

РОЛЬ ММП-2 И ММП-9 В РЕАЛИЗАЦИИ СВЯЗИ ПРОЦЕССОВ ВОСПАЛЕНИЯ, ФИБРОЗА И АПОПТОЗА ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПЛАЗМЕННОГО УРОВНЯ ИХ АКТИВНЫХ ФОРМ

© 2024 И.В. Курбатова^{1*}, Л.В. Топчиева¹, О.П. Дуданова², А.А. Шиповская²

¹ ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Институт биологии,
185910 Петрозаводск, Республика Карелия, Россия; электронная почта: irina7m@yandex.ru

² ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет»,
Медицинский институт имени профессора А.П. Зильбера,
185910 Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Поступила в редакцию 02.04.2024

После доработки 14.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

Матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 играют важную роль в патогенезе хронических заболеваний печени, участвуя в процессах воспаления и фиброза. Их роль в прогрессировании неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) мало изучена. Проведен анализ уровней ММП-2, -9 в плазме крови пациентов с разными формами НАЖБП (стеатозом печени (СП) и неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) слабой (-СА), умеренной (-УА), высокой (-ВА) активности без выраженного фиброза), оценены корреляционные связи между уровнями ММП-2, -9 и мРНК генов *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3*, активности каспазы 3 в лейкоцитах периферической крови (ЛПК), ФНОа, ИЛ-6, рИЛ-6Р, фрагментов цитокератина-18 в плазме. При СП уровни мРНК гена *MMP2* в ЛПК и ММП-2 в плазме ниже, чем в контроле, и повышена экспрессия гена *NLRP3* в ЛПК относительно других групп. При НАСГ-СА уровень ММП-9 выше, чем у контроля, СП, НАСГ-УА, что можно связать с активацией воспаления при трансформации СП в НАСГ. Плазменный уровень ММП-9 более 389,50 пг/мл диагностически значим для выявления НАСГ-СА среди пациентов СП (*AUC ROC* = 0,818; 95%-ный доверительный интервал равен 0,689–0,948; *p* < 0,001). При НАЖБП уровень ММП-9 может быть связан не только с воспалением, но и с апоптозом. Вероятно, определенную роль в этой связи играет *ADAM17*. При более высокой активности НАСГ усилен апоптоз гепатоцитов, повышен уровень активности каспазы 3 в ЛПК, уровень ММП-9 в крови снижен до уровня контроля и СП. При НАСГ-ВА уровень мРНК гена *ADAM17* в ЛПК повышен по сравнению с контролем, НАСГ-СА и НАСГ-УА. Таким образом, ММП-2 и ММП-9 включены в патогенез НАЖБП уже на ранних стадиях, и их уровень в крови может быть связан с наличием и активностью воспаления в паренхиме печени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: матриксная металлопротеиназа 2, матриксная металлопротеиназа 9, неалкогольная жировая болезнь печени, стеатоз печени, неалкогольный стеатогепатит, воспаление, фиброз, апоптоз, *NLRP3*, *ADAM17*.

DOI: 10.31857/S0320972524110136 EDN: IKGIUP

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; ЗКП – звездчатые клетки печени; ИГА – индекс гистологической активности; ИЛ – интерлейкин; рИЛ-6Р – растворимый ИЛ-6-рецептор; ИМТ – индекс массы тела; ЛПК – лейкоциты периферической крови; ЛПНП и ЛПВП – липопротеины низкой и высокой плотности; ММП – матриксные металлопротеиназы; НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ-СА, -УА и -ВА – неалкогольный стеатогепатит слабой, умеренной и высокой активности; ОХС – общий холестерин; СП – стеатоз печени; СРБ – С-реактивный белок; ТГ – триглицериды; ТИМП – тканевой ингибитор металлопротеиназы; ФНОа – фактор некроза опухоли альфа; ФЦК-18 – фрагменты цитокератина-18; МСР-3 – хемоаттрактантный белок-3.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) представляет собой широко распространенное хроническое, медленно прогрессирующее метаболическое мультифакториальное заболевание, которое является самым частым хроническим заболеванием печени в развитых странах [1]. По последним данным, распространенность НАЖБП в мире составляет 29–35% среди взрослого населения [2, 3] и продолжает быстро расти [4]. В России НАЖБП также является чрезвычайно распространенным хроническим заболеванием печени во взрослой популяции. Согласно последнему анализу мультицентровых исследований, обобщенная распространенность НАЖБП в России составляет около 32% [5]. Сложные патогенетические механизмы НАЖБП включают в себя липотоксичность вследствие избыточного накопления липидов в печени, развитие инсулинерезистентности, воспаления, гибели гепатоцитов и фиброза и отличаются стадийностью течения от стеатоза к стеатогепатиту и циррозу печени [6–9]. В настоящее время патогенез прогрессирования НАЖБП объясняется теорией «множественных ударов» (multiple hit hypothesis), согласно которой на генетически предрасположенных к НАЖБП лиц синергетически действует множество факторов (резистентность к инсулину, выработка адипокинов, факторы питания, микробиом кишечника и другие), ряд разнообразных параллельных процессов способствуют развитию стеатоза и воспаления печени [10–12]. Под воздействием диетических, экологических факторов, ожирения нарушается липидный обмен (повышается уровень свободных жирных кислот и холестерола) [13, 14] и развивается инсулинерезистентность [15], формируется дисфункция и усиливается пролиферация адипоцитов [16], а также происходят изменения в кишечном микробиоме [17]. Гиперинсулинемия, вызванная резистентностью к инсулину, приводит к стеатозу за счет увеличения липогенеза в печени *de novo* [13], снижения окисления свободных жирных кислот и секреции липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в печени и увеличения оттока свободных жирных кислот из-за усиления липолиза из жировой ткани [18]. После развития стеатоза печень становится более уязвимой для «множественного воздействия», включая бактериальные токсины кишечного происхождения, дисбаланс адипокинов/цитокинов, митохондриальную дисфункцию, окислительное повреждение, нарушение регуляции апоптоза гепатоцитов, высвобождение профиброгенных факторов и провоспалительных медиаторов из поврежденных органелл и активацию звездчатых клеток печени (ЗКП) и клеток Купфера [7, 16].

Действующие многочисленные факторы могут совместно стимулировать воспаление, апоптоз и фиброз, что в конечном итоге приводит к прогрессированию НАЖБП (к НАСГ и циррозу печени) [16]. Согласно стадиям, выделяют ряд клинико-морфологических форм НАЖБП: стеатоз, неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) (с фиброзом или без) и цирроз печени [19, 20]. НАСГ представляет собой воспалительную инфильтрацию паренхимы и стромы печени с наличием балонной дистрофии гепатоцитов и очаговых некрозов и является промежуточным и центральным звеном среди последовательных стадий одного патологического процесса (неалкогольного стеатоза и неалкогольного стеатофиброза). Стеатоз печени (СП) – ранняя форма НАЖБП, характеризующаяся доброкачественным клиническим течением, тогда как НАСГ отличается прогрессирующим течением. Фиброз при НАСГ ассоциирован с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований и смертности при НАСГ [19, 21]. Ключевые проблемы диагностики НАЖБП – дифференциация НАСГ от простого стеатоза, выявление фиброза печени и поиск малоинвазивных альтернатив биопсии печени, которая имеет серьезные ограничения и может не отражать истинной картины повреждения, воспаления и фиброза вследствие малого объема ткани [22]. Кроме того, острой проблемой диагностики НАЖБП является консенсус относительно определения НАЖБП и диагностических критериев [23, 24]. В настоящий момент идет обсуждение по поводу замены термина «НАЖБП» на термин «МАЖБП» – метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (жировая болезнь печени, связанная с метаболической дисфункцией) [25, 26]. Считается, что, в отличие от НАЖБП, МАЖБП представляет собой «активный» диагноз, основанный на наличии избыточного веса/ожирения или, у худощавых субъектов, на сочетании метаболических дисфункций, которые действуют как факторы высокого риска [23]. Сложность патогенеза НАЖБП, широкая распространенность, ограничения биопсии печени и отсутствие согласия в отношении номенклатуры и диагностических критериев обуславливают глубокий интерес к поиску малоинвазивных биомаркеров диагностики и прогрессирования НАЖБП.

Фиброз является одним из важных компонентов прогрессирования хронических патологий печени, в том числе НАЖБП [27]. Фиброз печени характеризуется избыточным накоплением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) в субэндотелиальном пространстве Диссе и в интерстиции, в порталных трактах [28]. В основе развития и прогрессирования фиброза лежит нарушение баланса между процессом фиброгенеза (отложение

нием ВКМ, обусловленным активацией ЗКП и их трансдифференцировкой в продуцирующие ВКМ миофибробласты) и антифибротическими процессами: фибролизисом (деградацией ВКМ [29]), а также инактивацией или апоптозом миофибробластов [30, 31]. Избыточное отложение ВКМ в процессе фиброгенеза приводит к изменениям содержания и состава компонентов ВКМ (ремоделированию ВКМ), что обусловливает изменение его свойств (в том числе повышение жесткости) и способствует возникновению и развитию фиброза печени [32]. В случае фиброзов вообще и печени в частности отмечается не только избыточный синтез измененного матрикса, но также нарушение процессов его разрушения [33]. Одними из ключевых медиаторов ремоделирования ВКМ являются матриксные металлопротеиназы (ММП) [34], в связи с чем они рассматриваются в качестве терапевтических мишеней при лечении хронических заболеваний печени [29]. ММП регулируют состав ВКМ печени, наиболее важные структурные компоненты которого: коллаген I, III, IV, V, VI типов, протеогликаны, ламинин, фибронектин и другие белки [35, 36]. ММП представляют собой семейство высокомолекулярных мультидоменных внеклеточных кальций-зависимых цинксодержащих эндопротеиназ, гидролизующих коллаген и другие компоненты ВКМ [29]. ММП различаются по структурной и субстратной специфичности, в частности, ММП-2 и ММП-9 формируют группу желатиназ. ММП-2 обладает свойством как стимулировать фиброз [29, 37], так и снижать его [29, 38–40]. Что касается ММП-9, в настоящее время есть свидетельства ее антифиброзных свойств [41–43], однако нет четких данных о прямом участии ММП-9 в развитии фиброза печени. ММП-9 способна косвенно стимулировать фиброз, но никак не коррелирует с ним [44, 45]. Основными субстратами желатиназ являются частично денатурированный коллаген (желатин), различные нативные типы коллагенов, в том числе коллаген типа IV, образующий базальную мембрану эндотелия, фибронектин, эластин, интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) и TGF- β . Кроме того, для ММП-2 субстратом является про-ММП-9 [45]. Путем процессинга цитокинов и хемокинов желатиназы осуществляют регуляцию воспаления [46].

Желатиназы играют важную роль в патогенезе хронических заболеваний печени, участвуя в процессах воспаления и фиброза. Они могут проявлять как провоспалительное (ММП-2, ММП-9) [47–51], так и противовоспалительное (ММП-2) действие [47, 52–54]. Согласно данным зимографии *in situ*, в гепатоцитах фиброзной печени человека и мыши содержание и активность ММП-2 и -9 увеличивались и положительно коррелировали с тяжестью фиброза [55]. ММП-2 в фиброгенезе

печени обладает антифиброзным [29, 38–40] и профибротическим [29, 37] потенциалом, а ММП-9 проявляет главным образом антифиброзные свойства [41–43], при этом есть некоторые доказательства ее косвенного участия в развитии фиброза печени [44, 45].

ММП-2 (желатиназа А, ЕС 3.4.24.24, 72 кДа) экспрессируется различными клетками печени (ЗКП, фибробластами, клетками Купфера), нейтрофилами, макрофагами и моноцитами [29, 47]. Есть свидетельства того, что уровень ММП-2 относительно постоянен и обычно не подвержен влиянию цитокинов или факторов роста [56]. В ряде исследований отмечена связь экспрессии ММП-2 с хроническим гепатитом С [57], фиброзом печени [58], алкогольным циррозом печени [59], ишемией и реперфузионным повреждением [60], гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) [61]. ММП-2 проявляет антифиброзные свойства. Согласно данным Radbill et al. [39], при CCl4-индуцированном фиброзе у мышей с дефицитом ММП-2 (*Mmp2*^{-/-}) развивался гораздо более значительный фиброз печени, чем у мышей дикого типа (*Mmp2*^{+/+}). Кроме того, в культуральном эксперименте было показано, что ММП-2 подавляет экспрессию коллагена α1(I) активированными ЗКП [39]. Авторы считают, что повышение уровня ММП-2 во время прогрессирования фиброза печени может быть важным механизмом ингибирования синтеза коллагена I типа активированными ЗКП, обеспечивая тем самым защитную, а не патологическую роль. Onozuka et al. [40] показали, что дефицит ММП-2 ускоряет фиброз, индуцированный CCl4 и холестазом, за счет активации ЗКП. Было показано, что ММП-2 способна подавлять активацию тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (ТИМП-1) при фиброзе печени [40]. Помимо антифиброзных свойств, ММП-2 обладает свойством стимулировать фиброз печени [29, 37, 62]. Есть данные, полученные *in vitro* и свидетельствующие о том, что активная ММП-2 является ауто-кринным регулятором пролиферации ЗКП [62].

Накоплены сведения, подтверждающие противовоспалительную роль ММП-2. Дефицит ММП-2 у мышей и человека вызывает сложный метаболический и воспалительный синдром, включающий сердечную дисфункцию, артрит, потерю костной массы, липодистрофию и задержку роста [52]. Показано, что ММП-2 расщепляет моноцитарный хемоаттрактантный белок-3 (МСР-3). Расщепленный МСР-3 связывается с СС-хемокиновыми рецепторами (CCR1, CCR2 и CCR3), действуя как общий антагонист хемокинов, что приводит к уменьшению миграции иммунных клеток в места повреждения и снижению уровня воспаления [53]. Известно, что провоспалительный цитокин ИЛ-1 β индуцирует продукцию ММП-2 клетками соеди-

нительной ткани, активированная ММП-2, в свою очередь, отрицательно регулирует активность ИЛ-1 β посредством его деградации [54]. Помимо реализации противовоспалительных эффектов, ММП-2 может также выступать в роли медиатора воспаления, проявляя провоспалительные свойства. Показано, что ММП-2 опосредованно участвует в инфильтрации лейкоцитов в ткани при воспалении, расщепляя большой эндотелин-1 (ЕТ-1) с образованием нового пептида из 32 аминокислот – ЕТ-1(1–32). ЕТ-1(1–32) связывается с рецептором эндотелина А, приводя к снижению экспрессии L-селектина и активации интегрина CD11b/CD18 на поверхности нейтрофилов, что способствует адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и транспорту нейтрофилов в воспаленные ткани [50].

