

ЕКСПРЕСИЯ НА ЧЕРНОДРОБНИТЕ HMGB1 НИВА ПРИ ФРУКТОЗО-ИНДУЦИРАН МАСТЕН ЧЕРЕН ДРОБ

Камелия Братоева¹, Елеонора Димитрова², Николай Цонев², Явор Кашлов², Елена Панайотова², Георги Стоянов³, Мария Раданова⁴, Иван Донев²

¹Катедра по физиология и патофизиология, МУ-Варна

²Катедра по пропедевтика на вътрешни болести, МУ-Варна

³Катедра по обща и клинична патология, МУ-Варна

⁴Катедра по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, МУ-Варна

EXPRESSION OF HEPATIC HMGB1 LEVELS IN FRUCTOSE-INDUCED FATTY LIVER

Kameliya Bratoeva¹, Eleonora Dimitrova², Nikolay Conev², Javor Kashlov², Elena Panajotova², George Stoyanov³, Mariya Radanova⁴, Ivan Donev²

¹Department of Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Department of Propedeutics of Internal Diseases, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

³Department of General and Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

⁴Department of Biochemistry, Molecular Medicine and Nutrigenomics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Проучването на процесите, водещи до хепатоцелуларна клетъчна смърт, е важно за клиничната практика за оценка на тежестта на чернодробното увреждане, както и прилагането на ефективни интервенции за предотвратяването ѝ. Наблюденията показват, че и двата процеса - апоптоза и некроза, се активират в относителна степен на определени етапи от прогресията на неалкохолната мастна чернодробна болест - от чернодробна стеатоза, стеатохепатит и цирроза. В момента най-обещаващият неинвазивен специфичен метод за установяване на некротична клетъчна смърт е нехистоновият ДНК-свързващ протеин с висока подвижност група B1 (HMGB1). Целта на настоящото изследване бе да се проучат нивата на експресията на HMGB1 и връзката им с чернодробните увреждания и активността на апоптоза в черния дроб на плъхове с фруктозо-индуциран мастен черен дроб. Използвахме мъжки плъхове Wistar, разделени на две групи (n = 7): контролна (на стандартна храна) и експериментална, коя-

ABSTRACT

The study of the processes leading to hepatocellular cell death is important for clinical practice to assess the severity of hepatic impairment as well as for the application of effective interventions to prevent it. Observations show that both cell death processes - apoptosis and necrosis are activated at certain stages of the progression of non-alcoholic fatty liver disease from hepatic steatosis, steatohepatitis and cirrhosis. Currently, the most promising non-invasive specific method for detecting necrotic cell death is non-histone DNA-binding protein with high mobility Group B1 (HMGB1). The aim of this study was to investigate the levels of HMGB1 expression and their relationship to hepatic injury and apoptosis activity in rat liver with fructose-induced metabolic syndrome. The results showed data for metabolic syndrome, microvascular steatosis, statistically reduced levels of HMGB1, an increased ratio of Bax/Bcl2 apoptotic proteins in fructose fed rats.

Keywords: HMGB1, fatty liver, apoptosis, fructose

то приемаше разтвор с високо съдържание на фруктоза (ФРУ) (35% фруктозен царевичен сироп за 16 седмици). Метаболитните нарушения и увреждането на черния дроб са изследвани чрез хистохимични (НсЕ), имунохистохимични, имунологични биохимични тестове. Резултатите показва данни за метаболитен синдром, дребнокапчеста стеатоза, статистически намалени нива на HMGb1, увеличено съотношение на апоптотичните протеини Вах/Bcl2 при плъховете на фруктозна диета.

