

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2023.15.4.06

УДК 616.36–092–073

Поступила 4.05.2023 г.



Д.П. Крылов, лаборант научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹; студент Института биологии и биомедицины²;

С.А. Родимова, младший научный сотрудник научной лаборатории регенеративной медицины и научной лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

М.М. Карабут, к.б.н., научный сотрудник научной лаборатории геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

Д.С. Кузнецова, к.б.н., зав. научной лабораторией молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹; зав. НИЛ молекулярно-генетических исследований Института клинической медицины²

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603022

Патологии печени по-прежнему остаются одними из лидирующих причин смертности населения во всем мире. Несмотря на их широкое распространение, возможности диагностики, прогноза и терапии неалкогольной и алкогольной болезней печени до сих пор ограничены и требуют разработки новых методов и подходов. В лабораторных исследованиях для воссоздания патологических состояний печени используют различные модели, включающие клеточные культуры, сфероиды, органоиды, микрофлюидные системы, тканевые эксплантаты.

Рассмотрены наиболее часто используемые *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* модели для изучения неалкогольной жировой и алкогольной болезней печени, токсического повреждения печени и фиброза, описаны их достоинства, ограничения, а также перспективы применения. Большой упор сделан на механизмы развития патологических состояний в каждой модели, а также оценку возможности воссоздания различных ключевых аспектов патогенеза для всех указанных патологий.

В настоящее время нет единого мнения по поводу выбора наиболее адекватной модели для изучения патологии печени. Эффективная модель для исследования определяется конкретной целью и задачами эксперимента.

Ключевые слова: экспериментальные модели; патология печени; *in vivo*; *in vitro*; *ex vivo*.

Как цитировать: Krylov D.P., Rodimova S.A., Karabut M.M., Kuznetsova D.S. Experimental models for studying structural and functional state of the pathological liver (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(4): 65, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.4.06>

Для контактов: Кузнецова Дарья Сергеевна, e-mail: daria.s.kuznetsova@gmail.com

Experimental Models for Studying Structural and Functional State of the Pathological Liver (Review)

D.P. Krylov, Laboratory Assistant, Scientific Laboratory of Molecular Biotechnologies, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹; Student, Institute of Biology and Biomedicine²;

S.A. Rodimova, Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Scientific Laboratory of Molecular Biotechnologies, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

M.M. Karabut, PhD, Researcher, Laboratory of Genomics of Adaptive Antitumor Immunity, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

D.S. Kuznetsova, PhD, Head of Laboratory of Molecular Biotechnologies, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹; Head of the Research Laboratory for Molecular Genetic Researches, Institute of Clinical Medicine²

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603022, Russia

Liver pathologies remain one of the leading causes of mortality worldwide. Despite a high prevalence of liver diseases, the possibilities of diagnosing, prognosing, and treating non-alcoholic and alcoholic liver diseases still have a number of limitations and require the development of new methods and approaches. In laboratory studies, various models are used to reconstitute the pathological conditions of the liver, including cell cultures, spheroids, organoids, microfluidic systems, tissue slices.

We reviewed the most commonly used *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo* models for studying non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease, toxic liver injury, and fibrosis, described their advantages, limitations, and prospects for use. Great emphasis was placed on the mechanisms of development of pathological conditions in each model, as well as the assessment of the possibility of reconstructing various key aspects of pathogenesis for all these pathologies.

There is currently no consensus on the choice of the most adequate model for studying liver pathology. The choice of a certain effective research model is determined by the specific purpose and objectives of the experiment.

Key words: experimental models; liver pathology; *in vivo*; *in vitro*; *ex vivo*.

Введение

Патологии печени по-прежнему остаются одними из лидирующих причин смертности населения во всем мире. Такие заболевания, как неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и ее прогрессирующая форма — неалкогольный стеатогепатит, острое токсическое повреждение и алкогольная болезнь печени (АБП), являются социально-значимыми [1]. НАЖБП характеризуется аномальным накоплением триглицеридов (ТГ) в гепатоцитах и считается наиболее распространенным типом хронического заболевания печени [2]. Не менее часто встречаются состояния, ассоциированные с злоупотреблением алкоголем. Согласно «Отчету о глобальном положении дел с алкоголем и здоровьем» (2018), опубликованному Всемирной организацией здравоохранения, от злоупотребления алкоголем ежегодно умирает 3 млн человек во всем мире [3]. Кроме того, и НАЖБП, и АБП часто сопровождаются внепеченочными осложнениями, включающими сердечно-сосудистые заболевания

и злокачественные новообразования [4]. Несмотря на широкое распространение заболеваний печени, возможности диагностики, прогноза и терапии НАЖБП и АБП до сих пор ограничены и требуют разработки новых методов и подходов [5].

В лабораторных исследованиях для воссоздания патологических состояний печени используют различные модели, выбор которых основывается на конкретных целях и задачах эксперимента, в частности *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Каждая модель имеет свои достоинства и недостатки, которые необходимо учитывать при проведении научного эксперимента [6].

Модели *in vivo* предполагают работы с экспериментальными животными. При этом спектр используемых для моделирования печеночной патологии животных варьирует от рыб (*Danio rerio*) до приматов. Однако в большинстве биомедицинских исследований в качестве модельных животных используют представителей отряда *Rodentia* (грызуны) (рис. 1) [7]. *In vivo* модели служат «золотым стандартом» лабораторных исследований и являются предпочтительным вариан-

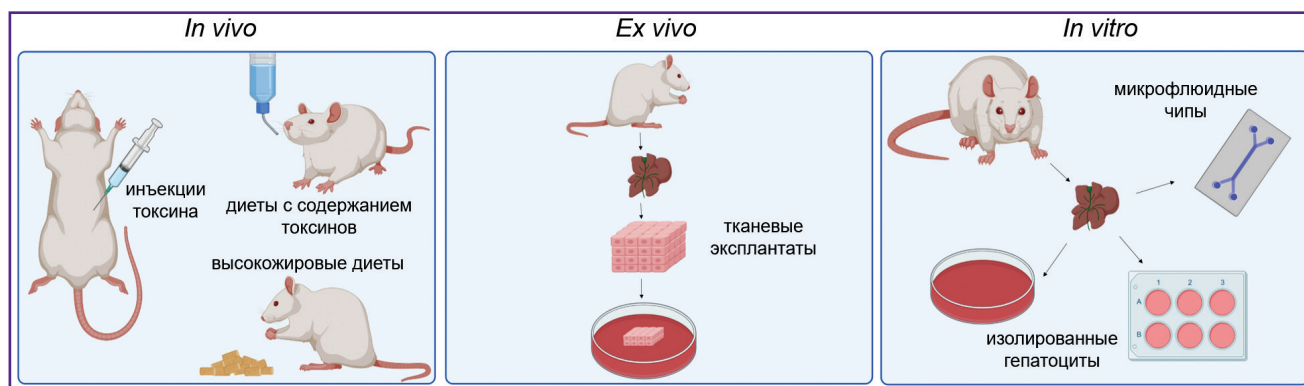


Рис. 1. Модели патологий печени

том для воссоздания комплексных патогенетических или патофизиологических процессов [8]. Однако они не подходят для исследований, при которых важно исключить индивидуальный ответ организма, или для серий экспериментов с набором крупных массивов данных, так как такие исследования требуют использования большого количества животных и сопряжены с высокой стоимостью и трудозатратами [9].

Развитие клеточной и молекулярной биологии позволило внедрить в практику *in vitro* модели, в частности клеточные линии, сфероиды, органоиды, «органы на чипе» [10]. В качестве моделей *in vitro* используют первичные или изолированные гепатоциты. Эксперименты на моделях *in vitro* удешевили исследования, ускорили их воспроизводимость; они стали менее трудоемкими по сравнению с *in vivo* исследованиями. Более того, использование культур клеток позволило обойти проблемы этического характера, что, несомненно, является большим преимуществом этих моделей по сравнению с животными [11]. Однако первичные и изолированные гепатоциты фенотипически нестабильны и не имеют межклеточных взаимодействий, которые есть в нативном органе [12]. Перспективным вариантом применения *in vitro* модели считается микрофлюидная технология, которая позволяет использовать более сложные модели и имитировать нативные условия жизнедеятельности клеток и тканей. Технология также позволяет проводить тестирование действия различных токсических и лекарственных агентов на клетки печени [13].

