. пациентов, НЖБП выявлена у 37,3% россиян, побывавших на первичном приеме у врача [4]. Согласно прогнозам экспертов ВОЗ, к 2020 г. доля взрослого

населения с ожирением в США составит 45-50%, странах Европейского союза – 30-40%, латиноамериканских странах – 20% [10, 11].

Важную роль в изыскании подходов к профилактике и лечению НЖБП играет использование приемлемых экспериментальных моделей ее формирования. Оптимальная модель НЖБП на животных должна отражать все гистопатологические и патофизиологические особенности поражения печени, встречающиеся у человека при рассматриваемом заболевании [16]. Соответственно, в печени у животных с моделью НЖБП должен выявляться стеатоз,

внутридольковое воспаление, гепатоцеллюлярная баллонная дистрофия, перисинусоидальный фиброз. Кроме того, должны наблюдаться метаболические нарушения – такие, как инсулинорезистентность, гипергликемия, дислипидемия, изменение адипокинового профиля, развитие ожирения [1, 20]. У животных НЖБП может быть воспроизведена разными способами, которые приводят к изменению жирового обмена в печени – дисбалансу между липогенезом и липолизом. Эти способы можно разделить на две обширные группы: развитие патологии печени, вызванной генетической мутацией (специализированные линии животных), и формирование НЖБП в фенотипе. Последняя группа объединяет модели, индуцированные алиментарным фактором.

Формирование диет-индуцированных моделей широко применяется в области экспериментального моделирования НЖБП. Использование метионин-холин-дефицитной (МХД) диеты позволяет моделировать тяжелую степень стеатоза печени и некротические изменения с воспалительным ответом уже на 2-й неделе эксперимента с дальнейшим прогрессированием до септального и препортального фиброза [12]. При всем сходстве патологических изменений в печени между НЖБП, вызванной МХД диетой у крыс, и клиническим течением НЖБП человека отмечаются некоторые различия. Так, при экспериментальном моделировании заболевания у крыс, содержащихся на МХД диете, наблюдается значительная потеря мышечной и жировой массы (до 40% за 10 недель), у животных не возникает инсулинорезистентность. Кроме того, заболевание развивается не у всех

животных, содержащихся на экспериментальном рационе, может наблюдаться резистентность к МХД диете.

Поскольку НЖБП рассматривается как печеночное проявление метаболического синдрома, данный факт предполагает использование модели с применением рациона, богатого фруктозой. При содержании животных на диете, включающей 70% фруктозы, на 5-й неделе эксперимента у них развиваются макровезикулярный стеатоз и внутридольковое воспаление, увеличивается масса печени [9, 15]. Однако тканевое расположение включений жиров при этой модели отличается от того, что встречается при НЖБП человека.

Диета с высоким содержанием жиров также достаточно широко используется для формирования стеатоза и стеатогепатита у животных [1, 9, 15, 16, 20]. НЖБП, вызванная в эксперименте воздействием высокожировой диеты, по своим основным характеристикам сходна с этим заболеванием у человека. У животных, содержащихся на такой диете, помимо гистопатологических изменений, характерных для НЖБП у людей, развиваются ожирение, дислипидемия, инсулинорезистентность. У всех экспериментальных животных высокожировой рацион вызывает формирование поражения печени. Он может приводить к различной степени развития стеатоза, воспаления и фиброза, что определяется характером рациона (процентное содержание и состав жиров) и продолжительностью его применения. Так, при воздействии высокожирового рациона, включающего по 10% растительного масла, сала и 2% холестерина от общего состава рациона, у крыс в течение 12-ти недель происходит жировая инфильтра-

ция печени и формируется стеатоз [13]. Недостатком данного метода является низкая вероятность развития глубоких структурных повреждений печени, способствующих формированию стеатогепатита и фиброза.

Известна модель C.S. Lieber и соавт., при которой НЖБП формируется путем интрагастрального кормления животных эмульсией с высоким содержанием растительных жиров (71% от общего рациона). При данной экспериментальной модели на 21-е сут происходит формирование стеатоза, воспалительная инфильтрация печени на фоне окислительного стресса и инсулинорезистентности [18].

В основе модели, разработанной для крыс популяции линий Wistar, лежит пролонгированное воздействие на животных (в течение 180-ти сут) высокожировой диеты, обогащенной топленым говяжьим салом (19%) и холестерином (2% от общего рациона) [5].

У мышей линии C57Bl/6 комбинированная диета, включающая 63% стандартного корма, 19% животного жира, 10% сахарозы и 8% изолированного соевого белка, не только приводила к жировому повреждению печени, но и способствовала ухудшению обучаемости и памяти животных [22].

Цель работы – выявить закономерности динамики метаболических и функциональных показателей у лабораторных животных в процессе моделирования НЖБП, позволяющие оценивать специфическую эффективность профилактического и лечебного действия лекарственных средств, влияющих на процессы печеночной липодистрофии.