Ключови думи: HMGb1, мастен черен дроб, апоптоза, фруктоза

ВЪВЕДЕНИЕ

НМЧБ (неалкохолна мастна чернодробна болест) обхваща широк спектър от болестни състояния, свързани с прекомерно натрупване на мазнини в черния дроб, вариращи от неалкохолен мастен черен дроб (стеатоза) до неалкохолен стеатохепатит и цироза. Хепатостеатозата е ранен и обратим етап в развитието на НМЧБ, която се счита за чернодробна проява на метаболитния синдром (3,25). Неудобството от използването на чернодробна биопсия и липсата на неинвазивни маркери за диагностика на отделните хистологични форми на НМЧБ затруднява отидиференцирането на пациентите с обикновена стеатоза от тези с неалкохолен стеатохепатит, т.е. преди заболяването да е придобило необратим характер и прогресира до цироза (11). Освен това според клиничните проучвания степента на активност на НМЧБ, доказана с биопсия, не корелира с традиционните ехографски средства за доказване на чернодробна стеатоза или неалкохолен стеатохепатит и това налага търсенето на неинвазивни маркери (12).

Данни от литературата показват, че хепатоцелуларната клетъчна смърт следва един от двата най-добре изследвани модела: некроза или апоптоза (16). Изучаването на тези два режима на клетъчна смърт е от значение за провежданата терапия, но все още съществуват противоречия относно това, кой режим на клетъчна смърт преобладава при различните форми на чернодробно заболяване (13). Наблюденията показват, че и двата процеса - апоптоза и некроза, се активират в относителна степен на определени етапи от прогресията на НМЧБ (4). Основни характеристики на метаболитния синдром като затлъс-

тяване и инсулинова резистентност, които, повишавайки продукцията на провъзпалителни цитокини, цитотоксични свободни мастни киселини и реактивни свободни радикали в чернодробните клетки, предизвикват митохондриална дисфункция (9). Счита се, че общият механизъм, който свързва двата вида клетъчна смърт - апоптоза и некроза, в стеатозния черен дроб е именно митохондриалната дисфункция с последващи възпаление и чернодробна фиброза (10).

Неинвазивното характеризирание на клетъчната смърт обаче е свързано с редица ограничения. Като маркер за некротична клетъчна смърт се използват серумните АЛАТ, АСАТ, ГГТП и др., макар че според някои проучвания нивата на трансaminaзите АСАТ и АЛАТ са в 78% нормални при пациенти с НМЧБ (Angulo et al., 2002). Освен това целият хистологичен спектър на НМЧБ може да се наблюдава при пациенти с нормални нива на АЛАТ, докато серумните нива на ГГТП са често повишени при пациенти с напреднала цироза. Друг маркер за некротична клетъчна смърт е екстрацелуларната лактат дехидрогеназа, но при някои изследвания се установява наличието на този ензим и при активиране на апоптоза (31).

В момента един от проучваните неинвазивни специфични методи за установяване на некротична клетъчна смърт е изследването на нехистоновия ДНК-свързващ протеин с висока подвижност група B1 (HMGb1). Нормално HMGb1 е слабо прикрепен към хроматина и клетките, подложени на некроза и възпаление, водят до освобождаването му и експорт навън от ядрото с последваща секреция в междуклетъчното прос-

транство, където има ролята и на провъзпалителен цитокин (28).

Сложността от неинвазивното оценяване на преобладаващия начин на клетъчна смърт по време на специфично увреждане на черния дроб при експериментални *in vivo* модели или при хора с НМЧБ се определя от факта, че в много случаи има значителни сблъсъци и припокриване между различните пътища на клетъчна смърт.

Целта на нашето изследване бе да се проучат нивата на експресията на HMGB1 и връзката им със степента на чернодробните увреждания и активността на апоптоза в черния дроб при плъхове с фруктозо-индуциран мастен черен дроб.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментален модел

Използвани са бели плъхове линия Wistar от мъжки пол и средно телесно тегло 130-150 гр. Плъховете бяха разделени в две групи: контролна (К), подложена на стандартна диета, и експериментална (ФРУ), при която плъховете приемаха високофруктозен царевичен сироп (35% разтвор за пиене) в продължение на 16 седмици. Животните и от двете групи приемаха стандартна храна (по рецепта на производител) и вода на воля през цялото денонощие. В края на експеримента след предварителна наркоза (Thiopental 15 mg/kg i.p) беше взета кръв за изследване, направена лапаротомия и отделен черният дроб за измерване на тегло, хистологични изследвания и изготвяне на хомогенати. Експериментът се провежда въз основа на разрешително за използване на животни в опити с рег. номер №82 от 06.02.2013 г., изд. от регистъра на БАБХ при спазване на изискванията.