ММП-9 (желатиназа В, ЕС 3.4.24.35, 92 кДа) секретируется многими типами клеток, в том числе моноцитами, лейкоцитами, макрофагами и фибробластами [29, 63]. Базальные уровни ММП-9 обычно низки, ее экспрессия может индуцироваться цитокинами/хемокинами, включая ФНО α [56]. Показано, что индукция НАСГ у мышей приводит к повышению уровня мРНК гена *Mmp9* в печени и содержания ММП-9 в крови [64]. Повышенная экспрессия ММП-9 выявлена при фиброзе печени [55], алкогольном циррозе печени [59] и ГЦК [65]. ММП-9 оказывает антифиброзное действие. Известно, что ММП-9 активирует апоптоз ЗКП в культуре [41]. Melgar-Lesmes et al. [42] показали, что внедрение плазмида, сверхэкспрессирующей ММП-9, в воспалительные макрофаги цирротической печени приводит к переключению макрофагов с воспалительного (M1) на прорегенеративный (M2) тип и способствует локальному разрешению фиброза. Feng et al. [43] с использованием модели фиброза, индуцированного тиоацетамидом у грызунов, получили доказательства того, что ММП-9, полученная из клеток Купфера, играет решающую роль в разрешении фиброза печени. Несмотря на свидетельства участия ММП-9 в развитии легочного фиброза [66], прямых доказательств профибротической роли ММП-9 в печени практически нет. Показано, что нокаут гена *Mmp9* у мышей приводит к ослаблению фиброгенеза [44], но также наблюдается замедленная реакция регенерации печени после частичной гепатэктомии [67] по сравнению с контрольными животными дикого типа. Известно, что ММП-9 может активировать латентный TGF- β в процессе протеолитического расщепления [68]. Kaviratne et al. [69] изучали роль TGF- β в ИЛ-13-зависимом фиброзе печени, вызванном инфекцией *Schistosoma mansoni*. Было продемонстрировано, что нокаут гена, кодирующего ММП-9 у мышей, не влияет на фиброз даже при хронической инфекции [69].

ММП-9 участвует в процессах воспаления, ремоделирования тканей и репарации, мобилизации матрикссвязанных факторов роста и процессинге цитокинов [29, 47]. Накоплены данные о провоспалительной роли ММП-9. Показано, что у *Mmp9*^{-/-} мышей с экспериментально вызванным стеатозом наблюдается снижение инфильтрации лейкоцитов в печень, экспрессии провоспалительных цитокинов и некроза печени по сравнению с контрольными животными [48]. Снижение активности ММП-9 вследствие дефицита индуцибельной синтазы оксида азота нарушает миграцию лейкоцитов в печень и снижает уровень воспаления при повреждении печени, вызванном ишемией/реперфузией [49]. Так же, как и ММП-2, ММП-9 участвует в регуляции экспрессии молекул адгезии на поверхности нейтрофилов посредством расщепления эндотелина-1 (ЕТ-1), что способствует миграции лейкоцитов к очагу воспаления [50]. Показано, что ММП-9 активирует провоспалительные цитокины ФНО α и ИЛ-1 β [51, 70].

Таким образом, ММП-2 и ММП-9 участвуют в процессах воспаления и фиброза и играют важную роль в патогенезе хронических заболеваний печени. Прогрессирование печеночно-клеточной недостаточности при НАЖБП напрямую связано с утратой паренхимы вследствие инфильтрации лейкоцитов и запуском иммуновоспалительных процессов, поэтому есть основания рассматривать уровень ММП-2 и -9 в крови и профиль экспрессии кодирующих генов в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) в качестве маркеров прогрессирования и диагностики НАЖБП, однако имеющиеся данные единичны, противоречивы и касаются в основном НАСГ высокой активности [71]. Кроме того, поскольку фиброгенетическая активность и ремоделирование ВКМ при НАЖБП являются типичными изменениями на поздних стадиях, внимание исследователей в основном сосредоточено на изучении роли ММП и их тканевых ингибиторов на стадиях НАЖБП с продвинутым фиброзом [72, 73]. Учитывая провоспалительную роль ММП-9 [48, 49] и в большей степени противовоспалительную роль ММП-2 [47, 52, 53] при неинфекционных патологиях печени, можно ожидать, что уровень данных металлопротеиназ может быть связан с наличием и активностью воспаления в паренхиме печени, в том числе на ранних стадиях патогенеза НАЖБП.

При прогрессировании НАЖБП имеет место тесная взаимосвязь процессов фиброза, воспаления и апоптоза [6, 74–76], и роль ММП в интеграции этих процессов мало изучена. Ранее мы показали, что цитокиновый профиль и уровни некоторых показателей апоптоза в крови пациентов различаются в зависимости от формы НАЖБП, и получили косвенные подтверждения

связи воспаления при развитии НАСГ с процессом каспазозависимого апоптоза ЛПК [77, 78]. В свою очередь, экспрессия и активность ММП регулируются через сигнальные пути, опосредующие воспаление. Так, сигнальный путь ADAM17/TNF α /NF- κ B опосредует экспрессию MMP9 в эпителиальных клетках легких [79]. ADAM17 является металлопротеиназой, осуществляющей протеолитическое высвобождение мембранный формы ФНО α , одного из основных провоспалительных цитокинов [80]. Кроме того, известно, что при НАЖБП связь воспаления и фиброза реализуется через NLRP3-инфламмосому [81]. Делеция *Nlrp3*, кодирующей один из основных компонентов NLRP3-инфламмасомы, у мышей с индуцируемым НАСГ и фиброзом приводит к защите от фиброза печени, снижению содержания мРНК генов *Mmp2* и *Col1a1* (гена коллагена I типа) по сравнению с мышами дикого типа [81]. Накапливаются сведения об участии ММП-группы желатиназ в процессах регенерации и апоптоза. Например, показано, что у *Mmp9*^{-/-}-мышей ослаблена регенерация печени после частичной гепатэктомии, снижен уровень апоптоза гепатоцитов и экспрессия активной формы каспазы 3 [67].

На основании вышеизложенного можно заключить, что сведения о роли ММП-2 и ММП-9 в патогенезе НАЖБП, особенно ранних ее форм, противоречивы и недостаточны. Пристального внимания требует вопрос изучения места ММП в реализации связи процессов воспаления, апоптоза и фиброза при прогрессировании НАЖБП. Остается открытым вопрос о диагностической ценности уровней ММП-2 и -9 и мРНК кодирующих генов в периферической крови в диагностике и разграни-

чении разных форм НАЖБП. В связи с этим цель данного исследования – сравнительный анализ уровней ММП-2 и -9 в плазме крови и мРНК кодирующих генов (MMP2, MMP9) в ЛПК пациентов с разными формами НАЖБП на доцирротической стадии (стеатозом печени и НАСГ разной активности без выраженного фиброза), а также оценка корреляционных связей между уровнем ММП-2, ММП-9 в плазме крови и уровнями мРНК генов ADAM17, NLRP3 в ЛПК, провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6 и его растворимого рецептора) и маркеров апоптоза (специфического маркера апоптоза гепатоцитов – фрагментов цитокератина-18 (ФЦК-18) и активностью каспазы 3) в плазме крови пациентов с НАЖБП изучаемых групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группы исследования. В исследование были включены 95 больных НАЖБП с установленным впервые диагнозом: 26 пациентов со стеатозом печени (СП), 69 пациентов с НАСГ слабой (НАСГ-СА), умеренной (-УА) и высокой (-ВА) активности. Контрольную группу составили 35 здоровых доноров (без клинических проявлений НАЖБП). Клинико-лабораторная характеристика групп исследования представлена в табл. 1.

Обследование пациентов и здоровых доноров проводилось на базе терапевтического отделения ЧУЗ КБ «РЖД-медицина» (г. Петрозаводск). Диагноз НАЖБП с оценкой степени активности НАСГ устанавливается на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных, согласно клиническим

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика исследуемых групп

| Показатель | | Контроль (n = 35) | СП (n = 26) | НАСГ-СА (n = 23) | НАСГ-УА (n = 35) | НАСГ-ВА (n = 11) |
|---------------|---------|----------------------|----------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Возраст, годы | | 44,42 ± 1,09 | 47,65 ± 1,48 | 44,05 ± 1,60 | 45,09 ± 1,55 | 48,70 ± 2,59 |
| | | (44,00) | (49,00) | (44,50) | (44,50) | (49,00) |
| Пол | мужской | 17 | 14 | 13 | 20 | 6 |
| | женский | 18 | 12 | 10 | 15 | 5 |
| ИГА, баллы | | | 3,08 ± 1,17 | 5,00 ± 0,00 | 6,77 ± 0,14 | 9,46 ± 0,21 |
| | | | (3,00) | (5,00) [#] | (7,00) ^{#,◊} | (9,00) ^{#,◊,Δ} |
| АЛТ, Ед./литр | | 17,79 ± 1,03 | 20,27 ± 1,31 | 49,81 ± 5,90 | 85,16 ± 9,31 | 214,20 ± 76,03 |
| | | (17,10) | (21,70) | (47,75) ^{*,#} | (68,70) ^{*,#,◊} | (135,00) ^{*,#,◊,Δ} |
| АСТ, Ед./литр | | 19,92 ± 0,73 | 20,95 ± 0,95 | 36,91 ± 3,86 | 53,17 ± 5,18 | 119,20 ± 25,34 |
| | | (19,05) | (19,85) | (34,95) ^{*,#} | (44,10) ^{*,#} | (91,10) ^{*,◊,Δ} |

Таблица 1 (окончание)

| Показатель | Контроль (n = 35) | СП (n = 26) | НАСГ-СА (n = 23) | НАСГ-УА (n = 35) | НАСГ-ВА (n = 11) |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|--|---|
| Билирубин общий, мкмоль/литр | 14,95 ± 1,37 (13,30) | 13,44 ± 1,36 (12,20) | 15,98 ± 1,41 (16,70) | 19,49 ± 2,23 (16,00) [#] | 22,02 ± 1,86 (20,65)*, [#] |
| | | | | | |
| ЩФ, Ед./литр | 113,30 ± 13,92 (110,00) | 159,40 ± 15,06 (186,50) | 205,80 ± 14,59 (206,10)* | 207,00 ± 14,61 (200,00) | 320,60 ± 52,77 (253,50)*, [#] |
| | | | | | |
| СРБ, мг/литр | 0,27 ± 0,15 (0,00) | 0,64 ± 0,23 (0,50) | 3,17 ± 0,75 (3,50)* | 2,57 ± 0,58 (2,50)* | 5,45 ± 0,89 (5,00)*, [#] |
| | | | | | |
| СОЭ, мм/ч | 6,69 ± 1,06 (5,00) | 7,77 ± 0,85 (6,50) | 5,95 ± 1,25 (4,00) | 14,21 ± 1,91 (10,00)*, [◊] | 14,91 ± 2,77 (15,00)*, [◊] |
| | | | | | |
| Лейкоциты, *10 ⁹ /литр | 6,14 ± 0,26 (5,80) | 6,35 ± 0,41 (5,70) | 6,03 ± 0,24 (5,70) | 6,12 ± 0,32 (5,95) | 6,40 ± 0,43 (6,39) |
| | | | | | |
| Альбумин, г/литр | 42,48 ± 1,38 (42,20) | 42,65 ± 1,10 (42,50) | 40,13 ± 1,31 (38,60) | 39,98 ± 1,21 (40,45) | 40,71 ± 1,89 (38,85) |
| | | | | | |
| Глюкоза, ммоль/литр | 5,16 ± 0,08 (5,06) | 5,19 ± 0,11 (5,20) | 5,27 ± 0,12 (5,25) | 5,39 ± 0,11 (5,50) | 5,44 ± 0,23 (5,50) |
| | | | | | |
| ОХС, ммоль/литр | 5,04 ± 0,15 (5,09) | 5,29 ± 0,19 (5,29) | 6,05 ± 0,25 (6,10)* | 6,08 ± 0,30 (6,00)* | 6,41 ± 0,38 (6,20)* |
| | | | | | |
| ЛПВП, ммоль/литр | 1,42 ± 0,09 (1,29) | 1,22 ± 0,010 (1,09) | 1,27 ± 0,08 (1,12) | 1,22 ± 0,10 (1,15) | 1,00 ± 0,07 (1,04)* |
| | | | | | |
| ЛПНП, ммоль/литр | 3,10 ± 0,16 (3,32) | 2,93 ± 0,22 (2,70) | 3,66 ± 0,27 (3,77) [#] | 3,94 ± 0,22 (4,00)*, [#] | 4,53 ± 0,29 (4,40)*, [#] |
| | | | | | |
| ТГ, ммоль/литр | 1,33 ± 0,12 (1,25) | 1,82 ± 0,21 (1,64) | 2,29 ± 0,27 (1,96)* | 2,21 ± 0,24 (1,83)* | 2,69 ± 0,71 (2,11)* |
| | | | | | |
| FIB-4 | 0,83 ± 0,06 (0,82) | 1,32 ± 0,13 (1,18)* | 1,11 ± 0,09 (0,99) | 1,25 ± 0,08 (1,18)* | 1,53 ± 0,21 (1,13)* |
| | | | | | |
| APRI | 0,22 ± 0,02 (0,20) | 0,28 ± 0,03 (0,26) | 0,42 ± 0,05 (0,42)* | 0,57 ± 0,06 (0,52)*, [#] | 0,76 ± 0,13 (0,57)*, [#] |
| | | | | | |
| ИМТ, кг/м ² | 24,94 ± 1,21 (24,79) | 33,49 ± 1,83 (33,20)* | 31,75 ± 0,66 (32,00)* | 33,69 ± 1,14 (34,90)* | 33,92 ± 1,58 (34,31)* |
| | | | | | |
| ФЦК-18, Ед./литр | 81,48 ± 9,31 (77,05) | 141,90 ± 14,87 (141,00)* | 216,80 ± 33,62 (162,20)* | 304,70 ± 40,35 (295,50)* | 614,40 ± 162,50 (520,00)*, ^{#,[◊]} |
| | | | | | |

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$. В скобках – медиана. Достоверное отличие ($p < 0,005$) от контроля (*), группы СП (#), группы НАСГ-СА (◊), группы НАСГ-УА (Δ) (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферони).

рекомендациям Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российской ассоциации эндокринологов, Российской ассоциации геронтологов и гериатров и Национального общества профилактической кардиологии по диагностике и лечению НАЖБП [19]. Все пациенты имели признаки метаболического синдрома: индекс массы тела (ИМТ) более 30 кг/м²; окружность талии у мужчин более 102 см, у женщин – более 88 см; дислипидемия в виде увеличения уровня липопротеинов низкой плотности более 3,0 ммоль/литр; систолическое артериальное давление ≥130 мм рт. ст.; диастолическое – ≥80 мм рт. ст. Из исследования исключали пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типов. У всех пациентов при абдоминальной сонографии на аппарате Vivid Pro-7 («General Electric», США) отмечалось усиление эхогенности печени, превышающее эхогенность правой почки. Исключали из исследования пациентов с серологическими признаками вирусной HBV-, HCV-гепатотропной инфекции, алкогольной, аутоиммунной и лекарственной этиологией поражения печени. Исключали пациентов с циррозом печени с признаками портальной гипертензии – асцитом, варикозным расширением вен пищевода и кардиального отдела желудка, расширением диаметра воротной вены и селезеночной вены и замедлением линейной скорости кровотока по данным венам при допплерографии. Для части больных выполнялась спиральная компьютерная томография печени с оценкой плотности печени. Всем пациентам выполняли слепую чрескожную биопсию печени, на основании которой верифицировалась форма НАЖБП: стеатоз без воспаления и баллонной дистрофии гепатоцитов или стеатогепатит разной активности в зависимости от выраженности гепатоцеллюлярной баллонной дегенерации, долькового и портального воспаления (в основном лимфоцитарного с некоторым количеством нейтрофилов) и степени макровезикулярного стеатоза гепатоцитов – по методу Brunt et al. [82]. Согласно данному методу, выделяют три степени гистологической активности НАСГ: слабую (легкую), умеренную и высокую (тяжелую); слабая гистологическая активность НАСГ соответствует минимальным критериям для диагностики стеатогепатита с некоторой степенью гепатоцеллюлярного стеатоза и характерным дольковым смешанным воспалением. Индекс гистологической активности (ИГА) представлен в табл. 1. По результатам гистологического анализа биоптатов среди включенных в исследование пациентов НАСГ определяли 1- и 2-стадии фиброза печени (F1–F2), отсутствовали пациенты с выраженным фиброзом. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Критерии исключения, общие для изучаемых

групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение. На проведение исследований получено согласие комитета по медицинской этике Министерства здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводского государственного университета (протокол № 48 от 10 марта 2023 г.).