Материалы и методы

Лабораторные животные (мыши линии C57Bl/6) были получены из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.). Содержание животных и экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

После завершения 14-дневного карантина животные были рандомизированы на две группы: интактную и с моделированием жировой болезни печени.

Для **моделирования стеатоза печени** была использована гиперкалорийная высокожировая диета при избытке легкоусваиваемых углеводов, которая создавалась путём добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%) [22]. Такая диета оказывает влияние на жировой и углеводный обмен животных, способствуя развитию у них стеатоза печени и формированию дисгликемии. Общая длительность воздействия – 24 недели.

Биологический материал для исследования (кровь, ткани) у животных группы с моделированием жировой болезни печени забирали на следующие сутки после прекращения диетических мероприятий. По окончании эксперимента у наркотизированных хлоралгидратом (350 мг/кг, «Merck KGaA», Германия) животных забирали кровь методом кардиальной пункции в пробирки с активатором свертывания крови. После отстаивания (30 мин) кровь центрифугировали 10 мин при 1000 об./мин,

отделяли получившуюся сыворотку, затем вторично центрифугировали при 4000 об./мин 15 минут. Полученную сыворотку переносили во вторичные пробирки, которые затем загружали в анализатор. На биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ («Awareness Technology», США) и Эрба Лахема («Erba Lachema», Чехия) определяли **активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), уровни общего холестерина, липопротеидов низкой плотности и триглицеридов, концентрацию глюкозы.**

Кроме того, в сыворотке крови определяли **содержание нейтральных и основных карбонильных групп белков**, а в эритроцитах – **активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ).** Карбонильные группировки белков определяли по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием окрашенных гидразонов по методу Levine R., в модификации [3, 17, 19]. Определение активности каталазы крови проводили на основании способности перекиси водорода образовывать с солями молибдата стойкие окрашенные комплексы желтого цвета [14]. Активность супероксиддисмутазы определяли по скорости аутоокисления кверцетина в аэробных условиях [7].

В ткани печени определяли **содержание суммарных липидов и гликогена;** в скелетных мышцах – гликогена. Гликоген в тканях печени и мышц определяли по методике [2]. Количественное определение общих липидов в ткани печени проводили по методу Фолча [8].

В качестве системного маркера состояния здоровья животных и их функционального резерва во время моделирования НЖБП в динамике в конце каждого месяца приема высокожирового рациона использовали показатель физической работоспособности мышей в **тесте вынужденного плавания с грузом 7% от массы тела животных.** Спонтанные поведенческие характеристики в динамике оценивали по результатам выполнения животными **тестов «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «Открытое поле» (ООО «НПК Открытая наука», Россия) [6].**

Статистическую обработку результатов проводили методами описательной статистики, дисперсионного, корреляционного и дискриминантного анализов с помощью пакета «Анализ данных» процессора таблиц Microsoft Excel и специализированной программы статистической обработки данных Statistica v.10. Для проведения многомерных статистических исследований массивы данных предварительно преобразовывали в Z-оценки, имеющие нормальное статистическое распределение.

Результаты и их обсуждение

Для анализа значимости влияния уровня липидов печени на другие метаболические показатели был выполнен однофакторный дисперсионный анализ, для которого животные интактной группы были разбиты на 3 подгруппы в зависимости от уровня содержания липидов в печени: с низким содержанием (менее 0,6 мг/г ткани), средним (0,6-0,7 мг/г ткани), высоким (более 0,7 мг/г ткани). Аналогичная разбивка массива проводилась и в отношении уровня холестерина крови, при этом границами сред-

него уровня были 1,0 и 1,3 ммоль/л. Результаты анализа гипотезы о роли липодистрофии печени и гиперхолестеринемии представлены в табл. 1.

Установлено, что фактор высокого содержания липидов в печени у интактных животных статистически достоверно влияет только на показатель активности

АлАТ, которая монотонно возрастает от животных с низким уровнем липидов печени к животным с высоким уровнем липидов. Вероятно, этот метаболический показатель может быть использован как косвенный маркер процессов липодистрофии печени, связанных с высоким накоплением липидов в этом органе.