Промежуточной моделью между *in vitro* и *in vivo* является *ex vivo* живая ткань, перенесенная из организма в искусственную внешнюю среду. Такая модель представляет собой срезы ткани или тканевые эксплантаты, которые сохраняют нативную архитектуру и гетерогенность ткани. При этом в эксплантатах поддерживаются основные межклеточные взаимодействия, сохраняются активные метаболические пути, что позволяет прицельно изучить процессы, протекающие на органном уровне [14]. Однако период поддержания жизнеспособности тканевых эксплантатов, как правило, не превышает трех суток, что делает невозмож-

ным проведение долгосрочных исследований [15]. Кроме того, на данный момент не существует единого протокола для получения тканевых эксплантатов и их дальнейшего культивирования [16], что может сделать результаты невозможными.

Таким образом, в настоящее время нет единого мнения по поводу выбора наиболее адекватной модели для изучения патологии печени — каждая имеет свои преимущества и недостатки. В данном обзоре мы рассматриваем наиболее часто применяемые модели и описываем их достоинства, ограничения, а также дальнейшие перспективы использования.

Модели *in vivo*

Алкогольная болезнь печени

Животная модель АБП позволяет детально исследовать механизмы инициации и прогрессирования заболевания. Такие модели используют при изучении потенциальных терапевтических мишеней для лечения АБП [17].

A. Bertola с соавт. [18] моделировали токсическое повреждение печени у мышей с помощью жидкой этанолсодержащей диеты Либера—ДеКарли в течение 10 дней с последующим введением однократной дозы этанола, что приводило к выраженной нейтрофилии и гранулоцитарной инфильтрации, а также к обширному повреждению и жировой дистрофии ткани печени. При анализе биохимических показателей крови наблюдалось значительное повышение уровней аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы. Благодаря простому и воспроизводимому протоколу эта модель в настоящее время широко используется для изучения ранних стадий АБП и алкогольного гепатита. В дальнейшем В. Gao и соавт. [19] модифицировали исходную модель для изучения хронического течения АБП. Они моделировали алкогольное повреждение в течение 12 нед с развитием стеатогепатита и умеренного фиброза. В работе [20] описан протокол, сочетающий высокое потребление этанола и перевод животного на рацион с высоким содержанием жиров. С помощью данного протокола развивается тяжелый

стеатогепатит с нейтрофильной инфильтрацией и слабовыраженным фиброзом. E. Khanova с соавт. [21] разработали протокол внутрижелудочного введения высоких доз этанола мышам в сочетании с диетой с высоким содержанием жирных кислот и холестерина. В данной модели также происходит выраженная инфильтрация ткани печени нейтрофилами и формирование фиброза.

С использованием моделей *in vivo* идентифицированы многие механизмы, лежащие в основе патогенеза АБП, алкоголь-ассоциированного стеатогепатита, а также установлена патогенетическая роль микроРНК, аутофагии и внеклеточных везикул [19]. Выявлены ключевые аспекты патологического процесса, вызванного прямым воздействием этанола и его метаболитов на печень и другие органы. Этанол метаболизируется в печени ферментом алкогольдегидрогеназой (АДГ), что приводит к образованию токсичного метаболита ацетальдегида и восстановленных эквивалентов НАДН (никотинамидадениндинуклеотида). Ацетальдегид вызывает окислительный стресс в печени и обуславливает нарушение функции митохондрий [22], а повышенная выработка НАДН нарушает окислительно-восстановительный баланс и процессы глюконеогенеза [23]. Окисление этанола также происходит при участии цитохром Р450-зависимой микросомальной этанолокисляющей системы и каталазы (рис. 2). Хроническое воздействие этанола снижает метаболическую активность гепатоцитов, что сопровождается нарушением детоксикационной функции печени. На клеточном уровне наблюдается дисфункция митохондрий и эндоплазматического ретикулума, снижается активность протеасом, нарушается везикулярный транспорт гепатоцитов [24]. Кумулятивный эффект этанол-индуцированного стресса органелл в ге-

патоцитах повышает чувствительность клеток к гибели по апоптотическому или некротическому пути [25].

J. Petrasek с соавт. [26] показали, что активация врожденного звена иммунитета является одним из ключевых аспектов патогенеза АБП, в частности при алкогольном гепатите. Выработка провоспалительных цитокинов способствует быстрому прогрессированию заболевания. Прямое воздействие этанола и его метаболитов на гепатоциты приводит к стрессу эндоплазматического ретикулума, индуцирует IRF3, который помимо активации интерферона 1-го типа запускает митохондриальный путь апоптоза. Это ведет к высвобождению так называемых молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs), в частности мочевой кислоты, аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), HMGB1.

H. Tsukamoto с соавт. [27] разработали крысиную модель АБП, включающую непосредственное введение этанола и питательных веществ через канюлю, имплантированную в желудок животных. Использование данной модели позволяет достигнуть высокой концентрации этанола в крови за счет строгого контроля дозы потребляемого животными этанола. При индукции АБП с использованием данной модели наблюдаются выраженный стеатоз, формирование мегамитохондрий, центральный долевого и перипортальный фиброз, центральный некроз и смешанный воспалительный инфильтрат. Такие патологические изменения характерны также для течения АБП у человека [28].

Все *in vivo* модели имеют ряд недостатков, так как полностью не отражают особенностей и осложнений, наблюдаемых при алкогольном повреждении у человека. В связи с быстрым метаболизмом этанола у грызунов обычно не развиваются тяжелые формы АБП

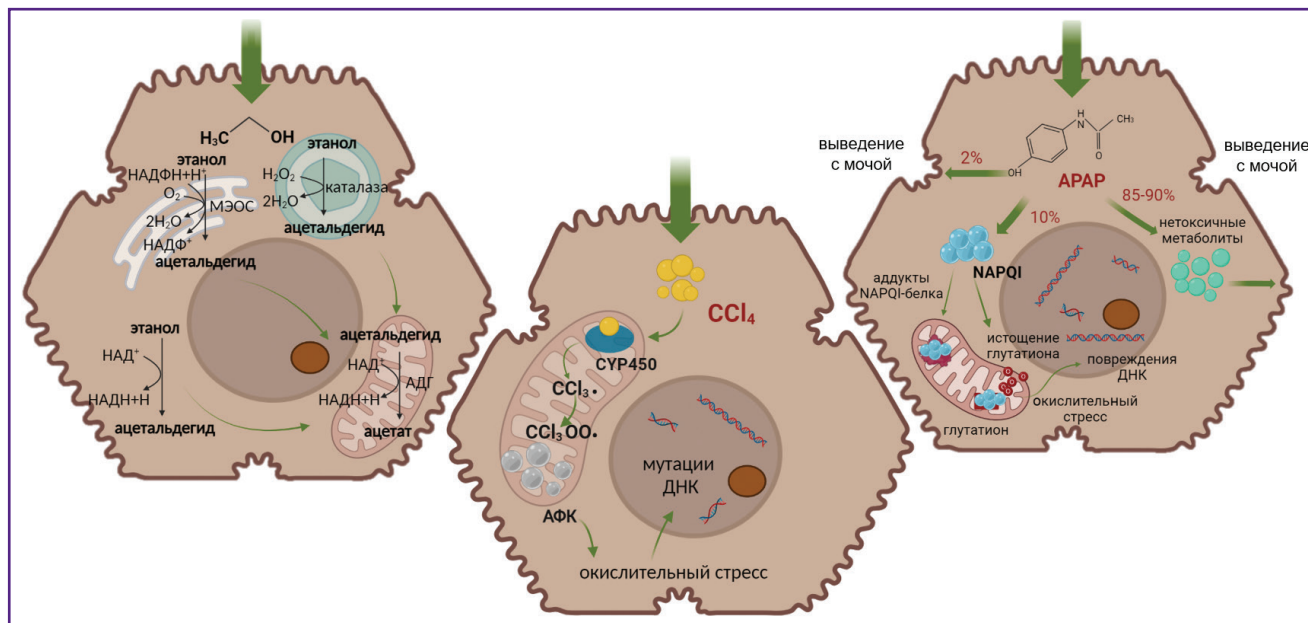


Рис. 2. Механизмы токсического действия различных агентов

даже при его длительном воздействии [29]. Данный аспект связан с низкой восприимчивостью модельных животных к этанолу, что не позволяет достоверно воспроизводить патогенез АБП человека. Для решения этой проблемы некоторые авторы используют комбинации этанола и других токсинов (липополисахарид, четыреххлористый углерод (CCl_4), конканавалин А) с целью индукции тяжелой формы повреждения печени [30]. Однако даже комбинированные модели лишь частично воспроизводят воздействие этанола, поскольку большинство наблюдаемых изменений вызваны вторичными эффектами других токсических агентов, а не первичными эффектами гепатотоксичности этанола [31].