Материал исследования. В качестве материала для исследования использовали образцы венозной крови доноров изучаемых групп. Взятие материала проводили до назначения гепатопротекторной и иной терапии.

Определение клинико-лабораторных показателей крови. На автоматических анализаторах Random Access A-15 и A-25 («BioSystems», Испания) был проведен общий клинический анализ крови и определение следующих биохимических показателей крови: активности аланинаминотрансферазы (АЛАТ) и аспартатаминотрансферазы (АСАТ) кинетическим УФ-методом «АЛТ-УФ и АСТ-УФ – новая жидкая форма»; билирубина колориметрическим методом «Билирубин-Ново»; щелочной фосфатазы (ЩФ) кинетическим методом «Щелочная фосфатаза-Ново (жидкая форма)»; альбумина фотометрическим методом «Альбумин-Ново»; С-реактивного белка (СРБ) иммунотурбидиметрическим методом «СРБ-Ново»; общего холестерина (ОХС) ферментативным методом «Холестерин-Ново»; триглицеридов (ТГ) ферментативным колориметрическим методом «Триглицериды-Ново» (жидкая форма); глюкозы глюкозооксидазным методом «Глюкоза-Ново». Перечисленные реактивы были производства фирмы «Вектор-Бест», Россия. Липопротеины низкой плотности (ЛПНП) определяли расчетным методом по формуле Фридвальда [83]; липопротеины высокой плотности (ЛПВП) – ферментативным методом «Липопротеиды высокой плотности» («BioSystems», Испания). Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) оценивалась методом Вестергрена.

Определение индексов фиброза FIB-4 и APRI. FIB-4 рассчитывали по формуле (1) [84]:

$$\frac{\left[\text{возраст (г.)} \times \text{АСТ} \left(\frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) \right]}{\left[\text{тромбоциты} \left(\frac{10^9}{\text{литр}} \right) \times \sqrt{\text{АЛТ}} \left(\frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) \right]} \quad (1)$$

При значении индекса FIB-4 ≥ 2,67 с достоверностью 80% можно утверждать о высоком риске прогрессирования фиброза; при уровне FIB-4 ≤ 1,30 с достоверностью 90% – о низком риске [85].

Индекс APRI рассчитывали по формуле (2) [86]:

$$\frac{\left[\text{АСТ} \left(\frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) / \text{верхний предел нормы АСТ} \left(\frac{\text{Ед.}}{\text{литр}} \right) \right]}{\left[\text{тромбоциты} \left(\frac{10^9}{\text{литр}} \right) \right]} \times 100. \quad (2)$$

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров

| Ген | Прямой праймер, 5'→3' | Обратный праймер, 5'→3' | ПЦР-продукт, п.н. |
|-----------------|------------------------|---------------------------|-------------------|
| <i>18S rRNA</i> | agaaaacggctaccacatcca | caccagacttgccctcca | 169 |
| <i>MMP2</i> | gaagagcgtgaagtttggaaag | aaggcagtggagaggaagg | 90 |
| <i>MMP9</i> | cagagatgcgtggagagtc | aaggcgtcgtcaatcacc | 250 |
| <i>ADAM17</i> | gcattctcaagtctccacaag | ctcttagcaacatcttcacatcc | 110 |
| <i>NLRP3</i> | ggacaatgacagcatcggt | tggtcagttaatagaaagatagcgg | 211 |

При значении индекса APRI ≤ 0,50 вероятность фиброза печени низка; при уровне APRI ≥ 1,50 – с высокой вероятностью можно говорить о выраженному фиброзе печени [87, 88].

Определение уровня мРНК генов *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3* в ЛПК. Для определения уровня транскриптов генов из цельной крови выделяли ЛПК здоровых доноров и пациентов с НАЖБП (величина выборок указана в табл. 1) методом, основанным на способности изотонического раствора хлорида аммония гемолизировать эритроциты [89]. Тотальную РНК из ЛПК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («ЕвроГен», Россия). Первую цепь комплементарной ДНК синтезировали из тотальной РНК с помощью набора MMLV RT kit («ЕвроГен»). Степень чистоты и концентрацию кДНК определяли на приборе SmartSpecPlus («Bio-Rad», США). Уровень мРНК генов в ЛПК оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе LightCycler 96 («Roche», Швейцария), используя набор для амплификации с интеркалирующим красителем SYBR Green («ЕвроГен»). Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Повторность при ПЦР-анализе – 3-кратная. Уровень транскриптов изучаемых генов был рассчитан относительно уровня транскрипции гена *18S rRNA* по методу, описанному Livak и Schmittgen [90]. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР-РВ указаны в табл. 2, праймеры конструировали в программе Beacon Designer 5.

ИФА. Методом ИФА в плазме здоровых доноров ($n = 21$) и пациентов с СП ($n = 19$), НАСГ-СА ($n = 19$), НАСГ-УА ($n = 19$), НАСГ-ВА ($n = 11$) определяли следующие показатели: матриксная металлопротеиназа 2 (тест-система «Human MMP2 ELISA Kit»; «ELK Biotechnology», Китай); матриксная металлопротеиназа 9 (тест-система «Human MMP9 ELISA Kit»; «ELK Biotechnology»); тканевой полипептид-специфический антиген (фрагменты цитокератина-18 (ФЦК-18) – показатель апоптоза гепатоцитов) (тест-система «TPS ELISA»; «Biotech», Швеция); фактор некроза опухоли альфа (ФНО α)

(тест-система «Human TNF α Platinum ELISA»; «eBioscience», Австрия); интерлейкин-6 (ИЛ-6) (тест-система «Интерлейкин-6 – ИФА – Бест»; «Вектор-Бест»); растворимый ИЛ-6-рецептор (рИЛ-6Р) (тест-система «Human sIL-6R ELISA»; «eBioscience»); интерлейкин-8 (ИЛ-8) (тест-система «Интерлейкин-8 – ИФА – Бест»; «Вектор-Бест»).

Определение активности каспазы 3 в ЛПК. Активность каспазы 3 в ЛПК здоровых доноров ($n = 26$) и пациентов с СП ($n = 17$), НАСГ-СА ($n = 19$), НАСГ-УА ($n = 17$), НАСГ-ВА ($n = 9$) определяли с использованием набора Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric («Sigma-Aldrich», США). Согласно инструкциям производителя, активность каспазы 3 определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата каспазы 3 (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilide) на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech GmbH», Германия) и выражали в нмоль р-нитроанилина (р-NA), образующегося за 1 мин, в расчете на 1 мл пробы (при условии, что 100 мкл лиазирующего буфера содержит 10^7 живых клеток).

Статистический анализ проведен с использованием программы GraphPad Prism v.7. Значения $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые. Проводили тест на соответствие результатов нормальному распределению (с помощью критерия W Шапиро-Уилка). В связи с несоответствием распределений показателей в группахциальному использовали непараметрические критерии для анализа. При сравнении изучаемых показателей в группах использовали критерий H Краскела-Уоллиса с последующим парным сравнением групп с помощью критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни с применением поправки Бонферрони при оценке значения p . Взаимосвязь показателей оценивали с помощью расчета рангового коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Для оценки силы связи между двумя величинами использовали шкалу Чедока, согласно которой значения r_s от 0,1 до 0,3 соответствуют слабой взаимосвязи, 0,3–0,5 – умеренной, 0,5–0,7 – заметной, 0,7–0,9 – высокой, более 0,9 – весьма высокой. Анализ ROC-кривых проводили по вычислению

значений площадей под кривыми (*AUC*), оптимальный порог отсечения определяли в соответствии с максимальным индексом Юдена [91, 92].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Особенности клинико-лабораторной картины при СП и НАСГ. Нами проведен сравнительный анализ клинико-лабораторных данных здоровых доноров и пациентов с СП и НАСГ разной активности (табл. 1). Согласно данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, сравниваемые группы исследования статистически значимо различаются по ИГА ($H = 87,99$; $p < 0,001$), уровню АЛТ ($H = 83,28$; $p < 0,001$), АСТ ($H = 75,46$; $p < 0,001$), общего билирубина ($H = 18,66$; $p < 0,001$), ЩФ ($H = 25,43$; $p < 0,001$), СРБ ($H = 26,06$; $p < 0,001$), СОЭ ($H = 24,98$; $p < 0,001$), ОХС ($H = 18,68$; $p < 0,001$), ЛПВП ($H = 10,93$; $p = 0,027$), ЛПНП ($H = 21,42$; $p < 0,001$), ТГ ($H = 15,89$; $p = 0,003$), FIB-4 ($H = 19,98$; $p < 0,001$), APRI ($H = 42,82$; $p < 0,001$), ИМТ ($H = 21,02$; $p < 0,001$), ФЦК-18 ($H = 37,79$; $p < 0,001$). При этом нет статистически значимых различий между группами по возрасту ($H = 5,16$; $p = 0,271$), уровню лейкоцитов ($H = 0,48$; $p = 0,976$), альбумина ($H = 4,67$; $p = 0,323$) и глюкозы ($H = 5,81$; $p = 0,214$) в крови.

Нужно отметить, что включенные в исследование пациенты с НАЖБП отличались от контроля повышенным уровнем ИМТ. Уровень FIB-4 также был выше у пациентов НАЖБП по сравнению со здоровыми людьми, за исключением группы НАСГ-СА, где уровень FIB-4 не отличался от контроля. Уровень APRI у пациентов с НАСГ был выше, чем у здоровых людей. Кроме того, группы пациентов достоверно не различались по FIB-4 и ИМТ, в то время как APRI у пациентов с НАСГ-УА и -ВА превосходил таковой у лиц с простым стеатозом печени. Согласно гистологическим данным, показателям ИМТ, FIB-4 и APRI, среди пациентов не было лиц с выраженным фиброзом и морбидным ожирением (табл. 1).

У пациентов СП рутинные клинико-лабораторные показатели крови не отличаются от контроля. При этом уровень специфического маркера апоптоза (ФЦК-18) у пациентов СП выше, чем у здоровых людей. При переходе от СП к НАСГ и по мере нарастания степени активности НАСГ повышаются маркеры цитолитического и холестатического синдромов (АЛАТ, АСАТ, ЩФ). Что касается маркеров воспаления, уровень СРБ повышен при НАСГ относительно контроля, а также относительно СП (в случае НАСГ-ВА). СОЭ при НАСГ-УА и -ВА выше, чем у здоровых людей и пациентов с НАСГ-СА, и не различается у других групп исследования. Концентрация ФЦК-18 при НАСГ повышена относительно контроля, при этом уровень ФЦК-18

в крови НАСГ высокой активности превышает таковой у пациентов с простым стеатозом (СП) и НАСГ-СА. Уровни ТГ и ОХС остаются нормальными при СП и повышены при НАСГ относительно контроля. Данные свидетельствуют о том, что повышение уровня ОХС происходит главным образом за счет нарастания концентрации ЛПНП (табл. 1).

Уровень ММП-2 и ММП-9 в плазме крови при СП и НАСГ. Согласно данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, группы исследования (контрольная, СП, НАСГ-СА, -УА, -ВА) статистически значимо различаются по уровню ММП-2 ($H = 15,62$; $p = 0,004$) и ММП-9 ($H = 13,38$; $p = 0,010$) в плазме крови. Результаты сравнительного анализа уровней ММП-2 и ММП-9 в плазме крови здоровых людей, пациентов с СП, пациентов с НАСГ разной активности представлены на рис. 1 и рис. 2. Показано, что плазменный уровень ММП-2 при СП ниже, чем у здоровых людей, при этом не обнаружено различий в уровне данного показателя у пациентов с НАЖБП разных групп (СП и НАСГ разной степени гистологической активности) (рис. 1).

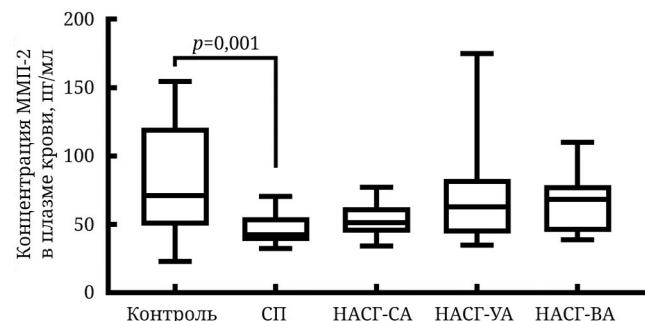


Рис. 1. Концентрация ММП-2 в плазме крови пациентов с НАЖБП и в контрольной группе. Данные представлены в виде: Q1–Q3, медиана, минимум, максимум. Указаны значения p , согласно *U*-критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони

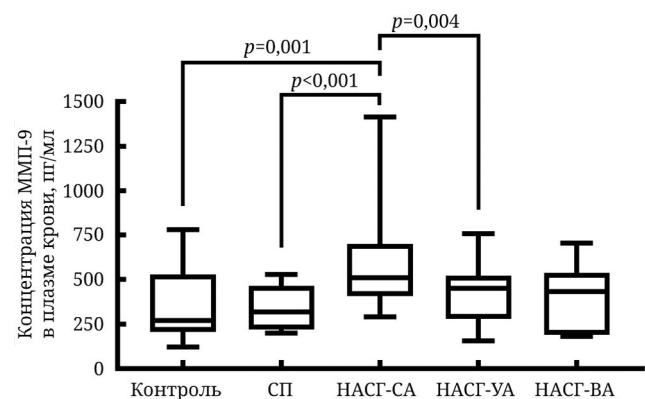


Рис. 2. Концентрация ММП-9 в плазме крови пациентов с НАЖБП и в контрольной группе. Данные представлены в виде: Q1–Q3, медиана, минимум, максимум. Указаны значения p , согласно *U*-критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони

Согласно полученным результатам, уровень ММП-9 в плазме крови пациентов общей группы НАСГ, объединяющей все степени активности, составил (в виде $M \pm m$, в скобках – медиана) $474,5 \pm 32,12$ (470,3) пг/мл, что достоверно выше, чем у здоровых людей ($354,0 \pm 44,85$ (270,0) пг/мл; $p = 0,026$) и пациентов СП ($337,9 \pm 26,69$ (318,5) пг/мл; $p = 0,018$). Показано, что концентрация ММП-9 в плазме крови пациентов с НАСГ-СА значимо выше, чем у здоровых людей, пациентов групп СП и НАСГ-УА (рис. 2). Эти результаты имеют потенциальную клиническую ценность для диагностики ранних форм НАЖБП при отсутствии значимого фиброза.