Таблица 1

Результаты дисперсионного анализа влияния уровня липидов печени и гиперхолестеринемии на метаболические показатели интактных животных

Показатель	Фактор высокого содержания липидов в печени		Фактор гиперхолестеринемии	
	Коэффициент детерминации, D	Достоверность, p	Коэффициент детерминации, D	Достоверность, p
Липиды печени, мг/г ткани			0,16	0,26
Холестерин крови, ммоль/л	0,03	0,79		
ЛПНП крови, ммоль/л	0,10	0,44	0,007	0,94
Триглицериды крови, ммоль/л	0,02	0,84	0,69	8×10⁻⁵
Глюкоза крови, ммоль/л	0,14	0,31	0,19	0,19
Гликоген печени, мг/г ткани	0,05	0,64	0,09	0,45
Гликоген мышц, мг/г ткани	0,19	0,17	0,10	0,43
АлАТ, МЕ/л	0,07	0,54	0,34	0,04
АсАТ, МЕ/л	0,34	0,04	0,27	0,08
ГГТП, МЕ/л	0,08	0,51	0,28	0,07
СОД эритроцитов, усл.ед. (%) / мл цельной крови	0,10	0,43	0,06	0,59
Каталаза эритроцитов, ммоль Н ₂ О ₂ ×10 ³ / мин×мл цельной крови	0,26	0,09	0,02	0,82
Нейтральные карбонильные группы белков крови, D ₃₇₀ / мг белка	0,01	0,92	0,12	0,34
Основные карбонильные группы белков крови, D ₄₃₀ / мг белка	0,10	0,40	0,01	0,91

Фактор гиперхолестеринемии существенно влияет на содержание триглицеридов плазмы крови (монотонное возрастание) и активность АлАТ (монотонное снижение). На уровне статистических тенденций выявлено умеренное влияние гиперхолестеринемии на активность ГГТП (возрастание в группе с высоким уровнем холестерина) и АсАТ плазмы крови (монотонное снижение).

Результаты исследования метаболических последствий моделирования НЖБП представлены в табл. 2.

При анализе табл. 2 обращает на себя внимание, что моделирование НЖБП у животных проявилось не столько в изменении показателей липидного, сколько углеводного обмена, что свидетельствует о завершении к моменту исследования перестройки метаболи-

Таблица 2
Влияние моделирования НЖБП на метаболические показатели животных

Показатель	Единица измерения	Значения в группах (M±m)		Влияние НЖБП, %	Достоверность различий, p
		интактные	НЖБП		
В плазме крови					
Глюкоза	ммоль/л	8,3±0,8	5,7±0,7	-32	0,04
АлАТ	МЕ/л	22,9±2,6	24,3±4,6	+6	0,77
АсАТ	МЕ/л	65,7±7,3	81,1±14,2	+23	0,31
ГГТП	МЕ/л	0,36±0,09	0,25±0,22	-29	0,64
Общий холестерин	ммоль/л	1,24±0,09	1,12±0,09	-9	0,40
ЛПНП	ммоль/л	0,23±0,03	0,19±0,01	-18	0,35
Триглицериды	ммоль/л	0,39±0,05	0,28±0,05	-27	0,20
Нейтральные карбонильные группы	D ₃₇₀ / мг белка	2,18±0,17	2,48±0,12	+13	0,20
Основные карбонильные группы	D ₄₃₀ / мг белка	0,62±0,06	1,43±0,07	+130	10⁻⁷
В эритроцитах					
СОД	усл.ед. (%) / мл цельной крови	34,2±1,70	36,3±0,77	+6	0,31
Каталаза	ммоль H ₂ O ₂ × 10 ³ / мин × мл цельной крови	22,5±0,50	30,6±0,60	+36	6 × 10⁻⁹
В тканях					
Липиды печени	мг/г ткани	0,06±0,01	0,07±0,01	+10	0,12
Гликоген печени	мг/г ткани	0,90±0,06	0,53±0,05	-41	0,005
Гликоген скелетных мышц	мг/г ткани	0,40±0,02	0,27±0,02	-33	4 × 10⁻⁴

ческих процессов в организме мышей. Так, исследуемые показатели жирового обмена не имели статистически достоверных отличий от группы интактных животных, а значения их показателей в плазме были даже несколько ниже: например, холестерина – 91%, триглицеридов – 73%, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) – 82%. Выявленный прирост уровня липидов в печени (+10%) также не был статистически достоверным. В то же время содержание гликогена в печени и мышцах животных достоверно снижалось на 41 и 33% соответственно, уровень глюкозы в крови снижался на 32%. Обращает на себя внимание также накопление в крови мышей основных карбонильных групп (в 2,3 раза), что является маркером активного протекания процессов перекисного и свободно-радикального окисления. Об активации процессов перекисного окисления липидов также свидетельствует субстратная активация каталазы (+36%).

Корреляционный анализ показал, что с уровнем липидов печени связаны такие показатели, как содержание гликогена в печени и мышцах, АсАТ, общий холестерин, триглицериды, а также содержание основных карбонильных групп белков плазмы. С уровнем глюкозы крови оказываются связанными активность СОД, ГГТП, АсАТ, содержание триглицеридов. ЛПНП и каталаза практически не взаимодействуют с остальными показателями, содержание нейтральных карбонильных групп коррелирует только с уровнем основных карбонильных групп, а АлАТ – с активностью АсАТ. Особого внимания заслуживает тесный кластер положительных корреляционных

связей уровня липидов печени с содержанием гликогена как в печени, так и в скелетных мышцах. Отсутствие связей содержания гликогена в тканях от уровня глюкозы в крови, характерных для интактных животных, свидетельствует о возникновении глубокого нарушения обменных процессов в клетках.