Фиброз печени

Индукция с использованием тетрахлорметана. Тетрахлорметан (CCl_4) наиболее часто применяется для моделирования фиброза и цирроза печени у грызунов. Токсичность CCl_4 имеет комплексный характер, эффекты в зависимости от дозы и продолжительности воздействия различны. При низких дозах преобладают транзиторные эффекты, связанные с нарушением транспорта Ca^{2+} , липидного гомеостаза, высвобождением цитокинов и запуском апоптоза с последующей регенерацией. Высокие дозы или длительное воздействие приводят к обширным повреждениям печени, включающим жировую дистрофию, фиброз, цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Кроме того, при высоких дозах, когда уровень гепатоцеллюлярного некроза превышает регенеративную способность печени, развивается печеночная недостаточность с высоким риском летального исхода. Предельно высокие дозы CCl_4 приводят к неспецифической токсичности с угнетением центральной нервной и дыхательной систем [32].

Метаболизм тетрахлорметана происходит с вовлечением цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) — гем-содержащего фермента, участвующего в детоксикации ксенобиотиков. Гемовое железо в CYP2E1 позволяет осуществлять прямое восстановление (например, диоксида углерода) с образованием активных форм кислорода (АФК) и превращением ксенобиотиков в токсичные продукты [33]. Активность фермента приводит к образованию трихлорметильного и трихлорметилпероксильного радикалов, которые участвуют в свободнорадикальных реакциях и зависимых от них процессах перекисного окисления липидов [34]. Трихлорметильный радикал вступает в реакцию с различными макромолекулами клетки [35], а также способствует отщеплению водорода от ненасыщенных жирных кислот с образованием токсичного хлороформа. Накопление активных радикалов инициирует острую фазу воспаления с нарушением структуры мембраносвязанных белков, торможением белоксинтезирующей активности, выходом цитоплазматических ферментов в кровь и

деструкцией нуклеотидов. Такая цепочка событий в конечном итоге ведет к активации клеток Купфера и обширному центрлобулярному некрозу гепатоцитов [36] (см. рис. 2). Кроме того, выработка цитокинов иммунными клетками способствует активации звездчатых клеток печени и образованию миофибробластов, которые запускают избыточное отложение коллагена в межклеточном пространстве (процесс фиброобразования) [37].

Моделирование токсического повреждения печени тетрахлорметаном проводят как на крысах, так и на мышах. Восприимчивость животных к CCl_4 -индуцированному фиброзу печени зависит от их линии. Например, у мышей линий C57BL/6 и DBA/2J развитие фиброза протекает быстрее, чем у мышей линии BALB/c [38]. Согласно протоколу С. Constandinou и соавт. [39], который является «золотым стандартом» для лабораторных исследований, CCl_4 вводят внутрибрюшинно 2–3 раза в неделю в течение 4–6 нед в диапазоне концентраций 300–1000 мкл/кг. В качестве альтернативы CCl_4 можно вводить перорально, подкожно или ингаляционно два раза в неделю в течение 10 нед [40]. Стоит отметить, что вопрос о пероральном введении CCl_4 остается дискуссионным. Так, ряд авторов утверждают, что данный подход демонстрирует высокую скорость индукции фиброза при приемлемых показателях выживаемости животных [41], в то время как другие не рекомендуют пероральное введение, если в этом нет крайней необходимости, из-за высоких показателей ранней смертности [42].

Индукция с использованием парацетамола. Парацетамол (ацетаминофен, N-ацетил-пара-аминофенол) является нестероидным противовоспалительным препаратом [43] и применяется в качестве обезболивающего и жаропонижающего средства [44]. В терапевтических дозах парацетамол безопасен, не оказывает повреждающего действия на желудочно-кишечный тракт и не имеет неблагоприятных кардиоренальных эффектов. Однако в случае разового употребления парацетамола в дозе, превышающей 150 мг/кг массы тела, у человека диагностируется гепатотоксическое и нефротоксическое острое повреждение печени [45]. Передозировка приводит к некрозу печени и печеночной недостаточности, развитию окислительного стресса, который сопровождается перекисным окислением липидов, окислением ДНК и белков и снижением антиоксидантной защиты [46]. В процессе метаболизма парацетамола с участием цитохрома P450 образуется токсичный метаболит N-ацетил-п-бензохинонимин (N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI), который конъюгируется с восстановленным глутатионом даже при низких концентрациях препарата [47]. В случае поступления высокой дозы препарата или в условиях истощения глутатиона NAPQI дополнительно вступает в реакцию с клеточными белками, вызывая окислительный стресс, перекисное окисление липидов, генерацию свободных радикалов и повреждение митохондрий, что влечет за собой

некротическую или апоптотическую смерть гепатоцитов [48] (см. рис. 2).

In vivo моделирование токсического воздействия парацетамола получило широкое распространение в лабораторной практике с использованием разных животных: кроликов, мышей, крыс [49]. В настоящее время активно исследуется роль окислительного стресса, АФК и азота в парацетамол-ассоциированной гепатотоксичности.

Показано, что парацетамол в дозе 200 мг/кг массы тела значительно повышает концентрацию пероксида водорода в печени у мышей линии C57BL/6J [44], а однократное введение препарата в дозе 3 г/кг массы тела индуцирует образование гидроперекисей в печени [50]. Н.М. Агафа с соавт. [51] обнаружили, что парацетамол в дозе 1 г/кг массы тела усиливает выработку оксида азота в печени мышей. При индуцированном повреждении печени путем однократного введения парацетамола в концентрации 1, 2 или 3 г/кг массы тела уровень оксида азота в крови и в клетках печени был значительно повышен [52].

Практически во всех случаях парацетамол инициирует перекисное окисление липидов: в сыворотке крови кроликов, которым вводили препарат (1 г/кг массы тела) в течение 9 дней, наблюдалось повышение концентрации малонового диальдегида (МДА — вторичный продукт перекисного окисления липидов) [53]. У крыс воздействие различных доз парацетамола также сопровождалось повышением уровня МДА в сыворотке крови и в ткани печени [54]. Причем такое повышение промежуточных продуктов пероксидации коррелировало с уровнем ингибирования антиоксидантной системы — снижением уровня глутатиона и ферментов, участвующих в его метаболизме, а также уровня супероксиддисмутазы и каталазы [55]. Аналогичным образом перекисное окисление липидов в печени или сыворотке крови животных наблюдается при длительном введении более низких доз парацетамола (100 и 250 мг/кг массы тела) [56]. Влияние метаболитов парацетамола на клеточные липиды на данный момент недостаточно изучено и заслуживает более пристального внимания.

Активные формы кислорода также воздействуют на ДНК с формированием аддуктов, одним из которых является 8-гидроксидезоксигуанозин (8-OHdG) [57]. Y. Wang с соавт. [58] продемонстрировали, что длительное воздействие парацетамола в дозе 400 мг/кг массы тела значительно повышает концентрацию 8-OHdG в сыворотке крови мышей, однако при однократном введении высокой дозы препарата окислительного повреждения ДНК практически не наблюдается. Еще одной мишенью для окислительного повреждения являются белки, которые трансформируются в карбонилированную форму [59]. Z. Abdul Namid с соавт. [45] выявили, что воздействие парацетамола на крыс в дозе 750 мг/кг массы тела в течение 7 дней увеличивает образование карбонильных белков в плазме крови и в почках, вызывая помимо

повреждения ткани печени осложнение в виде нефротоксичности.

Исследования, касающиеся активации иммунной системы при воздействии парацетамола в высокой дозе, показали гиперпродукцию провоспалительных цитокинов. При воздействии препаратом в дозировке 2 г/кг массы тела у крыс повышаются уровень сывороточного TNF- α , экспрессия гена *tnf- α* в печени [60], уровни IL-1 β в сыворотке крови и печени и уровни IL-6 в плазме [61]. Аналогично меньшие дозы парацетамола значительно повышают уровень провоспалительных цитокинов у крыс и мышей. После воздействия парацетамола на крыс (1 г/кг массы тела) или мышей (0,3, 0,9 или 1,5 г/кг массы тела) растут уровни TNF- α , IL-1 β и IFN- γ в сыворотке крови и печени у всех животных [62], а также наблюдается гиперэкспрессия генов *tnf- α* и *il-1 β* в печени мышей [63].