Для того чтобы оценить значимость плазменных уровней ММП-9 и ММП-2 в качестве диагностического теста для разграничения ранних форм НАЖБП, нами были построены и проанализированы ROC-кривые для данных показателей у пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП. Статистическая достоверность ROC-кривой по концентрации ММП-2 не обнаружена ($AUC = 0,681$ (95%-ный доверительный интервал 0,509–0,854); $p = 0,056$). Согласно анализу ROC-кривой для концентрации ММП-9 в плазме пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП, уровень ММП-9 в плазме крови имеет диагностическую значимость

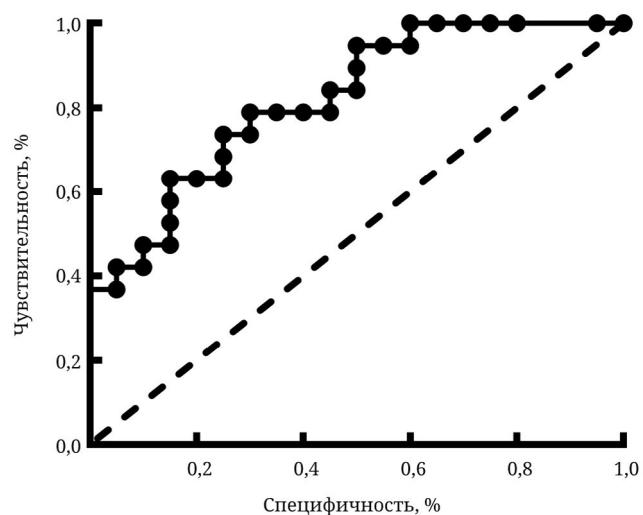


Рис. 3. ROC-кривая для концентрации ММП-9 в плазме пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП. $AUC = 0,818$ (95%-ный доверительный интервал 0,689–0,948); $p < 0,001$

для выявления НАСГ-СА среди пациентов с простым стеатозом (рис. 3). В соответствии с расчетом максимального индекса Юдена, оптимальный порог отсечения составляет $>389,50$ пг/мл ММП-9 в плазме крови (табл. 3).

Таблица 3. Чувствительность, специфичность, отношение правдоподобия положительного результата, индекс Юдена при разных порогах отсечения ROC-кривой для концентрации ММП-9 в плазме пациентов НАСГ-СА относительно пациентов СП

| Порог отсечения, пг/мл | Чувствительность (95% ДИ); Se | Специфичность (95% ДИ); Sp | Отношение правдоподобия; LR | Индекс Юдена; J |
|------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| > 201,3 | 1,000 (0,832–1,000) | 0,050 (0,003–0,236) | 1,053 | 0,050 |
| > 210,1 | 1,000 (0,832–1,000) | 0,200 (0,081–0,416) | 1,250 | 0,200 |
| > 225,3 | 1,000 (0,832–1,000) | 0,250 (0,112–0,469) | 1,333 | 0,250 |
| > 249,2 | 1,000 (0,832–1,000) | 0,300 (0,146–0,519) | 1,429 | 0,300 |
| > 269,4 | 1,000 (0,832–1,000) | 0,350 (0,181–0,567) | 1,538 | 0,350 |
| > 282,4 | 1,000 (0,832–1,000) | 0,400 (0,219–0,613) | 1,667 | 0,400 |
| > 292,4 | 0,947 (0,754–0,997) | 0,400 (0,219–0,613) | 1,579 | 0,347 |
| > 303,3 | 0,947 (0,754–0,997) | 0,450 (0,258–0,658) | 1,722 | 0,397 |
| > 316,1 | 0,947 (0,754–0,997) | 0,500 (0,299–0,701) | 1,895 | 0,447 |
| > 320,6 | 0,895 (0,686–0,981) | 0,500 (0,299–0,701) | 1,789 | 0,395 |
| > 323,0 | 0,842 (0,624–0,945) | 0,500 (0,299–0,701) | 1,684 | 0,342 |
| > 326,5 | 0,842 (0,624–0,945) | 0,550 (0,342–0,742) | 1,871 | 0,392 |
| > 334,6 | 0,790 (0,567–0,915) | 0,550 (0,342–0,742) | 1,754 | 0,340 |
| > 341,4 | 0,790 (0,567–0,915) | 0,600 (0,387–0,781) | 1,974 | 0,390 |

Таблица 3 (окончание)

| Порог отсечения, пг/мл | Чувствительность (95% ДИ); <i>Se</i> | Специфичность (95% ДИ); <i>Sp</i> | Отношение правдоподобия; <i>LR</i> | Индекс Юдена; <i>J</i> |
|------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------|
| > 356,4 | 0,790 (0,567–0,915) | 0,650 (0,433–0,819) | 2,256 | 0,440 |
| > 389,5 | 0,790 (0,567–0,915) | 0,700 (0,481–0,855) | 2,632 | 0,490 |
| > 414,5 | 0,737 (0,512–0,882) | 0,700 (0,481–0,855) | 2,456 | 0,437 |
| > 422,1 | 0,737 (0,512–0,882) | 0,750 (0,531–0,888) | 2,947 | 0,487 |
| > 428,1 | 0,684 (0,460–0,846) | 0,750 (0,531–0,888) | 2,737 | 0,434 |
| > 455,3 | 0,632 (0,410–0,809) | 0,750 (0,531–0,888) | 2,526 | 0,382 |
| > 489,0 | 0,632 (0,410–0,809) | 0,800 (0,584–0,919) | 3,158 | 0,432 |
| > 502,0 | 0,632 (0,410–0,809) | 0,850 (0,640–0,948) | 4,211 | 0,482 |
| > 504,1 | 0,579 (0,363–0,769) | 0,850 (0,640–0,948) | 3,860 | 0,429 |
| > 507,2 | 0,526 (0,317–0,727) | 0,850 (0,640–0,948) | 3,509 | 0,376 |
| > 516,4 | 0,474 (0,273–0,683) | 0,850 (0,640–0,948) | 3,158 | 0,324 |
| > 523,0 | 0,474 (0,273–0,683) | 0,900 (0,699–0,982) | 4,737 | 0,374 |
| > 524,2 | 0,421 (0,231–0,637) | 0,900 (0,699–0,982) | 4,211 | 0,321 |
| > 526,4 | 0,421 (0,231–0,637) | 0,950 (0,764–0,997) | 8,421 | 0,371 |
| > 528,4 | 0,368 (0,192–0,590) | 0,950 (0,764–0,997) | 7,368 | 0,318 |
| > 546,2 | 0,368 (0,192–0,590) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,368 |
| > 583,9 | 0,316 (0,154–0,540) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,316 |
| > 652,4 | 0,263 (0,118–0,488) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,263 |
| > 732,8 | 0,211 (0,085–0,433) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,211 |
| > 882,7 | 0,158 (0,055–0,376) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,158 |
| > 1011,0 | 0,105 (0,019–0,314) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,105 |
| > 1218,0 | 0,053 (0,003–0,246) | 1,000 (0,839–1,000) | | 0,053 |

Примечание. Жирным шрифтом выделен оптимальный порог отсечения, соответствующий максимальному индексу Юдена. Индекс Юдена (*J*) равен *Se* + *Sp* – 1 [91, 92]; ДИ – доверительный интервал.

В связи со сложностью механизмов патогенеза НАЖБП и актуальностью изучения связи процессов воспаления, апоптоза и фиброза при данном заболевании была поставлена задача оценить расширенный комплекс биохимических и молекулярно-генетических показателей у пациентов СП и НАСГ разной активности и провести корреляционный анализ этих показателей с уровнями ММП-9 и ММП-2 в плазме крови. Поскольку при СП и НАСГ биопсия печени возможна в крайне редких случаях, особенно актуален поиск малоинвазивных маркеров НАЖБП, в связи с чем в качестве материала

для исследования используют периферическую кровь.

Уровень мРНК генов MMP2, MMP9, ADAM17, NLRP3 в ЛПК. Лейкоциты являются основными клетками, реализующими иммуновоспалительные процессы в печени при НАЖБП, лежащие в основе прогрессирования печеночно-клеточной недостаточности. В настоящем исследовании впервые проведен сравнительный анализ уровней мРНК генов MMP2, MMP9, ADAM17, NLRP3 в ЛПК доноров групп исследования. По результатам дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса группы исследования статистически значимо

различаются по уровню мРНК генов *MMP2* ($H = 18,11$; $p = 0,001$), *MMP9* ($H = 11,91$; $p = 0,018$), *ADAM17* ($H = 13,81$; $p = 0,008$) и *NLRP3* ($H = 19,36$; $p = 0,001$) в периферических лейкоцитах.

Показано, что уровень транскриптов гена *MMP2* в ЛПК пациентов с СП ниже, чем у здоровых

людей и пациентов НАСГ умеренной и высокой активности. При анализе уровня мРНК гена *MMP9* в ЛПК доноров исследуемых групп статистически значимых различий не обнаружено. Таким образом, результаты анализа групповых различий в уровнях экспрессии генов *MMP2*, *MMP9* в перифе-

Таблица 4. Уровень транскриптов генов *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3* в ЛПК больных НАЖБП и здоровых людей

| Показатель | Контроль | СП | НАСГ-СА | НАСГ-УА | НАСГ-ВА |
|---|----------|--------|---------------------|--------------------|--|
| Уровень транскриптов гена <i>MMP2</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$ | | | | | |
| Медиана | 0,125 | 0,037 | 0,015 | 0,137 | 0,182 |
| Минимум | 0,006 | 0,002 | 0,001 | 0,009 | 0,020 |
| Максимум | 0,822 | 0,078 | 1,900 | 3,400 | 4,910 |
| Межквартильный размах | 0,301 | 0,050 | 0,252 | 0,529 | 2,039 |
| <i>p</i> (при $p < 0,005$) | | 0,003* | | 0,001 [#] | 0,001 [#] |
| Уровень транскриптов гена <i>MMP9</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$ | | | | | |
| Медиана | 0,010 | 0,014 | 0,007 | 0,026 | 0,031 |
| Минимум | 0,002 | 0,002 | 0,001 | 0,007 | 0,012 |
| Максимум | 0,030 | 0,085 | 0,051 | 0,101 | 0,115 |
| Межквартильный размах | 0,013 | 0,035 | 0,027 | 0,061 | 0,096 |
| <i>p</i> (при $p < 0,005$) | | | | | |
| Уровень транскриптов гена <i>ADAM17</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$ | | | | | |
| Медиана | 0,193 | 0,154 | 0,108 | 0,185 | 1,180 |
| Минимум | 0,008 | 0,015 | 0,001 | 0,013 | 0,204 |
| Максимум | 1,320 | 2,010 | 0,676 | 1,000 | 5,340 |
| Межквартильный размах | 0,452 | 0,666 | 0,483 | 0,481 | 3,167 |
| <i>p</i> (при $p < 0,005$) | | | | | 0,002* 0,002 [◊] 0,002 ^Δ |
| Уровень транскриптов гена <i>NLRP3</i> в ЛПК, отн. ед. $\times 1000$ | | | | | |
| Медиана | 0,171 | 1,595 | 0,039 | 0,246 | 0,047 |
| Минимум | 0,034 | 0,323 | 0,003 | 0,008 | 0,018 |
| Максимум | 3,770 | 11,300 | 0,983 | 1,840 | 0,988 |
| Межквартильный размах | 0,329 | 2,973 | 0,195 | 0,759 | 0,609 |
| <i>p</i> (при $p < 0,005$) | | 0,001* | <0,001 [#] | 0,002 [#] | 0,002 [#] |

Примечание. Достоверное отличие от контроля (*), группы СП (#), группы НАСГ-СА (◊), группы НАСГ-УА (Δ) (*U*-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

Таблица 5. Уровень ФНОα, ИЛ-6, рИЛ-6Р, ИЛ-8 в плазме крови и активность каспазы 3 в ЛПК больных НАЖБП и здоровых людей

| Показатель | Контроль | СП | НАСГ-СА | НАСГ-УА | НАСГ-ВА |
|--|----------|---------|---------|---------|---------------------------------------|
| ФНОα, пг/мл | | | | | |
| Медиана | 3,52 | 5,92 | 5,75 | 7,13 | 6,00 |
| Минимум | 1,45 | 3,50 | 4,17 | 3,72 | 4,33 |
| Максимум | 8,23 | 9,00 | 7,83 | 9,50 | 8,67 |
| Межквартильный размах | 3,18 | 4,11 | 1,73 | 2,34 | 2,33 |
| <i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005) | | 0,004* | 0,002* | <0,001* | 0,002* |
| ИЛ-6, пг/мл | | | | | |
| Медиана | 2,00 | 4,38 | 5,22 | 5,07 | 7,25 |
| Минимум | 0,45 | 0,57 | 1,75 | 2,25 | 1,67 |
| Максимум | 9,06 | 13,96 | 19,48 | 14,50 | 37,00 |
| Межквартильный размах | 1,41 | 6,25 | 6,63 | 2,97 | 13,44 |
| <i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005) | | 0,002* | <0,001* | <0,001* | 0,002* |
| рИЛ-6Р, нг/мл | | | | | |
| Медиана | 84,92 | 124,7 | 122,6 | 94,15 | 32,7 |
| Минимум | 18 | 40,61 | 39,2 | 24,79 | 14,36 |
| Максимум | 147,7 | 237,9 | 203,1 | 256,9 | 92,34 |
| Межквартильный размах | 73,79 | 55,30 | 95,36 | 120,63 | 31,83 |
| <i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005) | | | | | 0,004* 0,002# <0,001◊ 0,001Δ |
| ИЛ-8, пг/мл | | | | | |
| Медиана | 6,54 | 15,60 | 13,71 | 11,65 | 19,57 |
| Минимум | 1,97 | 9,57 | 3,00 | 5,14 | 4,71 |
| Максимум | 13,87 | 24,14 | 36,29 | 66,43 | 64,00 |
| Межквартильный размах | 6,38 | 8,21 | 21,36 | 12,54 | 24,41 |
| <i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005) | | <0,001* | <0,001* | <0,001* | 0,003* |
| Активность каспазы 3 в ЛПК, нмоль рNA/мин/мл | | | | | |
| Медиана | 0,448 | 0,569 | 0,726 | 1,029 | 1,041 |
| Минимум | 0,116 | 0,182 | 0,460 | 0,218 | 0,411 |
| Максимум | 1,646 | 2,759 | 2,775 | 2,880 | 2,880 |
| Межквартильный размах | 0,487 | 0,472 | 0,428 | 0,725 | 1,183 |
| <i>p</i> (при <i>p</i> < 0,005) | | | | 0,001* | 0,003* |

Примечание. Достоверное отличие от контроля (*), группы СП (#), группы НАСГ-СА (◊), группы НАСГ-УА (Δ) (*U*-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

Таблица 6. Коэффициенты корреляции по Спирмену (r_s) плазменных уровней ММП-2, ММП-9 с уровнем изучаемых показателей крови пациентов НАЖБП и здоровых людей (при $p < 0,05$)

| Показатель | Контроль | | СП | | НАСГ-СА | | НАСГ-УА | | НАСГ-ВА | |
|----------------------|----------|--------|-------|-------|---------|--------|---------|-------|---------|--------|
| | ММП-2 | ММП-9 | ММП-2 | ММП-9 | ММП-2 | ММП-9 | ММП-2 | ММП-9 | ММП-2 | ММП-9 |
| ИГА | | | | | | | | | | |
| АЛТ | | | | | | -0,538 | | | | |
| АСТ | | | | | | | | | | |
| Билирубин общий | | | | | | | | | | |
| ЩФ | | | | | | | | | | |
| СРБ | | | | | | | | | | |
| СОЭ | | | | | 0,761 | | | | 0,833 | |
| Лейкоциты | 0,710 | | | | | | | | | |
| Альбумин | | | | | | | | | | |
| Глюкоза | | | | | | | | | | |
| ОХС | | | | | | | | | | |
| ЛПВП | | -0,689 | | | | | | | | |
| ЛПНП | | | | | | | | | | |
| ТГ | | | | | | -0,572 | | | -0,568 | |
| APRI | | | | | | | | | | |
| FIB-4 | | | | | | | | | | |
| мРНК MMP2 | | | 0,611 | | | | | | | |
| мРНК MMP9 | | | | | | | | | | |
| мРНК ADAM17 | | | | | | -0,618 | | | | |
| мРНК NLRP3 | | | | | | | | | | |
| ФНО α | | | | | | | | | | |
| ИЛ-6 | | | | | | | | | | |
| рИЛ-6Р | | | | | | 0,715 | | | | 0,753 |
| ИЛ-8 | | | | | | | | | | |
| ФЦК-18 | | | | | | | | | | |
| Активность каспазы 3 | | 0,669 | | | | | | | | -0,754 |
| | | | | | | | | | | |

рических лейкоцитах (табл. 4) корреспондируют с различиями в концентрациях кодируемых ими ферментов в крови (рис. 1; рис. 3) только в случае уровня ММП2. В плазме крови содержание этого фермента и количество мРНК гена MMP2 в ЛПК у пациентов СП оказались ниже по сравнению с

контрольной группой. Уровень транскриптов гена ADAM17 в ЛПК при НАСГ-ВА выше, чем у доноров контрольной группы, НАСГ-СА и НАСГ-УА. Экспрессия гена NLRP3 в периферических лейкоцитах людей с простым стеатозом превышает таковую у доноров всех других групп исследования (табл. 4).