2. Аналитични методи

2.1. *Хистохимични изследвания.* Чернодробната хистология беше определена чрез светлинна микроскопия. Използвани са тъканни срезчета с размери 2/2/05 см. Обработването на материала включва фиксиране във формалин (10%, рН=7), дехидратация с алкохоли и включване в парафин. Морфологичните критерии за оценка на стеатозата е по следната скала: лека (< 10% от хепатоцитите са с мастна дегенерация), умерена (10 до 35% от хепатоцитите са с мастна дегенерация) и тежка (>30% от хепатоцитите са с дегенеративни промени) (20).

2.2. *Имунологично определяне на HMGB1* в чернодробен хомогенат. Нивата на HMGB1 са определени с имуноблот (Western blot) при спазване

протокола на производителя (Abkam, Cambridge, UK).

2.3. *Имунохистохимично определяне на чернодробните нива на Вах и BCL-2.* За определяне на експресията на апоптотичните протеини бяха използвани съответни заешки поликлонални антитела IgG и rabbit LSAB на Santa Cruz (USA). Имунохистохимичната реакция е визуализирана с fleks система (DAKO, USA). Цялата процедура е извършена по протокол на фирмата производител. Интензивността на имунната реакция се определя чрез индекс на наситеност в 50 клетки от всеки материал. Средната интензивност на имунната реакция се определя, като броят на клетките се умножи по съответния коефициент, определен от количеството на отложен имуноген преципитат в отделните клетки (2): коефициенти: 0 - липсва преципитат; 1 - слаба по интензивност реакция; 2 - умерена по интензивност имунна реакция; 3 - интензивна имунна реакция.

2.4. *Биохимични изследвания.* Маркерите на метаболитни нарушения - глюкоза, общ холестерол, ТГ, HDL, както и маркерите на чернодробна функция - АСАТ и АЛАТ, бяха измерени в серум при спазване на стандартна процедура с автоматичен анализатор OLIMPUS; AU 640.

3. Статистическа обработка на резултатите.

Статистическата и графична обработка на данните е направена чрез статистическа програма Graph Pad Prism 5.0. Беше използван T- test за сравняване на средните величини в двете групи. Всички резултати са представени като \pm SEM със статистически значими разлики, при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Ускорената клетъчна смърт и нарушена регенерация на чернодробните клетки са основни характеристики на повечето чернодробни заболявания, вкл. и НМЧБ. Въпреки че черният дроб се отличава с много добра регенераторна способност, хроничното излагане на хепатотоксини като алкохол, натрупването на липиди, реактивни свободни радикали и провъзпалителни цитокини водят до прогресивна загуба на хепатоцити, с последваща фиброза на органа, чернодробна недостатъчност и смърт.

Настоящите резултати показват, че ВФД води до затлъстяване, дислипидемия, хипергликемия и хепатомегалия (Табл. 1). Наблюдаваните нарушения съответстват на основните диагностични и клинични критерии, свързващи метаболитния

синдром с НМЧБ, които се потвърждават и от предишни наши изследвания (6,8,14). ВФД индуцира метаболитни разстройства при хора и експериментални животни, при които висцералното затлъстяване и инсулиновата резистентност са водещи причини за натрупването на триглицериди в черния дроб и развитието на чернодробна стеатоза (3,5). Според някои автори натрупването на мазнини в чернодробните клетки предизвиква увреждания, които включват стеатоза с различна степен на лезии - апоптоза и възпаление или некроза с характерните балонна дегенерация и фиброза (7,17,27,29). Механизмите са тясно свързани с нарушения липиден метаболит-

групата на ВФД (високофруктозна диета) в сравнение с контролата (Фиг. 1). Изследвайки маркерите и на двата типа клетъчна смърт, установихме, че съотношението на про/анти апоптотични Вах/Bcl-2 беше значително повишено в групата на ВФД спрямо контролата, което говори за активиране на апоптоза (Фиг. 2А, 2Б и 2В). Обратно, нивата на НМGB1 протеина в черния дроб показа значително по-ниска експресия в експерименталната спрямо контролната група (Фиг. 3).