Стеатоз

В настоящее время для индукции НАЖБП и ее прогрессирующей формы, неалкогольного стеатогепатита, экспериментальным животным вводят диеты с повышенным содержанием жиров в рационе [64]. Восприимчивость грызунов к моделированию жировой болезни печени пищевыми ингредиентами зависит от их линии. Так, мыши C57BL/6 более восприимчивы к развитию НАЖБП путем корректировки диеты по сравнению с линией BALB/c [65]. Приматы, в частности макаки-резусы, были также предложены для изучения НАЖБП в связи с их генетической близостью с человеком. Однако по этическим соображениям и из-за высокой стоимости исследований такие модели используются редко. Наиболее часто индукцию стеатоза печени проводят на крысах линии Wistar или Sprague Dawley [66].

Классическая диета для индукции неалкогольного стеатогепатита включает в себя высокое содержание сахара (40%) и жира (10%) с дефицитом незаменимых аминокислот — метионина и холина [67]. Холин является предшественником фосфатидилхолина, который необходим для выработки липопротеинов очень низкой плотности [68] — комплекса, обеспечивающего транспорт холестерина и ТГ из печени в жировую ткань и мышцы [69]. Метионин необходим для синтеза глутатиона, одного из главных компонентов антиоксидантной защиты клетки [70]. После перевода на высокожировую диету в ткани печени мышей происходят окислительный стресс и повышение уровня провоспалительных цитокинов и адипокинов, что в конечном итоге ведет к повреждению ткани печени [71]. Определенную роль в патогенезе стеатоза играют клетки Купфера: они первыми реагируют на повреждение гепатоцитов, увеличивая выработку TNF- α и способствуя рекрутированию моноцитов [72]. Кроме того, клетки Купфера способствуют усилению некоторых провоспалительных путей и синтеза медиаторов, включающих NF- κ B, ICAM-1, ци-

клооксигеназу 2, MCP-1 и IL-6. Этот каскад событий приводит к активации звездчатых клеток, которые формируют рубцовую ткань на месте повреждения, запуская фиброгенез [73]. У мышей, посаженных на данную диету, стеатогепатит развивался через 8 нед, а через 16 нед уже сформировался фиброз, поражающий портальную и мостовидную области доли печени [71].

Диета с дефицитом метионина и холина проста в реализации и позволяет индуцировать тяжелую форму стеатогепатита в отличие от других диетических моделей. Однако данная модель имеет серьезные ограничения. Несмотря на широкое распространение, она не позволяет воспроизвести основные патологические особенности НАЖБП у человека, включающие ожирение и выраженную периферическую резистентность к инсулину [74]. Кроме того, мыши, находящиеся на диете, постепенно теряют массу при кормлении — до 40% за 8 нед [75]. Стоит также учитывать, что чувствительность различных линий мышей к данной диете значительно различается [76].

Другой вариант диеты включает дефицит холина и добавление этионина. Этионин является S-аналогом метионина, имеющим этильную группировку вместо метильной в исходной аминокислоте, и способствует развитию стеатогепатита за относительно короткий промежуток времени [77]. Этионин препятствует метилированию макромолекул и обладает канцерогенными свойствами. Конкурируя с метионином на этапе трансляции, этионин снижает специфическую активность белка. Высокая токсичность этионина объясняется потребностью в метионине для осуществления ряда биосинтетических и регуляторных процессов. На органном уровне его поступление вызывает жировое перерождение печени («мускатная печень»), острый панкреатит, способствует развитию гепатоцеллюлярной карциномы. На молекулярном уровне этионин ингибирует метилирование тРНК [78]. К сожалению, такая диетическая модель связана с потерей массы тела животными и высоким уровнем смертности, достигающим 60% после 4 мес кормления [79]. Чтобы снизить летальность и сохранить индукцию стеатоза, в некоторых исследованиях использование этой диеты чередуется со стандартной диетой (7% простых углеводов, 3% липидов, 50% полисахаридов, 15% белков) [80].

Еще один вариант диеты заключается в дефиците только холина с заменой белков эквивалентной смесью L-аминокислот [81]. При такой диете ингибируется окисление жирных кислот в гепатоцитах и увеличивается синтез липидов, что приводит к выраженному окислительному стрессу, развитию воспаления и фиброгенезу печени. Однако стоит отметить, что характерные для патологии гистологические изменения проявляются на более поздних сроках по сравнению с диетой с дефицитом холина и метионина: стеатоз — от 3 нед, умеренный фиброз — 21 нед [82]. Мыши на такой диете теряли значительно меньше массы, чем

при диетах, описанных выше, но по-прежнему не проявляли резистентности к инсулину [83]. Это можно регулировать составом рациона (например, процентного содержания жира) и продолжительностью кормления. H.D. Pedersen с соавт. [84] использовали модель дефицита холина и показали развитие стеатогепатита уже через 8 нед у минипиггов. В связи с относительно высокой продолжительностью жизни по сравнению с грызунами у минипиггов развиваются ожирение и метаболический синдром, сопоставимые с человеческими, что позволяет проводить долгосрочные исследования.

Самой часто используемой моделью для индукции стеатоза является перевод животных на диету с высоким содержанием жиров (45–75% общего количества калорий), которая устраняет ограничения диеты с недостатком метионина и холина, поскольку животные набирают массу и развивают периферическую резистентность к инсулину. Высокожировая диета у экспериментальных животных имитирует условия перекармливания и гиподинамии, которые вызывают метаболический синдром у человека [85]. В результате применения данной диеты увеличивается отток незатерифицированных жирных кислот из жировой ткани и высвобождаются провоспалительные цитокины и адипокины, что может привести к эктопическому отложению жира в печени, мышцах и сердце [86]. Кроме того, высокожировая диета инициирует окислительный стресс и перекисное окисление липидов и усиливает работу ферментов β -окисления жирных кислот.

Данная модель помимо стеатоза также достаточно точно имитирует симптоматику неалкогольного стеатогепатита у человека, но стоит отметить, что для развития стеатогепатита со слабовыраженным фиброзом у мышей требуется до 50 нед [87]. Кроме того, характер течения индуцируемой патологии варьирует у мышей разных линий [88]. Так, линия C57BL/6 более чувствительна к высокожировой диете, чем BALB/c. Низкая чувствительность к диете у BALB/c обусловлена слабым поглощением липидов печенью и устойчивостью к развитию воспаления [89]. У мышей также имеют место гендерные различия в характере развития метаболического синдрома, ассоциированного с ожирением [90]. Таким образом, несмотря на широкое применение, высокожировая диета не является лучшим вариантом для изучения НАЖБП в связи с различиями, связанными с составом рациона (источник и природа жирных кислот), линиями мышей, полом и продолжительностью кормления.

Альтернативная диета с высоким содержанием холестерина была предложена для крыс. Такая диета вызывает неалкогольный стеатогепатит с признаками фиброза в течение 9 нед [91].

Существенным недостатком всех перечисленных моделей является лишь частичная имитация патологических признаков, характерных для человека, что ограничивает межвидовую экстраполяцию результатов [64]. Главным недостатком описанных выше

диет является отсутствие развития ожирения и резистентности к инсулину, поэтому за последние несколько лет были разработаны другие режимы питания, позволяющие воссоздать все основные аспекты патогенеза НАЖБП.

Недавно была предложена западная диета, или диета «быстрого питания», которая представляет собой современную модель, распространенную в промышленно развитых странах и характеризующуюся высоким потреблением жиров и углеводов [92]. По аналогии с рационом человека для индуцирования НАЖБП у мышей была разработана диетическая модель, основанная на сочетании жиров и фруктозы с добавлением в некоторых случаях холестерина [93]. Через 6 мес западной диеты у мышей C57BL/6 развиваются ожирение, резистентность к инсулину, а также выраженный стеатогепатит [94]. У них также наблюдается увеличение экспрессии генов, ассоциированных с развитием фиброза, воспаления, дисфункции эндоплазматического ретикулума и запуском апоптоза. Все указанные патологические изменения отмечены также при неалкогольном стеатогепатите человека. Кроме того, Н. Tsuchiya с соавт. [95] показали, что западная диета в течение 16 нед приводит к перегрузке печени железом, что часто встречается у людей с НАЖБП. Западная диета является перспективным направлением для моделирования жировой болезни печени, но в настоящий момент необходима разработка стандартизированного протокола для повышения воспроизводимости результатов.