Уровень ФНО α , ИЛ-6, рИЛ-6Р, ИЛ-8 в плазме крови и активность каспазы 3 в ЛПК. Согласно результатам дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса, группы исследования статистически значимо различаются по уровню ФНО α ($H = 24,56$; $p < 0,001$), ИЛ-6 ($H = 33,68$; $p < 0,001$), рИЛ-6Р ($H = 20,71$; $p < 0,001$) и ИЛ-8 ($H = 22,46$; $p < 0,001$) в плазме крови. Кроме того, обнаружены статистически значимые различия между группами по активности каспазы 3 в ЛПК ($H = 18,22$; $p = 0,001$).

Показано, что в плазме крови пациентов СП и НАСГ всех степеней активности повышен уровень провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-6 и ИЛ-8 относительно контроля, при этом различия в содержании этих цитокинов у разных групп пациентов НАЖБП не зарегистрированы. Уровень рИЛ-6Р в плазме крови при НАСГ-ВА ниже, чем у доноров других групп. Активность каспазы 3 в ЛПК при НАСГ умеренной и высокой активности выше, чем у здоровых людей (табл. 5).

Корреляционные связи между уровнем ММП-2, ММП-9 и уровнем изучаемых показателей крови. Согласно полученным результатам, уровни ММП-2 и ММП-9 в плазме крови пациентов с НАЖБП и здоровых людей не коррелируют между собой ($p > 0,05$). Проведен корреляционный анализ уровней ММП-2 и ММП-9 в плазме крови с комплексом изучаемых биохимических и молекулярно-генетических показателей (табл. 6).

В контрольной группе выявлена сильная связь между уровнем ММП-2 и уровнем лейкоцитов. У пациентов СП концентрация ММП-2 в крови положительно коррелирует с уровнем мРНК гена MMP2 в ЛПК. При НАСГ-СА и -ВА выявлены положительные корреляции заметной и высокой силы уровня ММП-2 с клиническим маркером воспаления (СОЭ) (табл. 6).

У здоровых людей выявлена заметная отрицательная корреляция уровня ММП-9 в плазме крови с содержанием ЛПВП и положительная – с активностью каспазы 3 в ЛПК. У пациентов с НАСГ-СА уровень ММП-9 заметно отрицательно коррелирует с АЛТ, АПР, уровнем мРНК гена ADAM17 в ЛПК и положительно – с содержанием рИЛ-6Р в крови. При НАСГ-УА обнаружена заметная отрицательная связь содержания ММП-9 с ИГА, уровнем ТГ и активностью каспазы 3 в ЛПК. У пациентов НАСГ-ВА выявлена сильная положительная связь плазменных уровней ММП-9 и рИЛ-6Р. Кроме того, при НАСГ-ВА концентрация ММП-9 отрицательно коррелирует с активностью каспазы 3 (табл. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

СП является ранней формой НАЖБП и характеризуется доброкачественным клиническим те-

чением, тогда как НАСГ отличается прогрессирующим течением с возможным развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [19, 20]. Одной из важных проблем гастроэнтерологии является различие раннего НАСГ от СП, что достаточно сложно сделать на основании изменения рутинных лабораторных показателей, которое может быть неспецифичным для диагностики, что подтверждается результатами проведенного нами сравнительного анализа клинико-лабораторных данных здоровых доноров и пациентов с НАЖБП (СП и НАСГ разной степени гистологической активности) (табл. 1). При стеатозе печени рутинные клинико-лабораторные показатели крови не отличаются от контроля, уровень показателя апоптоза гепатоцитов (ФЦК-18) выше, чем у здоровых людей. НАСГ слабой активности отличается от СП повышенным уровнем аминотрансфераз и ЛПНП. По мере нарастания активности НАСГ закономерно повышается уровень маркеров воспаления, нарастают проявления цитолитического и холестатического синдромов и изменяется липидный профиль. В настоящем исследовании среди пациентов не было людей с выраженным фиброзом печени, при этом были выявлены различия уровней ММП-2 и ММП-9 в плазме крови и мРНК гена MMP2 в ЛПК пациентов разных групп исследования.

Согласно нашим данным, уровень мРНК гена MMP2 в ЛПК (табл. 4) и содержание ММП-2 в плазме крови (рис. 1) снижены у пациентов СП относительно контроля, в остальных случаях групповые различия на уровне экспрессии генов MMP2, MMP9 в периферических лейкоцитах не корреспондируют с различиями в концентрациях кодируемых ферментов в крови. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии однонаправленных изменений в профилях экспрессии генов MMP2 и MMP9 в ЛПК и уровне кодируемых ферментов в плазме в зависимости от формы НАЖБП и степени активности НАСГ, что может быть связано со сложной регуляцией ММП. Известно, что уровень активной формы ММП может регулироваться на уровне транскрипции (экспрессии кодирующих генов) и на уровне механизмов, влияющих на активность фермента (среди них активация зимогена, компартментализация активных протеиназных процессов, связывание с тканевыми ингибиторами металлопротеиназ) [34]. Trojanek et al. [71] провели анализ уровня мРНК генов ММП и их тканевых ингибиторов в ЛПК детей с ультразвуковыми признаками жировой болезни печени и показали, что у детей с НАЖБП уровни мРНК генов MMP9, TIMP2 в ЛПК и концентрация ММП-9 и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (ТИМП-1) в плазме повышены по сравнению с контрольной группой.

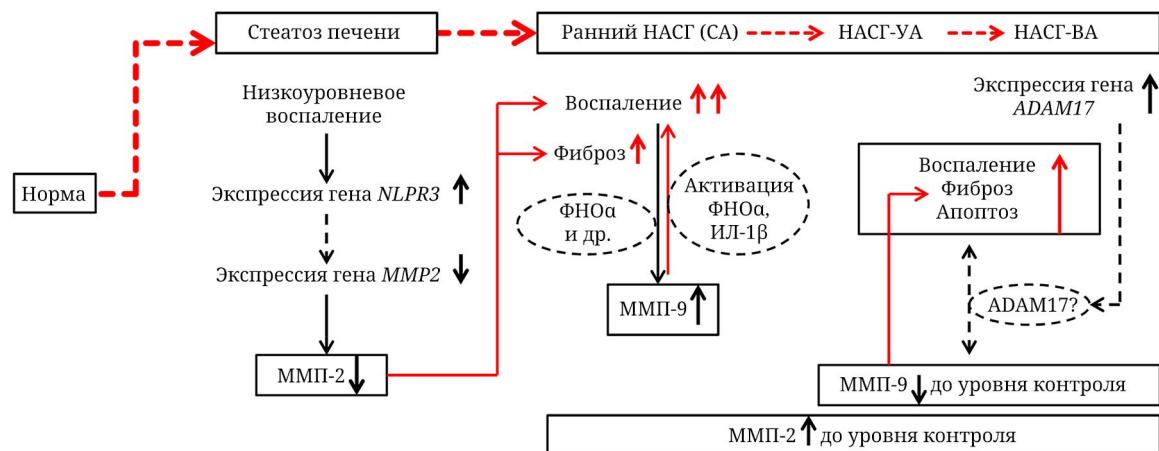


Рис. 4. Схема, отражающая предполагаемую связь изменения уровней ММП-2 и -9 и разных стадий НАЖБП. Объяснения в тексте; ↑ – увеличение; ↓ – уменьшение

Авторы пришли к выводу, что изменения в профилях экспрессии *MMP/TIMP* в лейкоцитах в основном не связаны с их уровнями в плазме [71]. Cursio et al. [60] на крысиной модели повреждения печени, вызванного ишемией/реперфузией, также показали, что уровень мРНК генов ММП может не соответствовать содержанию активной формы ММП в зависимости от стадии фиброза: экспрессия мРНК гена *MMP2* повышалась на всех стадиях повреждения печени, однако активная ММП-2 была обнаружена на более поздних стадиях, во время разрешения фиброза. Авторы показали, что экспрессия гена *MMP2*, а также генов, кодирующих ММП-14 и ТИМП-2 (необходимых для активации ММП-2), индуцируются с задержкой и длительно при повреждении печени [60]. Авторы отметили, что ранняя индукция ММП после реперфузии способствует повреждению печени и может способствовать гибели клеток. Можем предположить, что при СП действуют механизмы, которые тонко регулируют уровень ММП-2 и -9, не допуская их повышения на первых этапах повреждения печени. Важно, что в нормальной печени уровень ММП сбалансировано регулируется множеством молекул, и нарушение этого баланса вносит вклад в развитие патологии. Например, несбалансированная экспрессия ТИМП и ММП может ускорить или обострить развитие фиброза [93].

Мы выявили снижение ММП-2 при СП, хотя в последующих стадиях НАЖБП отличия от контрольной группы не обнаружено (рис. 1). Уровень транскриптов гена *MMP2* в ЛПК пациентов СП ниже, чем у пациентов НАСГ-УА и -ВА (табл. 4). Наши данные позволяют предполагать, что уровень ММП-2 при СП снижается за счет снижения уровня транскрипции гена *MMP2*, что косвенно подтверждается также данными корреляционного анализа, согласно которым выявлена замет-

ная корреляция между уровнем мРНК гена *MMP2* и содержанием ММП-2 в крови при СП (табл. 6). На рис. 4 представлена схема, отражающая предполагаемую связь изменения уровней ММП-2 и -9 и разных стадий НАЖБП. По нашему мнению, снижение уровня ММП-2 в крови именно на стадии простого стеатоза при НАЖБП (в условиях отсутствия выраженного фиброза) объясняется запуском «низкоуровневого воспаления». Низкоуровневое хроническое воспаление (low-grade chronic inflammation) при гепатостеатозе имеет основополагающее значение в прогрессировании НАЖБП. К основным факторам, осуществляющим регуляцию экспрессии различных растворимых провоспалительных медиаторов (цитокинов и хемокинов) и молекул адгезии лейкоцитов при запуске воспаления, относится индуцируемый фактор транскрипции NF-кВ [94]. К генам-мишениям NF-кВ относятся гены, кодирующие ФНО α , ИЛ-1, ИЛ-6, МСР-1 и другие [95]. Белая жировая ткань является основным жировым депо и крупнейшим эндокринным органом, который системно секretирует адипокины и цитокины. При увеличении пула свободных жирных кислот адипоциты подвергаются аномальному расширению, что приводит к гипоксии и старению, вызванному ремоделированием. В этих условиях адипоциты испытывают стресс эндоплазматического ретикулума, повышается продукция активных форм кислорода. Слабовыраженное хроническое воспаление инициируется и поддерживается с течением времени дисфункциональными адипоцитами, которые секретируют воспалительные адипоцитокины (лептин, резистин, ФНО α , ИЛ-6 и другие), и инфильтрацией иммунных клеток, продуцирующих цитокины и хемокины [96]. Большую роль в процессах низкоуровневого воспаления отводят активированным макрофагам жировой ткани, которые участвуют в воспалительных сигнальных

путях, включающих JNK, IKK/NF-кВ и JAK/STAT, посредством секреции воспалительных факторов, таких как ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-1 β и ЛТВ4, тем самым вызывая хроническое воспаление жировой ткани, печени и мышц, что в дальнейшем приводит к резистентности к инсулину [97].

Низкоуровневое воспаление, которое имеет место при простом стеатозе печени, не проявляется гистологически, не отражается в изменениях рутинных клинико-лабораторных показателей крови (табл. 1), однако регистрируется повышение провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8) в крови по сравнению с контролем (табл. 5). Запуск воспалительных процессов на самой ранней стадии патогенеза НАЖБП (СП) подтверждается также повышением экспрессии в периферических лейкоцитах гена *NLRP3*, кодирующего ключевой компонент NLRP3-инфламмосомы (табл. 4). NLRP3-инфламмосома играет решающую роль в воспалении при НАЖБП, способствуя повреждению печени и фиброзу при развитии НАСГ [81, 98]. Белок NLRP3 (pyrin domain containing protein 3) взаимодействует с апоптоз-ассоциированным белком PYCARD/ASC, содержащим домен рекрутования каспазы 1, расщепляющей предшественники ИЛ-1 β и ИЛ-18 с образованием их биологически активных форм [81]. Как известно, ИЛ-1 β индуцирует продукцию ММП-2 клетками соединительной ткани, а активированная ММП-2, в свою очередь, отрицательно регулирует активность ИЛ-1 β посредством его деградации [54]. Есть данные о том, что экспрессия гена *NLRP3* в печени повышается у мышей с индуцированным стеатозом уже на ранней стадии (при СП), при этом увеличение компонентов NLRP3-инфламмосомы на уровне белка происходит только на стадии НАСГ [99]. Согласно нашим данным, на стадии СП имеет место понижение уровня ММП-2 в крови и повышение уровня транскриптов гена *NLRP3* в ЛПК, тогда как при трансформации СП в НАСГ (на стадии НАСГ) концентрация ММП-2 и уровень экспрессии гена *NLRP3* не отличаются от группы здоровых людей (рис. 1; табл. 4). Предполагаем, что снижение уровня ММП-2 при СП может приводить к активации/усилению воспаления. В пользу этого выступают данные о противовоспалительных свойствах ММП-2. При дефиците ММП-2 у человека развивается тяжелый воспалительный и метаболический синдром, включающий сердечную дисфункцию, вероятно, за счет избытка сердечной фосфолипазы А2 (сердечная sPLA2). sPLA2 высвобождается из кардиомиоцитов в ответ на моноцитарный хемоатрактантный белок-3 (МСР-3) [52]. МСР-3 является провоспалительным цитокином, ММП-2 инактивирует МСР-3 расщеплением. Расщепленный МСР-3 связывается с СС-хемокиновыми рецепторами (CCR1, CCR2

и CCR3), действуя как общий антагонист хемокинов [53]. ММП-2 реализует противовоспалительное действие также посредством деградации провоспалительного ИЛ-1 β [54]. Согласно нашим данным, при НАСГ наблюдается повышение уровня ММП-2 до уровня контроля и обнаруживается положительная корреляция концентрации ММП-2 в крови с СОЭ у пациентов НАСГ-СА, НАСГ-ВА (сила связи оценивается как высокая) (табл. 6), что может быть связано с трансформацией низкоуровневого воспаления в активное и повышением активности NLRP3-инфламмосомы. Большую роль в реализации этой связи играет ИЛ-1 β , который, по данным, полученным нами ранее, повышен при СП и НАСГ относительно контроля и на цирротической стадии НАЖБП достигает максимума [77].