Семейството Bcl-2 протеини, състоящо се от проапоптотични и антиапоптотични членове, са важни медиатори на апоптотичните процеси и като такива определят оцеляването или смъртта

Таблица 1. Показатели на метаболитни и чернодробни функции

Групи	К	ФРУ
Телесно тегло (%)	77.57 ± 7.27	129.4 ± 11.78**
Тегло на черен дроб (%)	3.21 ± 0.14	3.97 ± 0.07 **
Серумна глюкоза (mmol/L)	8.14 ± 0.31	10.72 ± 0.56 **
Общ холестерол (mmol/L)	1.43 ± 0.06	1.82 ± 0.11*
Серумен HDL (mmol/L)	0.93 ± 0.04	0.85 ± 0.05
Серумни ТГ (mmol/L)	1.076 ± 0.07	1.704 ± 0.22*
АСАТ (IU/L)	130.3 ± 10.5	128.1 ± 7.9
АЛАТ (IU/L)	70.7 ± 4.9	57.4 ± 5.7

Легенда: Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение, (N=7). К - контролна група; ФРУ - група, хранена с фруктоза. ТГ - триглицериди; HDL - високоплътен холестерол; АСАТ - аспартат-аминотрансфераза; АЛАТ - аланин-аминотрансфераза.

*p<0.05; **p<0.005

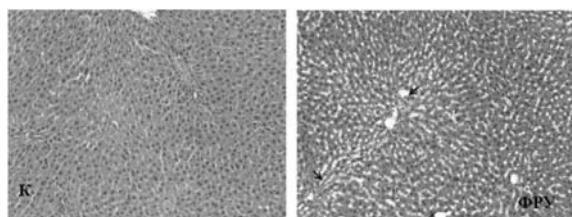
зъм, оксидативен стрес и хроничното възпаление в мастния черен дроб (1,30).

Нашите данни показват наличие на дребнокапчестта стеатоза при липса на възпалителни лезии и промени във функционалните показатели на чернодробно увреждане (АСАТ, АЛАТ) в

на клетките. Инициаторите на клетъчна смърт водят до потискане активността на антиапоптотичния протеин Bcl-2 (удължава клетъчното оцеляване, като блокира апоптозата), а увеличават активността на проапоптотичния Вах протеин (18). Това води до увеличено съотношение на Вах / Bcl2 протеините, транслокация на Вах протеина от цитозола към външната митохондриална мембрана, митохондриална дисфункция и освобождаване на цитохром P450, който активира апоптотични пътища на загиване на клетките (15).

Повишената хепатоцитна апоптоза обикновено присъства при хора и експериментални животни с неалкохолна стеатохепатит, но според някои изследвания отсъства в тези с мастен черен дроб (23). В нашето изследване активирането на апоптотичните процеси в групата с мастен черен дроб при липса на възпаление и некроза се потвърждава и от установените ниски чернодробни нива на експресия на НМGB1.