Изменения структуры корреляционных связей метаболических показателей при формировании жировой болезни печени представлены в табл. 3.

Моделирование НЖБП проявлялось разрушением характерных для группы интактных животных корреляционных связей между метаболическими показателями. Причем разрушались преимущественно связи с липидами печени и ЛПНП, что подтверждает существенные повреждения механизмов захвата липопротеидов тканями при моделировании жировой болезни.

Специфичность перестройки обменных процессов при моделировании НЖБП у лабораторных животных отражает появление новых корреляционных связей, не характерных для интактных животных. Достаточно часто новые связи образуются с показателями, характеризующими жировой обмен (липиды печени, холестерин, триглицериды, ЛПНП), уровень карбонильных групп белков плазмы крови, трансаминаз, глюкозы, СОД. Тем самым корреляционный анализ показывает, что именно с этими показателями сопряжены более напряженно протекающие метаболические процессы.

При этом многие присутствующие в интактной группе корреляционные связи остаются в той или иной степени и

Таблица 3

Перестройка корреляционных связей метаболических показателей под влиянием моделирования НЖБП

Показатель А	Показатель Б	Коэффициенты корреляции		Эффект моделирования НЖБП
		интактные животные	НЖБП	
Липиды печени	Каталаза	+0,58	*	разрушение
	Холестерин	+0,68	+0,80	усиление
	Триглицериды	+0,50	+0,74	усиление
	АлАТ	-0,52	*	разрушение
	Глюкоза	*	-0,49	появление
	АсАТ	*	+0,60	усиление
	Нейтр. КГ	*	-0,47	появление
	Осн. КГ	*	+0,69	появление
	Гликоген печени	*	+0,79	появление
	Гликоген мышц	*	+0,53	усиление
Холестерин	Триглицериды	+0,88	+0,76	сохранение
	АлАт	-0,66	-0,53	сохранение
	Осн. КГ	*	+0,76	появление
	Глюкоза	*	+0,77	усиление
	ГГТП	*	+0,69	усиление
	АсАТ	*	+0,82	появление
АлАТ	ГГТП	-0,57	*	разрушение
	АсАт	*	+0,88	появление
	Нейтр. КГ	*	-0,68	появление
	Осн. КГ	*	-0,55	появление
АсАТ	ГГТФ	-0,64	-0,59	сохранение
	Нейтр. КГ	*	-0,63	появление
	Осн. КГ	*	-0,73	появление
	Глюкоза	*	-0,67	усиление
	ЛПНП	*	-0,51	инверсия
	Триглицериды	*	-0,54	появление
ГГТП	СОД	*	+0,72	появление
	Каталаза	*	+0,57	усиление
	Глюкоза	*	+0,53	появление
ЛПНП	АлАТ	*	-0,55	появление
	АсАТ	+0,40	-0,51	инверсия
	Глюкоза	-0,66	*	разрушение
Гликоген мышц	Глюкоза	+0,58	*	разрушение
	Нейтр. КГ	+0,49	-0,39	инверсия
	Триглицериды	-0,58	-0,62	сохранение
	СОД	*	+0,61	появление
	Гликоген печени	*	+0,81	появление
Нейтр. КГ	Осн. КГ	+0,96	+0,78	сохранение
	Триглицериды	*	+0,65	появление
Осн. КГ	СОД	*	+0,57	усиление
	Глюкоза	*	+0,78	усиление
	Триглицериды	*	+0,82	появление
СОД	Глюкоза	*	+0,66	появление

Примечание: * – коэффициент корреляции статистически не достоверен.

при моделировании жировой болезни (в табл. 3 – сохранение, усиление, ослабление). Следовательно, возникающая у животных перестройка метаболизма при моделировании НЖБП не является для них критической. Вероятно, происходящие перестройки энергопродуцирующих механизмов при этом в достаточной степени обеспечиваются субстратами и не вызывают энергодиффицита.

Сформированное многомерное пространство метаболических показателей двух состояний животных – интактное (здоровые животные) и модельное (экспериментальная НЖБП) – было подвергнуто пошаговому дискриминантному анализу. Были получены две группы коэффициентов (стандартизированные – для z-оценок и свободные – для натуральных оценок) для линейной дискриминантной функции, дифференцирующей положение конкретного наблюдения на шкале расстояний между центроидами состояний (табл. 4).

Таким образом, линейная дискриминантная функция, дифференцирующая по метаболическим показателям состояние экспериментальной НЖБП от интактных животных, имеет следующий вид:

$$F1=3,73 \times X2 + 3,72 \times X3 - 1,91 \times X1 - 80,21 \times X4 + 5,62,$$

где X1 – основные карбонильные группы, X2 – нейтральные карбонильные группы, X3 – гликоген печени, X4 – липиды печени.