Снижение уровня ММП-2 при стеатозе печени может быть связано не только с запуском провоспалительных механизмов (формированием и поддержанием низкоуровневого воспаления), но и с активацией профибротических механизмов и подавлением продукции ММП-2, выполняющей протективную роль. Показано, что дефицит ММП-2 вызывает активацию ЗКП и ускоряет фиброз в мышиных моделях фиброза, индуцированного СС14 и холестазом [39, 40], предположительно, за счет активации продукции ТИМП-1 [40]. Кроме того, показано, что ММП-2 подавляет экспрессию коллагена α 1(I) активированными ЗКП, обеспечивая тем самым защитную роль при фиброгенезе [39]. Согласно данным Were et al. [81], уровень мРНК гена *NLRP3* в печени повышен при НАСГ и коррелирует с отложением коллагена, при этом делеция *Nlrp3* у мышей с индуцируемым НАСГ и фиброзом приводит к защите от фиброза печени и снижению мРНК гена коллагена I типа *COL1A1* по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом, можно предположить, что активация воспаления при СП приводит к активации экспрессии гена *NLRP3*, что влечет за собой повышение экспрессии гена, кодирующего про-альфа 1-цепь коллагена I. Уровень ММП-2, способной подавлять экспрессию коллагена α 1(I) активированными ЗКП, при этом снижен, что приводит к избыточному синтезу коллагена I, важного компонента ВКМ печени.

Нами впервые показано, что повышение концентрации ММП-9 в плазме крови пациентов с НАСГ-СА имеет диагностическую значимость для выявления НАСГ-СА среди пациентов с простым стеатозом с оптимальным порогом отсечения >389,50 пг/мл ММП-9 в плазме крови (табл. 3). Эти результаты имеют потенциальную клиническую ценность для диагностики ранних форм НАЖБП при отсутствии значимого фиброза. Другими исследователями предпринимались попытки оце-

нить уровень ММП в крови пациентов НАЖБП и рассмотреть возможность использования данных показателей в качестве маркеров разграничения форм заболевания (НАСГ и СП) и стадий фиброза. Trojanek et al. [71] показали, что у детей с НАЖБП уровни мРНК *MMP9* и *TIMP2* в ЛПК и концентрация ММП-9 и ТИМП-1 в плазме повышены по сравнению с контрольной группой. Однако группа пациентов в данном исследовании была сформирована только из детей с высоким уровнем АЛТ и АСТ [71]. В другой работе сывороточные уровни ММП-9, ТИМП-1 и ТИМП-2 были оценены в качестве клинико-лабораторных маркеров фиброза печени при НАЖБП [73]. Согласно расчетам по формуле Кульбака, авторы отнесли уровень ММП-9 в сыворотке крови к наиболее информативным показателям в оценке прогрессирования начальных стадий фиброза (I → II), а уровень ТИМП-1 и ТИМП-2 – к более информативным в отношении прогрессирования фиброза II в III стадию. При этом статистически значимые различия между группами пациентов в зависимости от степени фиброза выявлены только по уровню ТИМП-2 и не обнаружены для концентрации ММП-9 и ТИМП-1 в сыворотке крови [73]. Другими авторами был выявлен повышенный уровень ММП-2 и ММП-9 в крови у больных НАЖБП по сравнению с контролем, однако данные показатели не имели диагностической значимости для различия НАСГ от СП. При этом около половины пациентов с НАЖБП имели сахарный диабет [100]. В одном исследовании было показано, что уровень ММП-9 имеет прогностическую значимость для выявления НАСГ у пациентов с морбидным ожирением, которым показана бariatрическая операция [101]. В проведенное нами исследование не были включены пациенты НАЖБП с диабетом, морбидным ожирением, выраженным фиброзом. Кроме того, мы рассматривали НАСГ разной степени гистологической активности, в том числе НАСГ-СА.

Мы считаем, что выявленное нами повышение уровня ММП-9 в крови при раннем НАСГ (НАСГ-СА) связано с ролью ММП-9 в активной миграции иммунокомпетентных клеток крови в печень на раннем этапе трансформации стеатоза печени в стеатогепатит, когда запускаются гепатоцеллюлярная баллонная дегенерация, дольковое и портальное воспаление. Считается, что уровень экспрессии ММП-2 относительно постоянен и не зависит от содержания цитокинов или факторов роста, а базальные уровни ММП-9 обычно низки, и ее экспрессия может индуцироваться повышенным уровнем цитокинов/хемокинов, включая ФНО α [56]. Нами показано, что концентрации основных провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8) в крови при СП и НАСГ выше

по сравнению с контролем и не различаются в зависимости от формы НАЖБП и активности НАСГ (табл. 5). Цитокины и другие провоспалительные факторы могут индуцировать выработку ММП-9 моноцитами, лейкоцитами, макрофагами и фибробластами [29, 56]. ММП-9, в свою очередь, участвует в процессах воспаления, активируя провоспалительные цитокины, такие как ФНО α и ИЛ-1 β [51, 70], а также способствуя инфильтрации лейкоцитов в печень [48–50]. Накоплены данные, свидетельствующие о снижении инфильтрации лейкоцитов в печень при дефиците ММП-9. В модели экспериментально вызванного стеатоза у мышей нокаут гена *Mmp9* приводил к снижению инфильтрации лейкоцитов, экспрессии провоспалительных цитокинов и некроза печени по сравнению с мышами дикого типа [48]. Также показано, что ММП-9 является критическим медиатором миграции лейкоцитов при повреждении печени, вызванном ишемией/реперфузией [49]. ММП-9 способствует адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и транспорту нейтрофилов в воспаленные ткани посредством расщепления большого эндотелина-1 (ЕТ-1) с образованием ЕТ-1(1–32), который связывается с рецептором эндотелина А, приводя к снижению экспрессии L-селектина и активации интегрина CD11b/CD18 на поверхности нейтрофилов [50]. Таким образом, высокий уровень ММП-9 в плазме крови при раннем НАСГ (НАСГ-СА) может быть связан с активацией воспалительного процесса при прогрессировании НАЖБП от СП к НАСГ, в том числе с активной миграцией иммунокомпетентных клеток крови в печень.

Что касается уровня ММП-9 при более высокой активности НАСГ (НАСГ-УА, -ВА), он оказался понижен до уровня контроля, что может быть связано с преобладанием антифибротических эффектов данной металлопротеазы. Участие ММП-9 в антифибротических механизмах при НАСГ косвенно подтверждается результатами корреляционного анализа, согласно которым ММП-9 заметно отрицательно коррелирует с АЛТ и APRI при НАСГ-СА и также отрицательно – с ИГА при НАСГ-УА (табл. 6). Отрицательная корреляция уровня ММП-9 в крови с показателями фиброза была также выявлена в работе Goyale et al. [102]. Есть подтверждения того, что ММП-9 играет важную роль в разрешении фиброза печени [42, 43]. ММП-9 может активировать апоптоз ЗКП [41], а также способствовать переключению макрофагов с M1 (воспалительного) на M2 (прорегенеративный) тип [42].

Ранее нами были показаны различия цитокинового профиля и уровней некоторых показателей апоптоза в крови пациентов с разными формами НАЖБП, что подтверждает тесную связь

процессов воспаления и апоптоза при прогрессировании НАЖБП [77, 78]. Развитие НАСГ сопровождается активацией процессов воспаления, фиброза и апоптоза [19, 20]. Согласно результатам анализа связи между изменениями концентрации ММП-9 и уровнем изучаемых показателей крови пациентов НАЖБП и здоровых людей, при НАСГ-СА уровень ММП-9 в плазме отрицательно коррелирует с уровнем мРНК гена *ADAM17* в ЛПК и положительно – с содержанием рИЛ-6Р в крови (табл. 6). Уровень транскриптов гена *ADAM17* в ЛПК при НАСГ высокой активности выше, чем у здоровых людей и пациентов групп НАСГ-СА и -УА. *ADAM17* является важным регулятором процессов воспаления и регенерации, расщепляя эктодомены различных трансмембранных белков, таких как факторы роста, рецепторы и их лиганды, цитокины и молекулы клеточной адгезии [103], а также принимает участие в процессах апоптоза и фиброза [80]. Фермент *ADAM17* опосредует индуцированный апоптозом каспазозависимый шеддинг растворимого рецептора ИЛ-6 (рИЛ-6Р) из клеточной мембраны, осуществляя протеолитическое высвобождение ФНО α [80]. Ранее нами выявлена тесная связь изменения уровня рИЛ-6Р с процессами апоптоза ЛПК и гепатоцитов [78]. Li et al. [79] показали, что *ADAM17* опосредует экспрессию ММП-9 через ось *ADAM17/TNF α /NF- κ B*. Также авторы показали, что нацеливание на *ADAM17* интерферирующей РНК с помощью лентивирусного вектора подавляет индуцированную липополисахаридом экспрессию ММП-9 в эпителиальных клетках легких посредством ингибирования передачи сигналов TNF α /NF- κ B [79]. Вероятно, одной из ключевых молекул в реализации выявленной нами сильной положительной связи плазменных уровней ММП-9 и рИЛ-6Р при НАСГ-ВА (табл. 6) выступает *ADAM17*. Логично было бы ожидать, что высокая концентрации рИЛ-6Р в крови будет соответствовать высокому уровню мРНК гена *ADAM17*, но, по нашим данным, при НАСГ-ВА уровень мРНК гена *ADAM17* в ЛПК оказался выше, чем у здоровых людей, НАСГ-СА и -УА (табл. 4), а уровень рИЛ-6Р – ниже, чем у других групп (табл. 5). Здесь необходимо отметить, что мы оценивали экспрессию *ADAM17* только на уровне транскриптов гена, поэтому не исключено, что на уровне белка могут быть получены иные данные.

В последнее время появляется все больше сведений об участии ММП в реализации апоптоза гепатоцитов. Показано, что у *Mtrp9^{-/-}*-мышей ослаблена регенерация печени после частичной гепатэктомии, снижен уровень апоптоза гепатоцитов (согласно результатам TUNEL) и экспрессия активной формы каспазы 3 [67]. В работе An et al. [104] был описан эффект розмариновой

кислоты на клетки НерG2. Обработка розмариновой кислотой дозозависимо усиливала апоптоз клеток НерG2, при этом экспрессия ММП-9 снижалась, а уровень расщепленной каспазы 3 был увеличен [104]. В нашем исследовании уровень ФЦК-18, который является специфическим показателем апоптоза гепатоцитов, повышен при СП и НАСГ относительно контроля и нарастает при прогрессировании НАСГ (табл. 1). При этом активность каспазы 3 в периферических лейкоцитах при НАСГ-УА и -ВА выше, чем у здоровых людей (табл. 5). Нами выявлена заметная положительная корреляция между уровнем ММП-9 в плазме и активностью каспазы 3 в ЛПК доноров контрольной группы, в то время как при НАСГ-УА и -ВА данные показатели коррелируют отрицательно (табл. 6). Таким образом, при НАЖБП уровень ММП-9 может быть связан не только с воспалением, но и с процессом апоптоза. Вероятно, на фоне активации воспаления при переходе СП к раннему НАСГ повышается уровень ММП-9 в крови. При повышении активности НАСГ происходит усиление апоптоза гепатоцитов (согласно уровню ФЦК-18), повышается уровень активности каспазы 3 в ЛПК, при этом уровень ММП-9 в крови снижается до уровня контроля и СП. Полученные нами данные о снижении уровня ММП-9 при усиении апоптоза согласуются с результатами культурального эксперимента An et al. [104].

Таким образом, уровень ММП-2 и ММП-9 может быть связан с наличием и активностью воспаления в паренхиме печени, в том числе на ранних стадиях патогенеза НАЖБП, когда имеет место низкоуровневое воспаление и запуск процессов фиброгенеза. Снижение уровня ММП-2 в крови при СП может означать подавление противовоспалительных и антифибротических реакций, в которых участвует ММП-2. С другой стороны, при СП активируются провоспалительные процессы, в том числе экспрессия гена *NLRP3* в периферических лейкоцитах больных НАЖБП, что было показано нами впервые. Развитие НАСГ сопровождается активацией процессов воспаления, фиброза и апоптоза. Высокий уровень ММП-9 в плазме крови при раннем НАСГ (НАСГ-СА) может быть связан с активацией воспалительного процесса при прогрессировании НАЖБП от СП к НАСГ. Провоспалительные факторы индуцируют продукцию ММП-9, которая усиливает воспаление, процессируя провоспалительные цитокины и способствуя инфильтрации лейкоцитов в печень. Дальнейшее снижение уровня ММП-9 при прогрессировании НАСГ может быть связано с преобладанием антифибротических эффектов данной металлопротеазы, а также с активацией процессов апоптоза.

Возможно, определенную роль в реализации этой связи играет ADAM17.

Ограничения исследования. Роль тканевых ингибиторов металлопротеиназ в регуляции экспрессии ММП-2 и -9 при прогрессировании НАЖБП еще предстоит оценить. Кроме того, ограничением данного исследования может служить отсутствие данных об уровне протеолитической активности ММП-2 и ММП-9 в крови исследуемых, что затрудняет сравнение результатов с уже имеющимися в литературе сведениями [105, 106].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые показано одновременное снижение ММП-2 при СП на фоне активации NLRP3-зависимых провоспалительных каскадов, что может иметь значение при дифференциальной диагностике простого стеатоза, если в будущих исследованиях будет подтверждено, что уровень ММП-2 стабильно снижен на протяжении всей стадии стеатоза. Мы также обнаружили повышение ММП-9 при НАСГ-СА, отражающее дебют морфологической трансформации заболевания, миграцию лейкоцитов и гибель гепатоцитов. В связи с этим считаем, что ММП-9-связанные молекулярно-биологические каскады могут открыть новые терапевтические мишени, которые помогут купировать трансформацию стеатоза в стеатогепатит. Мы впервые показали, что уровень ММП-9 в плазме крови $>389,50$ пг/мл имеет диагностическую значимость для выявления раннего НАСГ (слабой активности) среди пациентов с простым стеатозом, что представляется особенно перспективным для диагностики НАСГ из-за невозможности выполнения биопсии печени по этическим причинам и вследствие диагностических ограничений.