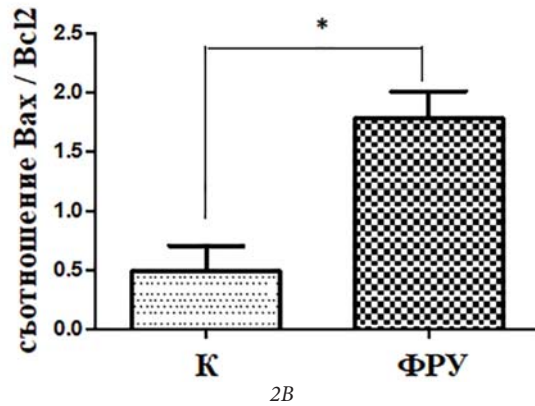
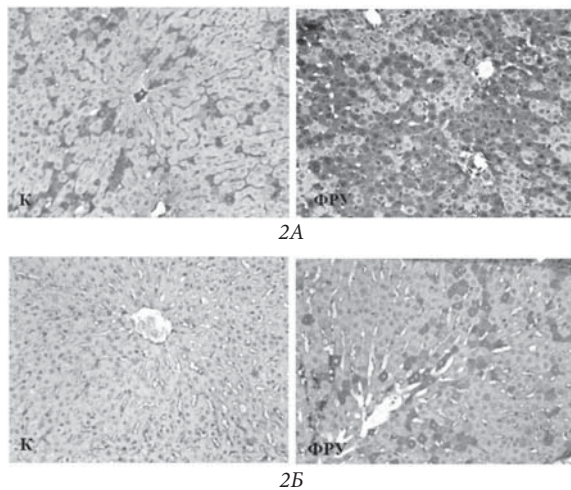
Ролята на некрозата в хепатоцелуларната клетъчна смърт е по-добре проучена при модели и



Фиг. 1. Морфологични промени в черен дроб.

Оцветяване с хематоксилин / еозин (x 100)

За разлика от контролите в групата на ВФД (високофруктозна диета) се откриват около централната вена множество малки оптически празни цитоплазматични вакуоли с данни за дребнокапчестта мастна дегенерация, която обхваща повече от 10% от хепатоцитите. Хепатоцитите са с леко увеличени размери. Липсват възпалителни клетки в чернодробния паренхим и порталните пространства. К - контролна група; ФРУ - група, хранена с фруктоза



Фиг. 2. Промени в експресията на апоптотичните Вах и BCL-2 протеини в черен дроб

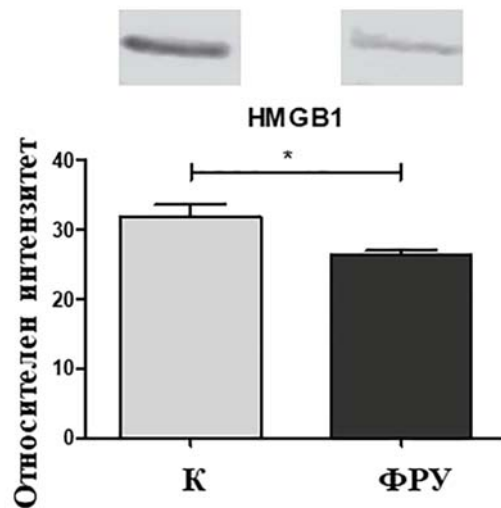
2А - Имунохистохимично изследване на Вах протеина: В контролната група Вах протеинът се експресира предимно в синусоидалните клетки и в по-ниска степен в чернодробните клетки. Преобладават клетките с умерена степен на интензивност на реакцията, локализирана в цитоплазмата - К (контролна група). В групата на ВФД Вах протеинът се експресира предимно в хепатоцитите и по-слабо в синусоидалните клетки. Преобладават клетките с висока степен на интензивност на реакцията - ИИР с 190% повече спрямо контролата, която е локализирана в цитоплазмата на хепатоцитите, разположени основно в перипорталните пространства - ФРУ (група, хранена с фруктоза).

2Б - Имунохистохимично изследване на BCL-2 протеина: В контролната група Bcl-2 протеинът се експресира в синусоидалните клетки. Преобладават клетките с умерена до ниска степен на интензивност на реакцията, локализирана главно в цитоплазмата на синусоидалните клетки - К (контролна група). В групата на ВФД Bcl-2 протеинът се експресира основно в синусоидалните клетки и в по-малка степен в хепатоцитите. Интензивността на имунната реакция варира от слаба (в синусоидални клетки) до умерено изразена в хепатоцитите - ИИР с 25% по-ниска спрямо контролата. Експресията на протеина е основно в цитоплазмата на единични хепатоцити, разпределена равномерно и в трите зони - ФРУ (група, хранена с фруктоза).