Модели *in vitro*

Модели *in vitro* более всего подходят для экспресс-тестирования различных препаратов или токсических агентов. К данному типу моделей относятся клеточные линии (в частности, HepG2), первичные клетки, сфероиды, органоиды, при этом культивирование можно проводить в культуральных флаконах или с использованием микрофлюидных технологий. Преимущества клеточных линий заключаются в их более высокой репликативной способности по сравнению с первичными культурами клеток, выделенными непосредственно из ткани, и возможностью использования в течение длительного периода времени. Главным недостатком клеточных линий для моделирования патологий является их иммортализованный фенотип с измененным метаболическим статусом клеток [96]. Первичные культуры гепатоцитов в свою очередь сохраняют нативные морфологические и функциональные характеристики клеток [97], но проявляют фенотипическую нестабильность и низкую жизнеспособность [98]. Использование микрофлюидных технологий устраняет недостатки моделей *in vitro* — технология позволяет поддерживать условия, аналогичные условиям *in vivo*, и контролировать поступление питательных и исследуемых веществ (лекарства, токсины) для изучения клеточного ответа [13].

Алкогольная болезнь печени

Для моделирования АБП разработано несколько моделей *in vitro* [99]. В 2D-культурах гепатоциты быстро теряют свой фенотип, что ограничивает их применение. Наиболее актуальными представляются 3D-модели, которые поддерживают межклеточные контакты, нативный фенотип и функции клеток в течение длительного периода времени [100]. Так, J. Deng и соавт. [101] использовали микрофлюидную технологию для изучения патофизиологических процессов в непаренхиматозных клетках при воздействии этанола. Авторы применяли эндотелиальные клетки EAhy926, звездчатые клетки LX-2 и HepG2. HepG2 подвергали воздействию этанола (0–150 мМ), что значительно усиливало выработку АФК в гепатоцитах при больших концентрациях токсина (>100 мМ) и долговременной (>24 ч) стимуляции. Кроме того, снижалась экспрессия VE-кадгерина, что указывает на повреждение плотных контактов в эндотелиоцитах. А экспрессия фактора роста эндотелия сосудов и α -гладкомышечного актина (α -SMA), маркеров ранней стадии заболевания, увеличивалась в клетках LX-2, что указывает на активацию звездчатых клеток. В. Corrado и соавт. [102] разработали микрофлюидный биочип с тремя параллельными каналами, по форме имитирующими печеночную синусоиду. В работе исследовали воздействие этанола на линию клеток HepG2. В нормальных условиях количество жизнеспособных клеток HepG2 составляло 65%, а выработка альбумина достигала 60 нг. При воздействии 100 мМ этанола наблюдалось снижение жизнеспособности культуры до 55%, выработка альбумина уменьшалась в 3 раза. При воздействии 300 мМ этанола жизнеспособность клеток составляла уже 30%, а уровень альбумина снижался до 1 нг. К. J. Jang с соавт. [103] моделировали АБП путем непрерывной перфузии первичной культуры клеток человека разными дозами этанола (17,4–34,0 мМ) в пределах клинически значимых концентраций алкоголя в крови. Исследователи показали значительное повышение уровня холестерина после 48 ч воздействия этанола. Более того, наблюдалось накопление гликогена, но высвобождения глюкозы не происходило.

Фиброз печени

Индукция с использованием тетрахлолорметана. Для моделирования токсического повреждения тетрахлолорметаном *in vitro* чаще всего применяется первичная культура гепатоцитов, поскольку в изолированных гепатоцитах происходит значительное нарушение метаболической функции. Показано также, что в изолированных гепатоцитах нарушаются белковый обмен, синтез белков и образование цАМФ, при этом реакции на гормональные стимулы являются слабыми или отсутствуют. Концентрации CCl_4 от 0,1 до 0,2 мМ в культуральной среде вызывают цитологические из-

менения, характерные для модели интоксикации *in vivo* [104]. Происходит генерация 4-гидроксиноненаля (токсичный альдегид, продукт перекисидации липидов), который ингибирует действие аденилатциклазы, цитохрома P450 и АТФазы в клетках, при этом дистрофических изменений клеток не наблюдается [32]. Развивается также воспаление с высвобождением TNF- α и IL-1 β , что приводит к активации апоптоза клеток [105]. В работе D. Perrissoud и соавт. [106] в культуре первичных гепатоцитов после 5 мин воздействия CCl₄ выявлены быстрые морфологические изменения: дегрануляция, сдувание шероховатого эндоплазматического ретикулума и «пузырение» (блеббинг) плазматической мембраны. Y. Cai и соавт. [107] подвергали воздействию CCl₄ (0,1–9,0 мМ) первичную культуру гепатоцитов крыс в течение 20 ч и оценивали жизнеспособность клеток, которая снижалась дозозависимо. Наблюдали также высвобождение лактатдегидрогеназы: ее уровень рос с увеличением дозы токсина. Воздействие CCl₄ способствовало истощению глутатиона, которое усиливалось с увеличением дозы и времени культивирования. Уровень трипептида значительно снижался после инкубации клеток с 1 мМ CCl₄ в течение 8, 12, 16 и 24 ч, при этом уровни МДА и цитохрома C, напротив, повышались. Такие результаты подтверждают ключевую роль окислительного стресса гепатоцитов в индукции гепатотоксичности CCl₄, приводящей к их апоптозу.

Индукция с использованием парацетамола. Воздействие парацетамола способствует выработке АФК и снижает производство активных форм азота в моделях *in vitro*. I. Jamil с соавт. [108] с использованием культуры U937 (клеточная линия промоноцитарного ряда, выделенная из гистиоцитарной лимфомы) установили, что парацетамол в концентрации 0,01–100,0 мМ увеличивает содержание H₂O₂ и других АФК, и это приводит к окислительному стрессу, тогда как генерация NO значительно снижается. Другое исследование показало, что после воздействия препарата на клетки гепатомы мыши Нера 1-6 в концентрации 50, 100 и 300 мМ усиливается выработка АФК митохондриями [109]. Повышенное количество АФК способствует активации перекисного окисления липидов: после воздействия на гепатоциты крыс парацетамола в концентрации 100 мМ в течение 1 ч повышалось количество малонового диальдегида — промежуточного продукта перекисидации липидов. Наблюдались изменения и в содержании антиоксидантов [110]. В работе A. Vader с соавт. [111] на культуру эмбриональных клеток печени крыс воздействовали парацетамолом в концентрации 6 и 15 мМ в течение 24 ч. Препарат значительно снижал общий уровень глутатиона, но усиливал теломеразную активность. В другом исследовании на первичной культуре гепатоцитов крыс уровень глутатиона также был значительно снижен после воздействия различных концентраций парацетамола (7 нМ, 12 и 100 мМ) в течение 24, 22 и 1 ч соответственно [112].

R.H. Pierce с соавт. [113] инкубировали трансгенную культуру гепатоцитов мыши с разными концентрациями парацетамола (1–10 мМ) и выявили запуск апоптоза и некроза, опосредованных образованием NAPQI-реактивного метаболита через 48–72 ч культивирования.

G.A. Clarke с соавт. [114] оценивали гепатотоксичность парацетамола с использованием микрофлюидных технологий. Было показано значительное снижение концентрации альбумина на 6-й день культивирования при воздействии 10 мМ препарата по сравнению с контрольной группой (0 мМ) и группой с концентрацией 1 мМ. A.J. Foster с соавт. [115] также использовали микрофлюидную технологию с первичной культурой гепатоцитов человека, которую инкубировали с парацетамолом (0–10 мМ); продемонстрирована дозозависимая цитотоксичность препарата. Содержание альбумина в клетках печени значительно снижалось уже через 24 ч воздействия. Дозозависимое снижение секреции альбумина гепатоцитами и жизнеспособности клеток происходило до 10-го дня культивирования. S. Rodimova с соавт. [116] исследовали изменение метаболического статуса первичной культуры гепатоцитов мышей при воздействии парацетамола с использованием микрофлюидной технологии и флуоресцентной времяразрешенной микроскопии (FLIM). Обнаружено снижение общей метаболической активности гепатоцитов и развитие их митохондриальной дисфункции, что привело к уменьшению содержания АТФ в клетках.