Полученные результаты расширяют имеющееся на данный момент понимание роли ММП-2 и ММП-9 в реализации процессов воспаления, фиброза и апоптоза при прогрессировании НАЖБП. Представляется перспективным более глубокое изучение роли желатиназ на ранних стадиях заболевания, в том числе при трансформации стеатоза печени в НАСГ, с целью разработки терапевтических стратегий для снижения риска прогрессирования заболевания.

Вклад авторов. И.В. Курбатова – концепция, планирование и проведение экспериментов, статистическая обработка и обсуждение результатов, написание и редактирование текста; Л.В. Топчиеva – планирование и проведение экспериментов, обсуждение результатов, редактирование текста; О.П. Дуданова – формирование групп исследования, обсуждение результатов, редактирование текста; А.А. Шиповская – формирование и клинико-лабораторная характеристика групп исследования.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № FMEN-2022-0009 (государственная регистрация № 122031100064-4).

Благодарности. Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ «Карельский научный центр РАН».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маевская М. В., Котовская Ю. В., Ивашкин В. Т., Ткачева О. Н., Трошина Е. А., Шестакова М. В., Бредер В. В., Гейвандова Н. И., Дошицин В. Л., Дудинская Е. Н., Ершова Е. В., Кодзоева Х. Б., Комшилова К. А., Корочанская Н. В., Майоров А. Ю., Мишина Е. Е., Надинская М. Ю., Никитин И. Г., Погосова Н. В., Тарзиманова А. И., Шамхалова М. Ш. (2022) Национальный Консенсус для врачей по ведению взрослых пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и ее основными коморбидными состояниями, *Ter. Arxiv*, **94**, 216-253, <https://doi.org/10.26442/00403660.2022.02.201363>.
2. Le, M. H., Yeo, Y. H., Li, X., Li, J., Zou, B., Wu, Y., Ye, Q., Huang, D. Q., Zhao, C., Zhang, J., Liu, C., Chang, N., Xing, F., Yan, S., Wan, Z. H., Tang, N. S. Y., Mayumi, M., Liu, X., Liu, C., Rui, F., Yang, H., Yang, Y., Jin, R., Le, R. H. X., Xu, Y., Le, D. M., Barnett, S., Stave, C. D., et al. (2022) 2019 global NAFLD prevalence: a systematic review and meta-analysis, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **20**, 2809-2817.e28, <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.12.002>.
3. Younossi, Z. M., Golabi, P., Paik, J. M., Henry, A., Van Dongen, C., and Henry, L. (2023) The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review, *Hepatology*, **77**, 1335-1347, <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000004>.

4. Riazi, K., Azhari, H., Charette, J. H., Underwood, F. E., King, J. A., Afshar, E. E., Swain, M. G., Congly, S. E., Kaplan, G. G., and Shaheen, A. A. (2022) The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 851-861, [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00165-0).
5. Маев И. В., Андреев Д. Н., Кучерявый Ю. А. (2023) Распространенность неалкогольной жировой болезни печени в России: мета-анализ, *Consilium Medicum*, **25**, 313-319, <https://doi.org/10.26442/20751753.2023.5.202155>.
6. Arab, J. P., Arrese, M., and Trauner, M. (2018) Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *Annu. Rev. Pathol.*, **13**, 321-350, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043617>.
7. Parthasarathy, G., Revelo, X., and Malhi, H. (2020) Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: an overview, *Hepatol. Commun.*, **4**, 478-492, <https://doi.org/10.1002/hep4.1479>.
8. Loomba, R., Friedman, S. L., and Shulman, G. I. (2021) Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease, *Cell*, **184**, 2537-2564, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.015>.
9. Lee, K. C., Wu, P. S., and Lin, H. C. (2023) Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis, *Clin. Mol. Hepatol.*, **29**, 77-98, <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0237>.
10. Tilg, H., and Moschen, A. R. (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis, *Hepatology*, **52**, 1836-1846, <https://doi.org/10.1002/hep.24001>.
11. Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E. A. (2016) The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Metabolism*, **65**, 1038-1048, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>.
12. Ziolkowska, S., Binienda, A., Jabłkowski, M., Szemraj, J., and Czarny, P. (2021) The interplay between insulin resistance, inflammation, oxidative stress, base excision repair and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11128, <https://doi.org/10.3390/ijms222011128>.
13. Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., and Parks, E. J. (2014) Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **146**, 726-735, 209, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.049>.
14. Nassir, F. (2022) NAFLD: Mechanisms, treatments, and biomarkers, *Biomolecules*, **12**, 824, <https://doi.org/10.3390/biom12060824>.
15. Fujii, H., Kawada, N., and Japan Study Group of Nafld Jsg-Nafld (2020) The role of insulin resistance and diabetes in nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3863, <https://doi.org/10.3390/ijms21113863>.
16. Jung, U. J., and Choi, M. S. (2014) Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 6184-6223, <https://doi.org/10.3390/ijms15046184>.
17. Ji, Y., Yin, Y., Li, Z., and Zhang, W. (2019) Gut microbiota-derived components and metabolites in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Nutrients*, **11**, 1712, <https://doi.org/10.3390/nu11081712>.
18. Anwar, S. D., Foster, C., and Ashraf, A. (2023) Lipid disorders and metabolic-associated fatty liver disease, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **52**, 445-457, <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2023.01.003>.
19. Ивашкин В. Т., Маевская М. В., Жаркова М. С., Котовская Ю. В., Ткачева О. Н., Трошина Е. А., Шестакова М. В., Маев И. В., Бредер В. В., Гейвандова Н. И., Дощицин В. Л., Дудинская Е. Н., Ершова Е. В., Кодзоева Х. Б., Комшилова К. А., Корочанская Н. В., Майоров А. Ю., Мишина Е. Е., Надинская М. Ю., Никитин И. Г., Погосова Н. В., Тарзиманова А. И., Шамхалова М. Ш. (2022) Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российской ассоциации эндокринологов, Российской ассоциации геронтологов и гериатров и Национального общества профилактической кардиологии по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени, *Росс. Журн. Гастроэнтерол. Гепатол. Колопроктол.*, **32**, 104-140, <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2022-32-4-104-140>.
20. Powell, E. E., Wong, V. W., and Rinella, M. (2021) Non-alcoholic fatty liver disease, *Lancet*, **397**, 2212-2224, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3).
21. Angulo, P., Kleiner, D. E., Dam-Larsen, S., Adams, L. A., Bjornsson, E. S., Charatcharoenwitthaya, P., Mills, P. R., Keach, J. C., Lafferty, H. D., Stahler, A., Haflidadottir, S., and Bendtsen, F. (2015) Liver fibrosis, but no other histologic features, is associated with long-term outcomes of patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **149**, 389-397.e10, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.043>.
22. Ratiu, V., Charlotte, F., Heurtier, A., Gombert, S., Giral, P., Bruckert, E., Grimaldi, A., Capron, F., and Poynard, T., and LIDO Study Group. (2005) Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease, *Gastroenterology*, **128**, 1898-1906, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.03.084>.
23. Portincasa, P. (2023) NAFLD, MAFLD, and beyond: one or several acronyms for better comprehension and patient care, *Intern. Emerg. Med.*, **18**, 993-1006, <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03203-0>.
24. Iqbal, U., Perumpail, B. J., Akhtar, D., Kim, D., and Ahmed, A. (2019) The epidemiology, risk profiling and diagnostic challenges of nonalcoholic fatty liver disease, *Medicines (Basel)*, **6**, 41, <https://doi.org/10.3390/medicines6010041>.

25. García-Compeán, D., and Jiménez-Rodríguez, A. R. (2022) NAFLD VS MAFLD. The evidence-based debate has come. Time to change? *Ann. Hepatol.*, **27**, 100765, <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2022.100765>.
26. Kaya, E., and Yilmaz, Y. (2022) Metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD): a multi-systemic disease beyond the liver, *J. Clin. Transl. Hepatol.*, **10**, 329-338, <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00178>.
27. Parola, M., and Pinzani, M. (2019) Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues, *Mol. Aspects Med.*, **65**, 37-55, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>.
28. Böttcher, K., and Pinzani, M. (2017) Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **121**, 3-8, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.016>.
29. Geervliet, E., and Bansal, R. (2020) Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases, *Cells*, **9**, 1212, <https://doi.org/10.3390/cells9051212>.
30. Kisseeleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., Evans, S. M., Dillmann, W., Glass, C. K., and Brenner, D. A. (2012) Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9448-9453, <https://doi.org/10.1073/pnas.1201840109>.
31. Roehlen, N., Crouchet, E., and Baumert, T. F. (2020) Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives, *Cells*, **9**, 875, <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
32. Zhao, Y. Q., Deng, X. W., Xu, G. Q., Lin, J., Lu, H. Z., and Chen, J. (2023) Mechanical homeostasis imbalance in hepatic stellate cells activation and hepatic fibrosis, *Front. Mol. Biosci.*, **10**, 1183808, <https://doi.org/10.3389/fmemb.2023.1183808>.
33. Ortiz, C., Schierwagen, R., Schaefer, L., Klein, S., Trepat, X., and Trebicka, J. (2021) Extracellular matrix remodeling in chronic liver disease, *Curr. Tissue Microenviron. Rep.*, **2**, 41-52, <https://doi.org/10.1007/s43152-021-00030-3>.
34. Giannandrea, M., and Parks, W. C. (2014) Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis, *Dis. Model Mech.*, **7**, 193-203, <https://doi.org/10.1242/dmm.012062>.
35. Iredale, J. P., Thompson, A., and Henderson, N. C. (2013) Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: biochemistry and regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 876-883, <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2012.11.002>.
36. Roeb, E. (2018) Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects), *Matrix Biol.*, **68-69**, 463-473, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.012>.
37. Alshanwani, A. R., Hagar, H., Shaheen, S., Alhusaini, A. M., Arafah, M. M., Faddah, L. M., Alharbi, F. M., Sharma A. K., Fayed, A., and Badr, A. M. (2022) A promising antifibrotic drug, pyridoxamine attenuates thioacetamide-induced liver fibrosis by combating oxidative stress, advanced glycation end products, and balancing matrix metalloproteinases, *Eur. J. Pharmacol.*, **923**, 174910, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174910>.
38. Shan, L., Wang, F., Zhai, D., Meng, X., Liu, J., and Lv, X. (2023) Matrix metalloproteinases induce extracellular matrix degradation through various pathways to alleviate hepatic fibrosis, *Biomed. Pharmacother.*, **161**, 114472, <https://doi.org/10.1016/j.bioph.2023.114472>.
39. Radbill, B. D., Gupta, R., Ramirez, M. C. M., DiFeo, A., Martignetti, J. A., Alvarez, C. E., Friedman, S. L., Narla, G., Vrabie, R., Bowles, R., Saiman, Y., and Bansal, M. B. (2011) Loss of matrix metalloproteinase-2 amplifies murine toxin-induced liver fibrosis by upregulating collagen I expression, *Dig. Dis. Sci.*, **56**, 406-416, <https://doi.org/10.1007/s10620-010-1296-0>.
40. Onozuka, I., Kakinuma, S., Kamiya, A., Miyoshi, M., Sakamoto, N., Kiyohashi, K., Watanabe, T., Funaoka, Y., Ueyama, M., Nakagawa, M., Koshikawa, N., Seiki, M., Nakauchi, H., and Watanabe, M. (2011) Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**, 134-140, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.012>.
41. Zhou, X., Murphy, F. R., Gehdu, N., Zhang, J., Iredale, J. P., and Benyon, R. C. (2004) Engagement of $\alpha_v\beta_3$ integrin regulates proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 23996-24006, <https://doi.org/10.1074/jbc.M311668200>.
42. Melgar-Lesmes, P., Luquero, A., Parra-Robert, M., Mora, A., Ribera, J., Edelman, E. R., and Jiménez, W. (2018) Graphene-dendrimer nanostars for targeted macrophage overexpression of metalloproteinase 9 and hepatic fibrosis precision therapy, *Nano Lett.*, **18**, 5839-5845, <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02498>.
43. Feng, M., Ding, J., Wang, M., Zhang, J., Zhu, X., and Guan, W. (2018) Kupffer-derived matrix metalloproteinase-9 contributes to liver fibrosis resolution, *Int. J. Biol. Sci.*, **14**, 1033-1040, <https://doi.org/10.7150/ijbs.25589>.
44. Wang, Q., Liu, X., Zhang, J., Lu, L., Feng, M., and Wang, J. (2019) Dynamic features of liver fibrogenesis and fibrosis resolution in the absence of matrix metalloproteinase 9, *Mol. Med. Rep.*, **20**, 5239-5248, <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10740>.
45. Kurzepa, J., Mądro, A., Czechowska, G., Kurzepa, J., Celiński, K., Kazmierak, W., and Slomka, M. (2014) Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **13**, 570-579, [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(14\)60261-7](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(14)60261-7).