2В - Промени в съотношението на експресията на Вах/BCL-2 протеините, измерено чрез индексите за интензивност на имунохистохимичната реакция (\pm SEM; n=7); К (контролна група); ФРУ (група, хранена с фруктоза); * $p < 0.05$

пациенти с остри и тежки хепатити, индуцирани от алкохол, вируси, лекарства и др. HMGB1 е член на подсемейство на HMG протеините, които са специфични транскрипционни регулатори на генна експресия. При нормална клетъчна хомеостаза HMGB1 е секретирани в определени количества и локализиран в ядрото, където е слабо свързан с ядрения хроматин и в секреторните лизозоми. HMGB1 изпълнява функциите на алармин при инфекциозни и неинфекциозни възпалителни състояния (рак, травма и исхемия / реперфузионно увреждане), като допълнително се секретира от активирани имунни клетки (21). HMGB1 се освобождава по време на клетъчни лезии, некроза, активирани макрофаги, включително и регенеративни процеси, водещи до възстановяване на тъканите (24). При определени обстоятелства обаче, както е при активирана апоптоза (HMGB1 не се ацетилира), HMGB1 остава плътно свързан с ядрото и трудно се освобождава в тъканите (26) и вероятно това е една от причините увредени клетки да се унищожават чрез апоптоза, което е в подкрепа на установените в нашето проучване ниски нива.

Ние предполагаме, че по-високите чернодробни нива на HMGB1 в контролната спрямо експерименталната група са изходни, т.е. консти-



Фиг. 3. Промени в експресията на HMGB1 в черен дроб

Резултатите са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение, (N=7). К (контролна група), ФРУ (група, хранена с фруктоза); * $p < 0.05$

тутивно секретирани и слабо свързани с ДНК. По време на изготвянето на хомогенати НМГВ1 протеини се освобождават пасивно в тестваните проби. Тъй като в експерименталната група открийме активиране на апоптоза, вероятно и за това нивата на НМГВ1 са по-ниски от тези на контролната група (НМГВ1 остава здраво свързан с ядрения хроматин).

ИЗВОДИ

Нашето изследване показва, че въпреки липсата на промени във функционалните показатели на чернодробно увреждане (АСАТ, АЛАТ) и възпалителни лезии, в етапа на развитие на мастна дегенерация в черния дроб на животните с фруктозо-индуциран мастен черен дроб апоптозата е преобладаващият тип клетъчна смърт. НМГВ1 протеин е по-добре проучен при пациенти и модели с тежки остри чернодробни увреждания, в които се проявява като обещаващ маркер. Значението му за неинвазивно разпознаване на хистологични форми на НМЧБ остава спорен. Необходими са бъдещи проучвания при групи пациенти с обикновена стеатоза и такива с по-агресивните форми на НМЧБ за оценка на полезността му като неинвазивен маркер на клетъчна смърт. Една от причините за тази тенденция е, че механизмите на увреждане, както и преходът на различните форми в НМЧБ все още не са добре установени. Поради това търсенето на потенциални нови биомаркери, базирано на съвременните познания за патофизиологията на НМЧБ при пациенти с метаболитен синдром, е уместно да се дискутира.