J.M. Prot с соавт. [117] исследовали транскриптомные и протеомно-метаболомные профили в микрофлюидной модели HepG2/C3a при воздействии 1 мМ парацетамола. Токсическое действие препарата нарушало липидный обмен и гомеостаз кальция в клетках через путь активации VDR/RXR. Кроме того, наблюдались повреждение ДНК, остановка клеточного цикла, апоптотическая и некротическая гибель клеток, реорганизация цитоскелета. Исследователи продемонстрировали изменение мембранного потенциала митохондрий и развитие митохондриальной дисфункции. Авторы смогли воспроизвести пути истощения глутатиона через образование NAPQI.

Специфическое увеличение потребления цистеина, гистидина и метионина в клетках, культивированных на микрофлюидных чипах, коррелирует с интенсивностью глутатионового пути, который участвует в детоксикации парацетамола. При метаболическом стрессе также высвобождается 2-гидроксипутират как побочный продукт расщепления цистатионина до цистеина перед его превращением в глутатион [118]. Кроме того, предшественник глутатиона S-аденозилметионин образуется путем конъюгации метионина с АТФ и цистеином, участвующим в синтезе глутатиона. Повышенный уровень этих молекул в среде при культивировании первичных гепатоцитов с парацетамолом является маркером токсического повреждения клеток. Однако исследователи не обнаружили накопления

таурина, креатина или офтальмовой кислоты в среде при культивировании первичных гепатоцитов на микрофлюидных чипах, которые выявляются в анализе мочи и в экстрактах печени при исследовании *in vivo* [119]. Повышение уровня 3-гидроксибутирата в среде с парацетамолом при культивировании первичных гепатоцитов на микрофлюидных чипах указывает на усиление метаболизма липидов по пути деградации кетонов. При активации глутатионового пути в клетках, культивированных в среде с парацетамолом на чипах, происходило усиление экспрессии генов *ggt7*, *g6pd*, *gpx2*, *gpx3*, *gstm2/4*, *gstt2* и продукции белков G6PD и TXNRD1 по сравнению с контролем. Более того, в клетках наблюдалась интенсивная активация цикла трикарбоновых кислот в связи с усиленным потреблением глутамината, глюкозы и фруктозы и выработкой лактата [120].

Стеатоз

Для моделирования НАЖБП широко применяют 2D-культуры гепатоцитов, патологические процессы в которых индуцируются добавлением свободных жирных кислот (в основном олеиновой и пальмитиновой (2:1)) в культуральную среду [121]. Добавление в среду к гепатоцитам жирных кислот приводит к накоплению ТГ в цитоплазме, что вызывает стресс эндоплазматического ретикулума и гибель клеток [122]. Жировую дистрофию клеток печени также можно индуцировать с помощью бисфенола А, который увеличивает накопление липидов за счет усиления регуляции SREBP1, или вальпроата, усиливающего поглощение жирных кислот и синтез ТГ [123]. 2D-монокультура гепатоцитов позволяет изучить изменения метаболических путей в этих клетках [124]. Однако основным недостатком таких моделей является отсутствие взаимодействия с непаренхиматозными клетками, которые важны для инициации воспалительных процессов, ассоциированных с патогенезом фиброза при НАЖБП. Сокультивирование гепатоцитов и непаренхиматозных клеток позволяет преодолеть ряд ограничений. Одной из таких моделей является совместное культивирование гепатоцитов со звездчатыми клетками печени. V.J. Barbero-Veserra с соавт. [125] разработали модель сокультур *Huh7* (клеточная линия гепатоцитов человека) и *LX-2* (линия звездчатых клеток человека). Продемонстрировано, что воздействие жирных кислот на сокультуру индуцирует экспрессию α -SMA (маркер активированных фибробластов) в клетках *LX-2* только при одновременном совместном культивировании с *Huh7*. Активация звездчатых клеток не зависела от накопления жирных кислот, но требовала взаимодействия с гепатоцитами.

Совместное культивирование первичных гепатоцитов с клетками Купфера или эндотелиальными клетками служит эффективным инструментом для оценки механизмов, посредством которых жирные кислоты запускают воспалительные процессы в печени [126].

Сокультивирование первичных гепатоцитов, звездчатых клеток печени и клеток Купфера человека при добавлении в среду жирных кислот, глюкозы, инсулина и воспалительных цитокинов для имитации неалкогольного жирового гепатита показало усиленный липогенез *de novo* [127]. В данной модели также наблюдались окислительный стресс, воспаление, активация звездчатых клеток и запуск процесса фиброобразования [128]. Y. Chen и K. Ma [129] культивировали клетки HepG2 с макрофагами THP-1. Макрофаги были посажены на предметные стекла, которые затем помещали в 6-луночные планшеты с культурой HepG2 и добавляли жирные кислоты в концентрации 1 ммоль/л (пальмитиновая и олеиновая кислоты (1:2)). Патогенетические признаки неалкогольной жировой болезни печени были установлены через 24 ч после начала индукции. Основным недостатком такого сокультивирования — сложный подбор оптимальных условий и питательных сред для поддержания различных популяций клеток [130].

Микрофлюидную технологию использовали для создания функциональных конструкций печени на чипе. Микроархитектуру печени имитировали с помощью полимерного каркаса, состоящего из сотен мелких каналов с сохранением динамических свойств ткани [131]. Клетки снабжались питательными веществами и кислородом с последующим выведением метаболитов, что имитировало микроциркуляцию в печени [132]. Культивирование клеток HepG2 со смесью свободных жирных кислот (олеиновая и пальмитиновая (2:1)) на микрофлюидном чипе обеспечивало постепенное накопление липидов в клетках, при этом чип позволял эффективно поддерживать метаболическую активность и жизнеспособность гепатоцитов, снижая возникновение окислительного стресса по сравнению со статическими культурами [133]. T. Kostrzewski и соавт. [134] инкубировали первичную культуру гепатоцитов со свободными жирными кислотами (600 мкМ) и наблюдали постепенное четырехкратное увеличение уровня ТГ и повышение активности цитохромов P450: 2E1 и 7A1 (участвует в метаболизме холестерина), IGF β 1 (маркер метаболических нарушений печени), PDK4 (обеспечивает резистентность печени к инсулину) и FABP1 (белок, связывающий жирные кислоты). Активность CYP3A4 была снижена более чем на 40%, а CYP2C9 — на 30%, что согласуется с результатами исследований с использованием гепатоцитов человека и клинических образцов, полученных от пациентов с НАЖБП. В другом исследовании показано, что накопление липидов также влияло на секрецию адипокинов — белков, связанных с развитием фиброза и повреждения (фибриноген, TIMP-1), и маркеров воспаления (IL-8, MIF) [135].

S.Y. Lee и J.H. Sung [136] создали модель «кишечник–печень на чипе» для изучения взаимодействия этих органов в контексте НАЖБП, где жирные кислоты всасывались через слой кишечника с последующей секрецией хиломикрон, что способствовало

накоплению ТГ в гепатоцитах. M.S. Freag и соавт. [137] перфузировали гепатоциты, клетки Купфера и звездчатые клетки высокой концентрацией свободных жирных кислот через однослойный микрофлюидный канал в течение 10 дней. Воздействие высокой концентрации жирных кислот приводило к значительному накоплению нейтральных липидов внутри звездчатых клеток печени по сравнению с клетками, культивируемыми в физиологических условиях. Более того, повышалась активность лактатдегидрогеназы по сравнению с контролем уже на 2-й день.

В условиях *in vivo* в процессе прогрессирования неалкогольного стеатогепатита покоящиеся звездчатые клетки быстро активируются в миофибробластоподобные клетки, при этом резко увеличивается экспрессия α -SMA, который является одним из показательных маркеров активации звездчатых клеток печени [138]. При моделировании этого процесса с использованием системы на чипе отмечена гиперэкспрессия α -sma в звездчатых клетках с восьмикратным увеличением активированных клеток [139].

Микрофлюидная технология значительно расширяет возможности моделирования НАЖБП в условиях *in vitro*, включая моделирование взаимодействия между печенью и другими органами, что делает ее эффективным инструментом для изучения метаболических изменений, ассоциированных с патологией [97].