46. Flannery, C. R. (2006) MMPs and ADAMTs: functional studies, *Front. Biosci.*, **11**, 544-569, <https://doi.org/10.2741/1818>.
47. Le, N. T., Xue, M., Castelnoble, L. A., and Jackson, C. J. (2007) The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation, *Front. Biosci.*, **12**, 1475-1487, <https://doi.org/10.2741/2161>.
48. Kato, H., Kuriyama, N., Duarte, S., Clavien, P. A., Busuttil, R. W., and Coito, A. J. (2014) MMP-9 deficiency shelters endothelial PECAM-1 expression and enhances regeneration of steatotic livers after ischemia and reperfusion injury, *J. Hepatol.*, **60**, 1032-1039, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.022>.
49. Hamada, T., Duarte, S., Tsuchihashi, S., Busuttil, R. W., and Coito, A. J. (2009) Inducible nitric oxide synthase deficiency impairs matrix metalloproteinase-9 activity and disrupts leukocyte migration in hepatic ischemia/reperfusion injury, *Am. J. Pathol.*, **174**, 2265-2277, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080872>.
50. Fernandez-Patron, C., Zouki, C., Whittal, R., Chan, J. S., Davidge, S. T., and Filep, J. G. (2001) Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32], *FASEB J.*, **15**, 2230-2240, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0178com>.
51. Gearing, A. J., Beckett, P., Christodoulou, M., Churchill, M., Clements, J., Davidson, A. H., Drummond, A. H., Galloway, W. A., Gilbert, R., Gordon, J. L., et al. (1994) Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases, *Nature*, **370**, 555-557, <https://doi.org/10.1038/370555a0>.
52. Fernandez-Patron, C., Kassiri, Z., and Leung, D. (2016) Modulation of systemic metabolism by MMP-2: from MMP-2 deficiency in mice to MMP-2 deficiency in patients, *Compr. Physiol.*, **6**, 1935-1949, <https://doi.org/10.1002/cphy.c160010>.
53. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Tam, E. M., McCulloch, C. A., Clark-Lewis, I., and Overall, C. M. (2000) Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3, *Science*, **289**, 1202-1206, <https://doi.org/10.1126/science.289.5482.1202>.
54. Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I. B., Enghild, J. J., Sasaguri, Y., and Mori, Y. (1996) Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.*, **271**, 14657-14660, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.14657>.
55. Calabro, S. R., Maczurek, A. E., Morgan, A. J., Tu, T., Wen, V. W., Yee, C., Mridha, A., Lee, M., d'Avigdor, W., Locarnini, S. A., McCaughan, G. W., Warner, F. J., McLennan, S. V., and Shackel, N. A. (2014) Hepatocyte produced matrix metalloproteinases are regulated by CD147 in liver fibrogenesis, *PLoS One*, **9**, e90571, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090571>.
56. Xue, M., March, L., Sambrook, P. N., and Jackson, C. J. (2007) Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.*, **56**, 2864-2874, <https://doi.org/10.1002/art.22844>.
57. Lichtenhagen, R., Bahr, M. J., Wehmeier, M., Michels, D., Haberkorn, C. I., Arndt, B., Flemming, P., Manns, M. P., and Boeker, K. H. (2003) Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis, *Clin. Sci. (Lond)*, **105**, 373-382, <https://doi.org/10.1042/CS20030098>.
58. Takahara, T., Furui, K., Yata, Y., Jin, B., Zhang, L. P., Nambu, S., Sato, H., Seiki, M., and Watanabe, A. (1997) Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers, *Hepatology*, **26**, 1521-1529, <https://doi.org/10.1002/hep.510260620>.
59. Prystupa, A., Boguszewska-Czubara, A., Bojarska-Junak, A., Toruń-Jurkowska, A., Roliński, J., and Załuska, W. (2015) Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, eastern Poland, *Ann. Agric. Environ. Med.*, **22**, 325-328, <https://doi.org/10.5604/12321966.1152088>.
60. Cursio, R., Mari, B., Louis, K., Rostagno, P., Saint-Paul, M. C., Giudicelli, J., Bottero, V., Anglard, P., Yiotakis, A., Dive, V., Gugenheim, J., and Auberger, P. (2002) Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor, *FASEB J.*, **16**, 93-95, <https://doi.org/10.1096/fj.01-0279fje>.
61. Giannelli, G., Bergamini, C., Marinosci, F., Fransvea, E., Quaranta, M., Lupo, L., Schiraldi, O., and Antonaci, S. (2002) Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma, *Int. J. Cancer.*, **97**, 425-431, <https://doi.org/10.1002/ijc.1635>.
62. Benyon, R. C., Hovell, C. J., Da Gaça, M., Jones, E. H., Iredale, J. P., and Arthur, M. J. (1999) Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation, *Hepatology*, **30**, 977-986, <https://doi.org/10.1002/hep.510300431>.
63. Kim, W. U., Min, S. Y., Cho, M. L., Hong, K. H., Shin, Y. J., Park, S. H., and Cho, C. S. (2005) Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis, *Arthritis Res. Ther.*, **7**, R71-R79, <https://doi.org/10.1186/ar1454>.
64. Zhao, Y., Yakufu, M., Ma, C., Wang, B., Yang, J., and Hu, J. (2024) Transcriptomics reveal a molecular signature in the progression of nonalcoholic steatohepatitis and identifies PAI 1 and MMP 9 as biomarkers in *in vivo* and *in vitro* studies, *Mol. Med. Rep.*, **29**, 15, <https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13138>.

65. Sun, M. H., Han, X. C., Jia, M. K., Jiang, W. D., Wang, M., Zhang, H., Han, G., and Jiang, Y. (2005) Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma, *World J. Gastroenterol.*, **11**, 5931-5937, <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i38.5931>.
66. Murthy, S., Ryan, A., He, C., Mallampalli, R. K., and Carter, A. B. (2010) Rac1-mediated mitochondrial H2O2 generation regulates MMP-9 gene expression in macrophages via inhibition of SP-1 and AP-1, *J. Biol. Chem.*, **285**, 25062-25073, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.099655>.
67. Olle, E. W., Ren, X., McClintock, S. D., Warner, R. L., Deogracias, M. P., Johnson, K. J., and Colletti, L. M. (2006) Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice, *Hepatology*, **44**, 540-549, <https://doi.org/10.1002/hep.21314>.
68. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes Dev.*, **14**, 163-176.
69. Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M., Cheever, A. W., Davies, S. J., McKerrow, J. H., Wakefield, L. M., Letterio, J. J., and Wynn, T. A. (2004) IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent, *J. Immunol.*, **173**, 4020-4029, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4020>.
70. Schönbeck, U., Mach, F., and Libby, P. (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing, *J. Immunol.*, **161**, 3340-3346.
71. Trojanek, J. B., Michałkiewicz, J., Grzywa-Czuba, R., Jańczyk, W., Gackowska, L., Kubiszewska, I., Helmin-Basa, A., Wierzbicka-Rucińska, A., Szalecki, M., and Socha, P. (2020) Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in peripheral blood leukocytes and plasma of children with nonalcoholic fatty liver disease, *Mediators Inflamm.*, **2020**, 8327945, <https://doi.org/10.1155/2020/8327945>.
72. Kupčová, V., Fedelešová, M., Bulas, J., Kozmonová, P., and Turecký, L. (2019) Overview of the pathogenesis, genetic, and non-invasive clinical, biochemical, and scoring methods in the assessment of NAFLD, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **16**, 3570, <https://doi.org/10.3390/ijerph16193570>.
73. Ливзан М. А., Ахмедов В. А., Кролевец Т. С., Гаус О. В., Черкащенко Н. А. (2016) Информативность неинвазивных маркеров фиброза печени у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени, *Тер. Архив*, **88**, 62-68, <https://doi.org/10.17116/terarkh2016881262-68>.
74. Kumar, S., Duan, Q., Wu, R., Harris, E. N., and Su, Q. (2021) Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **176**, 113869, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113869>.
75. Afonso, M. B., Castro, R. E., and Rodrigues, C. M. P. (2019) Processes exacerbating apoptosis in non-alcoholic steatohepatitis, *Clin. Sci. (Lond)*, **133**, 2245-2264, <https://doi.org/10.1042/CS20190068>.
76. Peiseler, M., Schwabe, R., Hampe, J., Kubes, P., Heikenwälder, M., and Tacke, F. (2022) Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease – novel insights into cellular communication circuits, *J. Hepatol.*, **77**, 1136-1160, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.06.012>.
77. Курбатова И. В., Дуданова О. П. (2017) Особенности некротически-воспалительного процесса при разных формах неалкогольной жировой болезни печени, *Тер. Архив*, **89**, 52-58, <https://doi.org/10.17116/terarkh201789252-58>.
78. Курбатова И. В., Топчиева Л. В., Дуданова О. П., Шиповская А. А. (2022) Роль растворимого рецептора интерлейкина-6 в прогрессировании НАЖБП, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **174**, 585-591, <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-174-11-585-591>.
79. Li, Y. Q., Yan, J. P., Xu, W. L., Wang, H., Xia, Y. J., Wang, H. J., Zhu, Y. Y., and Huang, X. J. (2013) ADAM17 mediates MMP9 expression in lung epithelial cells, *PLoS One*, **8**, e51701, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051701>.
80. Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2019) Regulation of fibrotic processes in the liver by ADAM proteases, *Cells*, **8**, 1226, <https://doi.org/10.3390/cells8101226>.
81. Wree, A., McGeough, M. D., Peña, C. A., Schlattjan, M., Li, H., Inzaugarat, M. E., Messer, K., Canbay, A., Hoffman, H. M., and Feldstein, A. E. (2014) NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD, *J. Mol. Med. (Berl)*, **92**, 1069-1082, <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1170-1>.
82. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., and Bacon, B. R. (1999) Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions, *Am. J. Gastroenterol.*, **94**, 2467-2474, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x>.
83. Friedewald, W. T., Levy, R. I., and Fredrickson, D. S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.*, **18**, 499-502.
84. Sterling, R. K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M. C., Montaner, J., S. Sulkowski, M., Torriani, F. J., Dieterich, D. T., Thomas, D. L., Messinger, D., and Nelson, M., and APRICOT Clinical Investigators (2006) Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection, *Hepatology*, **43**, 1317-1325, <https://doi.org/10.1002/hep.21178>.

85. Shah, A. G., Lydecker, A., Murray, K., Tetri, B. N., Contos, M. J., and Sanyal, A. J., and Nash Clinical Research Network (2009) Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**, 1104-1112, <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2009.05.033>.
86. Wai, C. T., Greenson, J. K., Fontana, R. J., Kalbfleisch, J. D., Marrero, J. A., Conjeevaram, H. S., and Lok, A. S. (2003) A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology*, **38**, 518-526, <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50346>.
87. Loaeza-del-Castillo, A., Paz-Pineda, F., Oviedo-Cárdenas, E., Sánchez-Avila, F., and Vargas-Vorácková, F. (2008) AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis, *Ann. Hepatol.*, **7**, 350-357.
88. Драпкина О. М., Шепель Р. Н., Яковенко Э. П., Зятенкова Е. В. (2019) Неинвазивные методы выявления прогрессирующего фиброза у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени, *Профилакт. Мед.*, **22**, 82-88, <https://doi.org/10.17116/profmed20192202182>.
89. ACK Lysis Buffer (2014) *Cold Spring Harb. Protoc.*, <https://doi.org/10.1101/pdb.rec083295>.
90. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, **25**, 402-408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
91. Youden, W. J. (1950) Index for rating diagnostic tests, *Cancer*, **3**, 32-35, [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3).
92. Zweig, M. H., and Campbell, G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, *Clin. Chem.*, **39**, 561-577.
93. Ren, J. J., Huang, T. J., Zhang, Q. Q., Zhang, H. Y., Guo, X. H., Fan, H. Q., Li, R. K., and Liu, L. X. (2019) Insulin-like growth factor binding protein related protein 1 knockdown attenuates hepatic fibrosis via the regulation of MMPs/TIMPs in mice, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **18**, 38-47, <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2018.08.008>.
94. Tarantino, G., Savastano, S., and Colao, A. (2010) Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance, *World J. Gastroenterol.*, **16**, 4773-4783, <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i38.4773>.
95. Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., and Hu, H. (2020) Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study, *Signal Transduct. Target Ther.*, **5**, <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>.
96. Kawai, T., Autieri, M. V., and Scalia, R. (2021) Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **320**, 375-391, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.
97. Li, H., Meng, Y., He, S., Tan, X., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, L., and Zheng, W. (2022) Macrophages, chronic inflammation, and insulin resistance, *Cells*, **11**, <https://doi.org/10.3390/cells11193001>.
98. De Carvalho Ribeiro, M., and Szabo, G. (2022) Role of the inflammasome in liver disease, *Annu. Rev. Pathol.*, **17**, 345-365, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-032521-102529>.
99. Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2011) Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells, *Hepatology*, **54**, 133-144, <https://doi.org/10.1002/hep.24341>.
100. Yilmaz, Y., and Eren F. (2019) Serum biomarkers of fibrosis and extracellular matrix remodeling in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **31**, 43-46, <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001240>.
101. Wagner, J., Kumar, Y., Lautenbach, A., von Kroge, P., Wolter, S., Mann, O., Izbicki, J., Gagliani, N., and Dupré, A. (2023) Fatty acid-binding protein-4 (FABP4) and matrix metalloproteinase-9 (MMP9) as predictive values for nonalcoholic steatohepatitis (NASH), *Lipids Health Dis.*, **22**, 1, <https://doi.org/10.1186/s12944-022-01764-1>.
102. Goyale, A., Jain, A., Smith, C., Papatheodoridi, M., Misas, M. G., Roccarina, D., Prat, L. I., Mikhailidis, D. P., Nair, D., and Tsochatzis, E. (2021) Assessment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) severity with novel serum-based markers: A pilot study, *PLoS One*, **16**, e0260313, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260313>.
103. Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., and Rose-John, S. (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration, *Trends Immunol.*, **32**, 380-387, <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.005>.
104. An, Y., Zhao, J., Zhang, Y., Wu, W., Hu, J., Hao, H., Qiao, Y., Tao, Y., and An, L. (2021) Rosmarinic acid induces proliferation suppression of hepatoma cells associated with NF-κB signaling pathway, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **22**, 1623-1632, <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.5.1623>.
105. Munsterman, I. D., Kendall, T. J., Khelil, N., Popa, M., Lomme, R., Drenth, J. P. H., and Tjwa, E. T. T. L. (2018) Extracellular matrix components indicate remodelling activity in different fibrosis stages of human non-alcoholic fatty liver disease, *Histopathology*, **73**, 612-621, <https://doi.org/10.1111/his.13665>.
106. Barchuk, M., Schreier, L., Berg, G., and Miksztowicz, V. (2018) Metalloproteinases in non-alcoholic fatty liver disease and their behavior in liver fibrosis, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.*, **41**, <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0037>.

**THE ROLE OF MMP-2 AND MMP-9 IN THE RELATIONSHIP
OF INFLAMMATION, FIBROSIS AND APOPTOSIS
DURING THE PROGRESSION OF NON-ALCOHOLIC
FATTY LIVER DISEASE AND THE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE
OF THE PLASMA LEVEL OF THEIR ACTIVE FORMS**

I. V. Kurbatova^{1*}, L. V. Topchieva¹, O. P. Dudanova², and A. A. Shipovskaya²

¹ *Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia; e-mail: irina7m@yandex.ru*

² *Medical Institute named after Professor A.P. Zilber, Petrozavodsk State University,
185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia*

MMP-2 and MMP-9 play an important role in the pathogenesis of chronic liver diseases, participating in the processes of inflammation and fibrosis. Their role in the progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is poorly understood. The analysis of MMP-2, -9 levels in the blood plasma of patients with different forms of NAFLD (liver steatosis (LS) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) of weak (-WA), moderate (MA), high (-HA) activity without pronounced fibrosis) was performed. Correlations between the levels of MMP-2, -9 and mRNA of the genes *MMP2*, *MMP9*, *ADAM17*, *NLRP3*, caspase 3 activity in peripheral blood leukocytes (PBL), TNF α , IL-6, sIL-6R, cytokeratin-18 fragments in plasma were assessed. In steatosis, the levels of *MMP2* gene mRNA in PBL and MMP-2 in plasma are lower than in the control, and the expression of the *NLRP3* gene in PBL is increased relative to other groups. In NASH-WA, the level of MMP-9 is higher than in the control, LS, and NASH-MA, which can be associated with the activation of inflammation during the transformation of LS into NASH. The plasma level of MMP-9 over 389.50 pg/ml is diagnostically significant for the detection of NASH-WA among steatosis patients (*AUC ROC* = 0.818, 95% CI = 0.689–0.948, $p < 0.001$). In NAFLD, the level of MMP-9 can be associated not only with inflammation, but also with apoptosis. *ADAM17* probably plays a certain role in this regard. In advanced NASH, hepatocyte apoptosis is increased, the level of caspase 3 activity in PBL is increased, the level of MMP-9 in the blood is reduced to the level of the control and LS. In NASH-HA, the level of mRNA of the *ADAM17* gene in PBL is increased compared to the control, NASH-WA and NASH-MA. Thus, MMP-2 and MMP-9 are involved in the pathogenesis of NAFLD already at early stages and their level in the blood can be associated with the presence and activity of inflammation in the liver parenchyma.

Keywords: matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, non-alcoholic fatty liver disease, liver steatosis, non-alcoholic steatohepatitis, inflammation, fibrosis, apoptosis, *NLRP3*, *ADAM17*