Положительные значения этой функции означают, что экспериментальная НЖБП не сформирована, а отрицательные – что сформирована. Чем дальше конкретное расчетное значение от нулевого, тем более показательным является положение экспериментального наблюдения в соответствующей группе (здоровых или больных) животных.

При моделировании НЖБП каждое животное в конце каждого месяца моделирования подвергалось плавательному

Таблица 4
Коэффициенты линейной дискриминантной функции, разделяющей состояние интактных животных и животных с экспериментальной НЖБП

Показатель	Коэффициенты линейной дискриминантной функции	
	стандартизированные	свободные
Основные карбонильные группы (X1)	-2,12	-11,91
Нейтральные карбонильные группы (X2)	+1,64	+3,73
Гликоген печени (X3)	+0,66	+3,72
Липиды печени (X4)	-0,69	-80,26
Константа (b)	0	+5,62

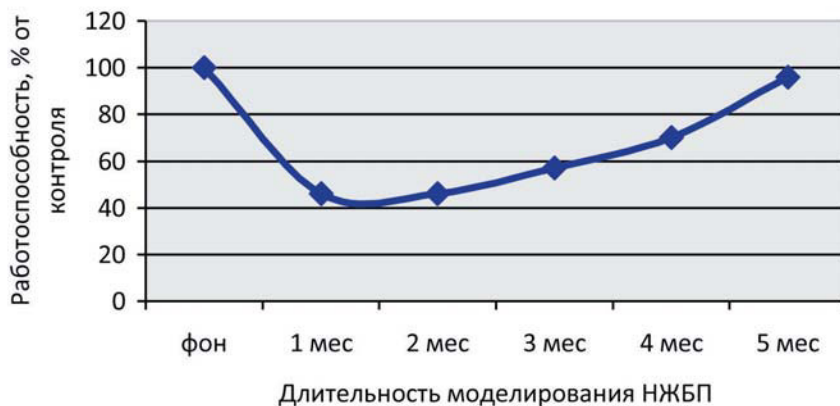


Рис. 1. Динамика показателя физической работоспособности животных в процессе моделирования НЖБП (плавательный тест, % от уровня интактных животных).

тесту на работоспособность. Динамика длительности вынужденного плавания с грузом отражена на рис. 1.

Установлено, что перевод животных с обычного рациона питания на высокожировую диету при моделировании НЖБП вызывает достаточно быстрое (к концу первого месяца) ухудшение функционального состояния, проявляющееся снижением работоспособности в 2 раза. Однако в последующем, с 4-го мес. такого питания, начинается постепенное восстановление физической работоспособности, что может свидетельствовать об адаптации организма мышей к такой диете. Вероятно, к этому сроку завершаются основные процессы перестройки энергетического обмена на преимущественную утилизацию липидов и восстанавливается способность к адекватному энергообеспечению мышечной деятельности. Дисперсионный анализ показателя физической работоспособности животного показал значимость фактора «Длительность моделирования» (коэффициент детерминации

$D=0,248$, $p=0,0009$) в вариативности времени предельного плавания. Анализ частот распределения данного показателя в группе контроля и при моделировании НЖБП показал, что при этом происходит полное исчезновение животных с высокой работоспособностью и переход существенной части животных со средним уровнем физической работоспособности в группу животных с низкой оценкой этого показателя (рис. 2).

Необходимо отметить, что моделирование НЖБП высокожировой диетой практически не влияет на базовые характеристики спонтанного поведения животных в тестах «ПКЛ» и «Открытое поле» (табл. 5).

Как следует из табл. 5, в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» моделирование НЖБП не сопровождалось какими-либо неблагоприятными изменениями поведенческой активности животных. В поздние сроки (4-5 мес.) отмечалась адаптация животных к условиям исследования, что проявлялось в положительной динамике их активности