Модели *ex vivo*

Выше были рассмотрены модели *in vivo* и *in vitro*, которым отдается предпочтение в подавляющем большинстве исследований. Однако важно отметить, что *in vitro* модели не обеспечивают полной имитации сложного многофакторного патогенеза и прогрессирования заболеваний [140]. Комплексные патологические механизмы в печени трудно моделировать, используя один тип клеток, так как орган — это сложная система, состоящая из разных типов тканей, включающих паренхиматозные и стромальные компоненты. К тому же применение животных моделей в полной мере не способно отразить работу иммунной системы человека, что является существенным недостатком, так как развитие воспаления — один из ключевых аспектов патогенеза заболеваний печени [141]. Ряд указанных ограничений можно преодолеть с применением моделей *ex vivo* печеночных эксплантатов — универсальных моделей, которые позволяют сохранить архитектуру ткани и ее микроокружение, что воссоздает условия, приближенные к нативным. При этом поддерживаются постоянная диффузия газов и доступ к питательным веществам среды. Печеночные эксплантаты — легко воспроизводимая модель, обеспечивающая жизнеспособность гепатоцитов и других клеток печени в течение 3–5 дней; показано сохранение жизнеспособности печеночных слайдов в течение 15 дней. Применение данной модели позволяет проводить одновременный анализ воздействия различных лекарственных или

токсических агентов, а также моделировать патологические процессы, получая образцы от одного животного, что минимизирует вклад индивидуальных различий у животных. Кроме того, сокультивирование печеночных слайсов с аутологичными клетками периферической крови позволяет воссоздать комплексные взаимодействия иммунной системы и ткани печени [142].

Алкогольная болезнь печени

Использование *ex vivo* моделей существенно помогло понять патогенез АБП у человека. L.W. Klassen с соавт. [143] выяснили, что воздействие этанола вызывает повреждение ткани, развитие стеатоза и окислительного стресса. Более того, полная метаболизация этанола происходит через несколько дней после первичного воздействия. Авторы инкубировали печеночные слайсы, полученные от крыс, в среде с этанолом (25 мМ) и в среде с ингибитором метаболизма этанола 4-метилпиразолом (0,5 мМ), и выявили, что добавление этанола к питательной среде с печеночными эксплантатами индуцирует патологические процессы, наблюдаемые в *in vivo* моделях хронического потребления этанола. Так, в печеночных слайсах происходит окисление этанола в гепатоцитах с образованием ацетальдегида, усилением липогенеза и изменением внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса, а также снижением секреции альбумина [144].

E. Palma с соавт. [29] исследовали влияние этанола на морфологию, структуру и функцию митохондрий и показали, что при воздействии этанола в дозе 50–250 мМ в течение 24–72 ч образуются мегамитохондрии, которые также характерны для патогенеза АБП. Появление мегамитохондрий при развитии АБП было выявлено еще в 1970-х годах [145]. В недавних исследованиях J. Altamirano с соавт. [5] установили, что появление мегамитохондрий в клетках печени обуславливает благоприятный исход у пациентов с тяжелым алкогольным гепатитом. В то же время Teli с соавт. [146] в более раннем исследовании интерпретировали появление мегамитохондрий у пациентов с алкоголизмом как плохой прогностический признак и связали их наличие с более высоким риском прогрессирования фиброза/цирроза печени. Таким образом, в настоящий момент роль мегамитохондрий в развитии патологических изменений, обусловленных воздействием этанола, до конца не изучена. Предполагается, что мегамитохондрии учувствуют в защите гепатоцитов от токсического повреждения и являются одним из компонентов компенсаторных процессов при развитии АБП. В работе E. Palma с соавт. [147] с использованием печеночных слайсов исследовали молекулярные каскады, ассоциированные с развитием мегамитохондрий в гепатоцитах, и выявили ключевую роль белков MSP (mitochondria-shaping proteins, белки, формирующие митохондрии). В данной работе проводили культивирование печеночных слайсов, полученных из печени здорового человека,

в течение суток с разными дозами этанола (50, 100 и 250 мМ). Токсические эффекты оценивали путем количественного определения уровня АТФ в клетках. В контрольных эксплантатах печени концентрация АТФ находилась в диапазоне 3–12 нмоль на 1 мг белка и оставалась стабильной в течение пяти дней. При воздействии этанола в трех указанных дозах уровень АТФ снижался по сравнению с контролем [147]. Методом электронной микроскопии были обнаружены признаки повреждения клеток с наличием кариорексиса, выраженной вакуолизацией цитоплазмы и с потерей структурной целостности мембран. Выявлена также прямая корреляция увеличения размера митохондрий клеток печени и дозы этанола. В другом исследовании отмечалась тенденция к гиперактивации Dpr1-каскада, ассоциированного с делением митохондрий в печени у пациентов с алкогольным гепатитом [148]. Значительная гиперактивация данного каскада сопровождается апоптотической гибелью гепатоцитов и тяжелым течением заболевания [149].

Фиброз печени

Индукция с использованием парацетамола.

A. Granitzny с соавт. [150] работали со слайсами печени крыс для изучения токсического воздействия парацетамола. Исследователи добавляли в культуральную среду разные концентрации (2,55–15 мМ) парацетамола и проводили инкубацию эксплантатов в течение 24 ч, далее оценивали содержание АТФ. Постепенное увеличение синтеза АТФ достигало максимума в печеночных эксплантатах при концентрации парацетамола 5,5 мМ. При воздействии более высоких концентраций препарата (10–15 мМ) происходило резкое снижение жизнеспособности клеток в тканевых эксплантатах. Исследователи также оценивали ряд других метаболических маркеров. Глутаматдегидрогеназа имела дозозависимое снижение во всем диапазоне концентраций, в то время как активность аспаратаминотрансферазы варьировала в зависимости от добавленных концентраций препарата. Выработка мочевины и альбумина постепенно увеличивалась и достигала максимума при 5,5 мМ, что коррелирует с увеличением содержания АТФ. При воздействии 10–15 мМ парацетамола в эксплантатах развивался некроз, но сохранялись небольшие жизнеспособные участки ткани.

Молекулярно-генетический анализ с использованием модели эксплантатов печени, проведенный J. Ji с соавт. [151], выявил увеличение экспрессии 13 генов, ассоциированных с TGF- β 1-каскадом, при воздействии парацетамола. TGF- β 1-каскад играет ключевую роль в развитии фиброза печени. В работе J.T. Li с соавт. [152] инкубированы печеночные эксплантаты крыс с парацетамолом в концентрации 500 мкМ в течение 6 ч. Обнаружено, что по сравнению с контрольной группой значительно снижается концентрация глутатиона и лактатдегидрогеназы. Чаще всего печеночные

эксплантаты получают от крыс, однако стоит учитывать, что крысы менее восприимчивы к действию парацетамола по сравнению с мышами даже при воздействии высоких доз [153].

В работе L. Dewyse с соавт. [154] показано, что в печеночных эксплантатах происходит активация звездчатых клеток при воздействии парацетамола, как и в модели *in vivo*, однако полноценного развития фиброза не наблюдается.

Еще одной моделью *ex vivo* является перфузионная, которая была применена в исследованиях T. Schreiter и соавт. [155]: образцы печени человека перфузировали с токсином в течение 30 ч по замкнутому контуру и в определенные временные интервалы отбирали пробы перфузата для анализа газов крови, поиска маркеров повреждения гепатоцитов и оценки синтетической способности печени. Перфузия *ex vivo* имитирует доставку жидкости к органу или ткани через лимфатическую или кровеносную систему. В данной модели поддерживается характерный метаболизм органа, сопоставимый с *in vivo* моделью, путем доставки кислорода в необходимой концентрации и питательных веществ. Авторы также оценивали клиренс индоцианина зеленого (ICG) из перфузата для функциональной оценки печени через 4, 20 и 28 ч перфузии. Были показаны достаточно стабильные параметры клиренса, что указывает на сохранение функции печени и метаболической активности гепатоцитов в течение всего периода перфузии. После перфузии образцов печени с парацетамолом до 30 ч период выведения ICG возрастал в три раза. Кроме того, при воздействии препарата значительно уменьшалось количество потребляемой клетками глюкозы и снижалась выработка лактата по сравнению с контролем. Скорость синтеза альбумина и мочевины была примерно одинаковой в течение всего периода перфузии как при воздействии парацетамола, так и без него. Показано также выраженное повреждение гепатоцитов при воздействии парацетамола, на что указывает увеличение глутаматдегидрогеназы, цитокератина-18, аспартат- и аланинаминотрансферазы, митохондриальной ДНК. Таким образом, перфузионная система печени представляет собой эффективную модель, отражающую вариативность индивидуальной реакции человека на воздействие препарата, и дает более полное представление о механизмах патогенеза парацетамола. Однако невозможность продолжительного поддержания жизнеспособности образцов печени в такой модели не позволяет применять ее для долгосрочного тестирования действия препаратов [156].