ЛИТЕРАТУРА

1. Братоева К, Донев И, Цанева М, Бекярова Г. Оксидативен стрес и механизъм на хепатоцитно оцеляване при фруктозо-индуцирана чернодробна стеатоза. Наука и младост - сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2013 г.;1: 199-203.
2. Цанева М. Морфофункционално състояние на ендокринните клетки на стомаха при някои форми гастрити (*Helicobacter pylori* – асоцииран гастрит, реактивен гастрит при дуоденагастрален рефлукс и остър експериментален гастрит с ацетилсалицилова киселина). Дисертация, 1999; 199 стр.
3. Abdelmalek M. F., Diehl A. M. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin

- resistance. *Med. Clin. North Am.* 2007; 91:1125–1149.
4. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002, 18;346(16):1221-31.
5. Botezelli JD, Mora RF, Dalia RA, Moura LP, Cambri LT, Ghezzi AC et al. Exercise counteracts fatty liver disease in rats fed on fructose-rich diet. *Lipids Health Dis.* 2010;14;9:116.
6. Bratoeva K, G Bekyarova, Y Kiselova, D Ivanova. Effect of Bulgarian herb extracts of polyphenols on metabolic disorders-induced by high fructose diet. *Trakia Journal of Sciences*, 2010; 8(2): 56-60.
7. Bratoeva K, Bekyarova G. Effect of extract of selected Bulgarian herbs (HA-1) on high fructose diet- induced hepatic injury in rats. *Balkan Medical Union*,2011; 46 (4), 107-111.
8. Bratoeva K, M Radanova, Merdzhanova A, Donev I. Protective Role of S-Adenosylmethionine Against Fructose-Induced Oxidative Damage in Obesity. *Journal of Mind and Medical Sciences* 2017; 4 (2): 163-171.
9. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* 2004; 114(2):147-52.
10. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004; 40(6):1387-95.
11. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94(9):2467-74.
12. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010 ;16(42):5286-96.
13. Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(1):27-41.
14. Delarue J, Normand S, Pachiardi C, Beylot M, Lamisse F, Riou JP. The contribution of naturally labelled ¹³C fructose to glucose appearance in humans. *Diabetologia.* 1993; 36(4):338-45.

15. Ehrmann J Jr, Galuszková D, Ehrmann J, Krc I, Jezdinská V et al. Apoptosis-related proteins, BCL-2, BAX, FAS, FAS-L and PCNA in liver biopsies of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Pathol Oncol Res.* 2000; 6(2):130-5.
16. Ferreira DM, Castro RE, Machado MV, Evangelista T, Silvestre A, Costa A et al. Apoptosis and insulin resistance in liver and peripheral tissues of morbidly obese patients is associated with different stages of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia.* 2011; 54(7):1788-98.
17. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, Kittleson S, Savard C, Roth CL. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav.* 2009; 98(5):618-24.
18. Guicciardi ME and Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut.* 2005; 54(7): 1024–1033.
19. Hotchkiss R, Strasser A, Jonathan E, McDunn. *Cell Death.* N Engl J Med 2009; 361:1570-1583
20. Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology.* 2006 ;49(5):450-65.
21. Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, and Tsung A. HMGB1: Endogenous Danger Signaling. *Mol Med.* 2008; 14(7-8): 476–484.
22. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med.* 2003; 9:37-45.
23. Obika M, Noguchi H. Diagnosis and evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Diabetes Res.* 2012; 145754.
24. Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol.* 2004; 164 : 441-9.
25. Samuel VT, Liu ZX, Qu X , Elder BD, Bilz S, Befroy B et al. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 32345–32353.
26. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002; 418(6894):191-5.
27. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(5):1322-34.
28. Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, Rauvala H, Herman G, Tracey KJ et al. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2005; 33(3):564-73.
29. Tevar A, Clarke C, Wang J, Rudich SM, Woodle S, Lentsch A et al. Clinical review of nonalcoholic steatohepatitis in liver surgery and transplantation. *J Am Coll Surg.* 2010; 210(4):515-26.
30. Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology.* 2006; 131(3):934-45.
31. Torres DM, Harrison SA. Diagnosis and therapy of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2008 May;134(6):1682-98.

Адрес за кореспонденция:

Гл.ас. д-р Камелия Братоева, д.м.
Катедра по физиология и патофизиология
Медицински университет – Варна
ул. Марин Дринов 55
e-mail: kamelia.bratoeva@tu-varna.bg