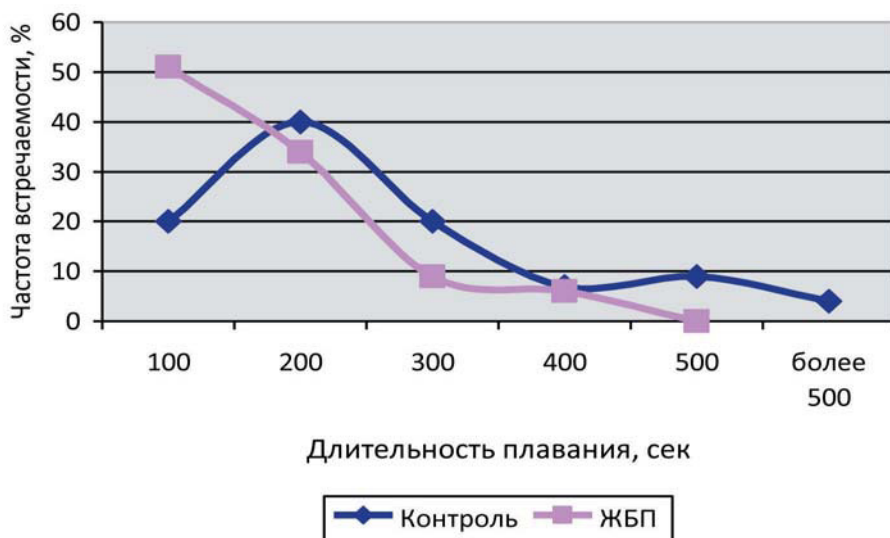


Рис. 2. Частотные кривые распределения длительности вынужденного плавания в группе контроля и при моделировании НЖБП.

Таблица 5
Динамика базовых характеристик спонтанного поведения животных

Показатель, ед. изм.	Центроиды групп по месяцам моделирования						D	p
	фон	1	2	3	4	5		
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»								
Вр ЦП, с	12	9	10	6	17	26	0,06	0,44
Вр ЗР, с	138	165	159	166	160	144	0,07	0,34
Вр ОР, с	30	6	11	8	3	10	0,08	0,31
ЛППЗОР, с	121	108	96	99	93	126	0,02	0,89
КЗ ОР, шт	0,8	0,8	1,0	0,8	0,7	0,3	0,04	0,75
КЗ ЗР, шт	2,1	2,1	2,8	2,2	2,6	2,7	0,02	0,86
Грумминг, шт	2,4	2,2	2,4	2,9	3,8	4,8	0,38	2×10⁻⁶
ЭЛ, балл	0,2	0,7	0,3	0,2	0,5	0,2	0,12	0,10
ПИА, балл	5,7	7,2	8,0	4,6	12,0	13,0	0,20	0,007
КФ Активность, балл	2,9	3,4	3,7	3,0	4,7	4,8	0,17	0,02
КФ Стресс, балл	1,1	1,5	1,5	1,5	1,5	1,3	0,08	0,31
Тест «Открытое поле»								
Двигательная активность, балл	106	60	30	34	24	39	0,43	6×10⁻⁸
Ориентировочная реакция, балл	5,7	2,2	3,5	2,7	1,2	2,0	0,10	0,14
Мотивационный компонент ориентировочной реакции, балл	5,8	5,6	2,7	3,9	1,8	5,2	0,14	0,05

Примечания: Вр – время, ЦП – центральное положение, ЗР – закрытый рукав, ОР – освещенный рукав, ЛППЗОР – латентный период первого захода в освещенный рукав, КЗ – количество заходов, ЭЛ – эмоциональная лабильность, ПИА – поисково-исследовательская активность, КФ – комплексный фактор, D – коэффициент детерминации, p – уровень достоверности.

(ПИА, КФ Активность) и комфортности (груминг). В тесте «Открытое поле» отмечено достоверное снижение двигательной активности и мотивационного компонента ориентировочной реакции с частичным восстановлением в завершающем периоде моделирования. Восстановление этих показателей начинается с 5-го мес. моделирования НЖБП.

Заключение

Проведенное исследование показало, что применение гиперкалорийной высокожировой диеты (6 мес.) при избытке легкоусваиваемых углеводов, которая создавалась путём добавления к стандартному корму (63%) топленого свиного жира (19%), сахарозы (10%) и изолированного соевого белка (8%), формирует у мышей линии C57Bl/6 неалкогольную жировую болезнь печени. Моделирование НЖБП у лабораторных животных проявилось не столько в изменении показателей липидного, сколько – углеводного обмена, что свидетельствует о завершении к моменту исследования перестройки метаболических процессов в организме мышей.

Показатели липидного обмена в крови животных нечувствительны к формированию НЖБП. Для лабораторной верификации этого патологического процесса необходимо изучение липидов и гликогена печени.

Выявленные закономерности динамики метаболических показателей у лабораторных животных в процессе моделирования НЖБП могут быть использованы для доклинической оценки специфических механизмов профилактического или лечебного действия лекарственных средств, влияющих на процессы печеночной липодистрофии.

Список литературы

1. *Бивалькевич Н.В., Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П.* Методические подходы к экспериментальному моделированию неалкогольной жировой болезни печени // РЖГГК. – 2015. – № 4. – С. 39-45.
2. *Давченко Е.О., Чиркин А.А.* Новые методические подходы к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – № 3. – С. 25-28.
3. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов Г.Е.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.
4. *Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Тихонов И.Н., Широкова Е.Н., Буверов А.О., Дранкина О.М., Шульпекова Ю.О., Цуканов В.В., Маммаев С.Н., Маев И.В., Пальгова Л.К.* Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации // РЖГГК. – 2016. – № 2. – С. 24-42.
5. *Караман Ю.К., Новгородцева Т.П., Гвозденко Т.А.* Моделирование неалкогольного стеатогепатита // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 378-382.
6. *Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б.* Очерки спортивной фармакологии. Т. 1. Векторы экстраполяции. – М.-СПб.: Айсинг. – 2013. – 288 с.
7. *Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.
8. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. Прохоровой. – Л.: ЛГУ. – 1982. – 272 с.
9. *Anstee Q.M., Goldin R.D.* Mouse models in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research // Int. J. Exp. Pathol. – 2006. – V. 87, No. 1. – Pp. 1-16.
10. *Chalasan N., Younossi Z., Lavine J.E., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison S.A., Brunt E.M., Sanyal A.J.* The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease:

- Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases // *Hepatology*. – 2018. – V. 67, No. 1. – Pp. 328-357.
11. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease // *J. Hepatol.* – 2016. – V. 64, No. 6. – Pp. 1388-1402.
 12. **Fan J.G., Qiao L.** Commonly used animal models of nonalcoholic steatohepatitis // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* – 2009. – V. 8, No. 3. – Pp. 233-240.
 13. **Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., Tia L.Y., Ding X.D., Li M.S., Wang G.L.** Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – V. 9, No. 9. – Pp. 2045-49.
 14. **Goth L.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // *Clinica Chimica Acta.* – 1991. – V. 196, No. 2-3. – Pp. 143-152.
 15. **Larter C., Yeh M.** Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2008. – V. 23, No. 11. – Pp. 1635-48.
 16. **Lau J.K., Zhang X., Yu J.** Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances // *J. Pathol.* – 2017. – V. 241, No. 1. – Pp. 36-44.
 17. **Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 186. – Pp. 464-478.
 18. **Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., Xu Y., Cao Q., Ren C., Ponomarenko A., DeCarli L.M.** Model of nonalcoholic steatohepatitis // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2004. – V. 79, No. 3. – Pp. 502-509.
 19. **Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R.** Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88, No. 23. – Pp. 10540-43.
 20. **Stephenson K., Kennedy L., Hargrove L., Demerville J., Thomson J., Alpini G., Francis H.** Updates on dietary models of nonalcoholic fatty liver disease: current studies and insights // *Gene Expr.* – 2018. – V. 18, No. 1. – Pp. 5-17.
 21. **Watanabe S., Hashimoto E., Ikejima K., Uto H., Ono M., Sumida Y., Seike M., Takei Y., Takehara T., Tokushige K., Nakajima A., Yone-da M., Saibara T., Shiota G., Sakaida I., Nakamura M., Mizuta T., Tsubouchi H., Sugano K., Shimosegawa T.** Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis // *Hepatol. Res.* – 2015. – V. 45, No. 4. – Pp. 363-377.
 22. **Xu B.L., Wang R., Ma L.N.** Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – S. 759803. – Pp. 1-6.

References

1. **Bivalkevich N.V., Denisenko Yu.K., Novgorodceva T.P.** Metodicheskie podhody k eksperimentalnomu modelirovaniyu nealkogolnoy zhirovoy bolezni pecheni [Methodical approaches to experimental modeling of non-alcoholic fatty liver disease]. RZhGGK [Russian J. of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology]. 2015. No. 4. Pp. 39-45. (In Russian).
2. **Davchenko E.O., Chirkin A.A.** Novye metodicheskie podhody k opredeleniyu koncentracii glikogena v tkanyah i nekotorye kommentarii po interpretacii rezultatov [New methodological approaches to determining the concentration of glycogen in tissues and some comments on the interpretation of results]. Sudebno-medicinskaya ekspertiza [Forensic-medical examination]. 2010. No. 3. Pp. 25-28. (In Russian).
3. **Dubinina E.E., Burmistrov S.O., Hodov D.A., Porotov G.E.** Okislitel'naya modifikatsiya belkov sivorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya [Oxidative modification of human serum proteins, method of its determination]. Voprosi med. himii [Questions of medical chemistry]. 1995. V. 41, No. 1. Pp. 24-26. (In Russian).
4. **Ivashkin V.T., Maevskaya M.V., Pavlov Ch.S., Tihonov I.N., Shirokova E.N., Bueverov A.O., Drapkina O.M., Shulpekova Yu.O., Cukanov V.V., Mammaev S.N., Maev I.V., Palgova L.K.** Klinicheskie rekomendatsii po diagnostike i lecheniyu nealkogolnoy zhirovoy bolezni pecheni Rossiyskogo obshchestva po izucheniyu pecheni i Rossiyskoy gastroenterologicheskoy associacii [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease of the Russian Society for the Study of the Liver and the Russian Gastroenterological Association]. RZhGGK [Russian J. of Gastroenterology, Hepatology,

- Coloproctology]. 2016. No. 2. Pp. 24-42. (In Russian).
5. **Karaman Yu.K., Novgorodceva T.P., Gvozdenko T.A.** Modelirovanie nealkogolnogo steatogepatita [Modeling of non-alcoholic steatohepatitis]. Byull. eksper. biol. i med. [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2012. V. 153, No. 3. Pp. 378-382. (In Russian).
 6. **Karkischenko N.N., Uyba V.V., Karkischenko V.N., Shustov E.B.** Ocherki sportivnoy farmakologii. T. 1. Vektori erctrapolyacii [Sketches of sports pharmacology. Vol. 1. Vectors of extrapolation]. Moscow - Saint-Petersburg: Aysing. 2013. 288 p. (In Russian).
 7. **Kostyuk V.A., Potapovich A.P., Kovaleva Zh.V.** Prostoy i chuvstvitelnyy metod opredeleniya aktivnosti superoksiddismutasi, osnovanny na reakcii oksileniya kvverticina [A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the reaction of oxidation of quercetin]. Vopr. med. himii [Questions of medical chemistry]. 1990. V. 36, No. 2. Pp. 88-91. (In Russian).
 8. Metodi biochimicheskikh issledovaniy (lipidnyy i energeticheskyy obmen) [Methods of biochemical research (lipid and energy metabolism)]. Ed. by M. Prohorova. Leningrad: LGU. 1982. 272 p. (In Russian).
 9. **Anstee Q.M., Goldin R.D.** Mouse models in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. Int. J. Exp. Pathol. 2006. V. 87, No. 1. Pp. 1-16.
 10. **Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., Charlton M., Cusi K., Rinella M., Harrison S.A., Brunt E.M., Sanyal A.J.** The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. Hepatology. 2018. V. 67, No. 1. Pp. 328-357.
 11. European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. J. Hepatol. 2016. V. 64, No. 6. Pp. 1388-1402.
 12. **Fan J.G., Qiao L.** Commonly used animal models of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 2009. V. 8, No. 3. Pp. 233-240.
 13. **Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., Tia L.Y., Ding X.D., Li M.S., Wang G.L.** Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. World J. Gastroenterol. 2003. V. 9, No. 9. Pp. 2045-49.
 14. **Goth L.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta. 1991. V. 196, No. 2-3. Pp. 143-152.
 15. **Larter C., Yeh M.** Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. J. Gastroenterol. Hepatol. 2008. V. 23, No. 11. Pp. 1635-48.
 16. **Lau J.K., Zhang X., Yu J.** Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. J. Pathol. 2017. V. 241, No. 1. Pp. 36-44.
 17. **Levine R.L., Garland D., Oliver C.N.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990. V. 186. Pp. 464-478.
 18. **Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., Xu Y., Cao Q., Ren C., Ponomarenko A., DeCarli L.M.** Model of nonalcoholic steatohepatitis. Am. J. Clin. Nutr. 2004. V. 79, No. 3. Pp. 502-509.
 19. **Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R.** Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88, No. 23. Pp. 10540-43.
 20. **Stephenson K., Kennedy L., Hargrove L, Demieville J., Thomson J., Alpini G., Francis H.** Updates on dietary models of nonalcoholic fatty liver disease: current studies and insights. Gene Expr. 2018. V. 18, No. 1. Pp. 5-17.
 21. **Watanabe S., Hashimoto E., Ikejima K., Uto H., Ono M., Sumida Y., Seike M., Takei Y., Takehara T., Tokushige K., Nakajima A., Yoneda M., Saibara T., Shiota G., Sakaida I., Nakamura M., Mizuta T., Tsubouchi H., Sugano K., Shimosegawa T.** Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis. Hepatol. Res. 2015. V. 45, No. 4. Pp. 363-377.
 22. **Xu B.L., Wang R., Ma L.N.** Effects of caloric intake on learning and memory function in juvenile C57BL/6J mice. Biomed. Res. Int. 2015. S. 759803. Pp. 1-6.

Modeling of non-alcoholic liver steatosis: features of metabolic changes in the body of laboratory animals

S.V. Okovitiy, E.B. Shustov, M.A. Belyh, N.V. Kirillova, O.M. Spasenkova,
A.G. Ivanov, A.V. Karavaeva, A.V. Tkacheva

The article presents an analysis of some changes occurring in laboratory mice after modeling of non-alcoholic fatty liver disease by 6-month feeding them with a high-lipid diet. It has been shown that during this period, metabolism is reorganized in the body for the primary utilization of lipids, accompanied by severe carbohydrate metabolism in the liver and skeletal muscles, activation of lipid peroxidation processes in the induction of catalase activity, and accumulation of the main carbonyl groups of proteins. The revealed restructuring of energy metabolism is supplemented by a two-fold decrease in the physical performance of animals in the test of forced swimming with a load, motor activity and motivational component of the indicative reaction in the «open field» test. The most distinct deterioration of the animals occurs at the end of 3-4 months of modeling of liver steatosis.

Key words: biological modeling, non-alcoholic fatty liver disease, liver steatosis, energy metabolism.