Индукция с использованием тетрахлорметана. Van de Bovenkamp с соавт. [157] проводили анализ экспрессии молекулярных маркеров звездчатых клеток печени и обнаружили, что экспрессия α/β -кристаллина, *klf6* и *hsp47* повышается при воздействии CCl_4 . Усиление экспрессии коррелировало с дозой и временем воздействия токсина.

Показано также увеличение экспрессии 19 генов (среди которых *jun*, *litaf*, *mapk6*, *plat*, *serpine1*), вовлеченных в путь TGF- β 1, что указывает на запуск процесса фиброобразования (через 16 ч) при воздействии тетрахлорметана. Выявлено, что TGF- β индуцирует экспрессию гена *serpine1* посредством pSmad2L/C и способствует отложению компонентов внеклеточного матрикса миофибробластами (активированные звездчатые клетки) [158]. Однако следует отметить, что токсин не растворяется в культуральной среде, в связи с чем токсическое повреждение моделируется путем насыщения парами фазы над поверхностью среды, при этом пары токсина свободно диффундируют в среду. Таким образом, точное определение концентрации токсина в среде затруднено.

Стеатоз

Важным аспектом патогенеза НАЖБП в хронической форме является развитие внутрипеченочного воспаления, а также комплексное взаимодействие всех типов клеток печени. В эксплантатах печени сохраняются собственные иммунные клетки и поддерживаются сигнальные пути взаимодействия гепатоцитов, клеток Купфера и звездчатых клеток печени, что позволяет моделировать комплексный патогенез НАЖБП [159]. E. Palma с соавт. [29] добавляли в культуральную среду с печеночными эксплантатами человека свободные жирные кислоты (смесь олеиновой и линолевой кислот; раствор 0,1 мМ), в результате отмечали липидную инфильтрацию клеток печени с запуском липотоксичности, что соответствует признакам, наблюдаемым у пациентов на ранних стадиях патологии.

Источник, от которого получают печеночные срезы, влияет на характер течения стеатоза и на метаболизм липидов. В частности, B. Graulet с соавт. [160] показали, что накопление ТГ в цитозоле гепатоцитов крысы и телят различно при использовании одинаковых доз олеиновой кислоты. В другой работе исследовали способность гепатоцитов в эксплантатах печени крупного рогатого скота, овцы, свиньи, морской свинки, крысы и кролика синтезировать ТГ из жирных кислот, добавляемых в среду. Показано, что интенсивность липогенеза у всех животных значительно различается. Так, в срезах овцы, крупного рогатого скота, свиньи и морской свинки намного менее эффективно индуцировалась жировая дистрофия [161].

Еще одним характерным патологическим изменением при НАЖБП является метаболический синдром, сопровождающийся гиперлипидемией, гиперинсулинемией и гипергликемией [162]. Для воссоздания метаболического синдрома проводили культивирование печеночных эксплантатов мыши в среде с глюкозой, фруктозой, инсулином и пальмитиновой кислотой в супрафизиологических концентрациях. Через 48 ч инкубации жизнеспособность (содержание АТФ) клеток пе-

чени значительно не снижалась. Более того, влияния пальмитиновой кислоты на синтез АТФ также не выявлено, что может объясняться высокой активностью антиоксидантной защиты в образцах или недостаточной концентрацией пальмитата, чтобы инициировать митохондриальную дисфункцию [163]. Молекулярный механизм липотоксичности пальмитата изучен не до конца, но предполагается, что важную роль здесь играет β -окисление жирных кислот и образование свободных радикалов [164]. Данная группа исследователей смогла индуцировать патогенетический фенотип в эксплантатах печени мышей в среде с 36 мМ глюкозы, 5 мМ фруктозы, 240 мкМ пальмитата, 480 мкМ олеата и 100 нМ инсулина, что привело к увеличению ТГ в 2 раза через 48 ч по сравнению с контрольной группой. При этом значительно снижалось внутриклеточное содержание АТФ и, следовательно, жизнеспособность клеток печени. Чтобы исключить снижение жизнеспособности, G.H. Prins с соавт. [165] минимизировали концентрации сахаров и жирных кислот. Разницы в накоплении ТГ не наблюдалось при снижении концентрации глюкозы с 36 до 11 мМ; 1 мМ фруктозы было достаточно для достижения максимального накопления ТГ через 24 и 48 ч. Концентрации пальмитата и олеата также снизились до 120 и 240 мкМ соответственно. После 48 ч инкубации в GFPO-среде уровень ТГ повышался на 67% по сравнению с контролем. Значительное увеличение содержания ацилкарнитинов C14-C18 подтвердило, что пальмитат и олеат поглощались клетками печени. Чтобы провести разграничение эффектов поступления жирных кислот и липогенеза *de novo*, изменяли условия (5 мМ фруктозы и 0 мМ жирных кислот — GF-среда), что способствовало меньшему накоплению ТГ по сравнению с GFPO. При культивировании в среде GF и среде GFPO были повышены уровни транскриптов белков синтеза жирных кислот и поглощения гексоз Elov16, Fasn и Slc2a2, а в среде GF дополнительно повышалась экспрессия ацетил-КоА-карбоксилазы и ацил-КоА-десатуразы. Наблюдались также снижение экспрессии генов ферментов окисления жирных кислот и повышение экспрессии остеопонтина, маркера фиброза печени.

Применение моделей *ex vivo* имеет ряд ограничений, связанных с повреждением или утратой естественной архитектуры ткани при получении эксплантатов. Жизнеспособность модели зависит от качества ткани, используемого протокола и оборудования для поддержания оптимальных условий. Более того, модели *ex vivo* предполагают соотношение «один анализ — один образец», что делает невозможным повторное использование образца с целью мониторинга изменений. Наконец, такие модели не являются предпочтительными, если необходимо проанализировать метаболические изменения непосредственно в гепатоцитах, так как интерпретация результатов осложняется влиянием окружающих непаренхиматозных клеток [166].

Заключение

В данном обзоре мы рассмотрели наиболее часто используемые *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo* модели для изучения неалкогольной жировой и алкогольной болезней печени, токсического повреждения печени и фиброза, описали их достоинства, ограничения, а также перспективы использования. Большой упор был сделан на механизмы развития патологических состояний в каждой модели, а также оценку возможности воссоздания различных ключевых аспектов патогенеза для всех указанных патологий. Несмотря на все преимущества и недостатки, в настоящее время нет единого мнения по поводу выбора наиболее адекватной модели для изучения патологии печени. Этот выбор определяется конкретной целью и задачами эксперимента.

Вклад авторов: Д.П. Крылов — написание текста научной статьи; С.А. Родимова, М.М. Карабут, Д.С. Кузнецова — редактирование научной статьи; Д.С. Кузнецова — курирование научной статьи.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №22-25-00098).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликтов интересов.

Литература/References

1. Maiers J., Malhi H. Endoplasmic reticulum stress in metabolic liver diseases and hepatic fibrosis. *Semin Liver Dis* 2019; 39(2): 235–248, <https://doi.org/10.1055/s-0039-1681032>.
2. Priore P., Cavallo A., Gnoni A., Damiano F., Gnoni G.V., Siculella L. Modulation of hepatic lipid metabolism by olive oil and its phenols in nonalcoholic fatty liver disease. *IUBMB Life* 2015; 67(1): 9–17, <https://doi.org/10.1002/iub.1340>.
3. World Health Organization. *Global status report on alcohol and health 2018*. WHO; 2019.
4. Toshikuni N., Tsutsumi M., Arisawa T. Clinical differences between alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(26): 8393–8406, <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i26.8393>.
5. Altamirano J., Miquel R., Katoonizadeh A., Abrales J.G., Duarte-Rojo A., Louvet A., Augustin S., Mookerjee R.P., Michelena J., Smyrk T.C., Buob D., Leteurtre E., Rincón D., Ruiz P., García-Pagán J.C., Guerrero-Marquez C., Jones P.D., Barritt A.S. IV, Arroyo V., Bruguera M., Bañares R., Ginès P., Caballería J., Roskams T., Nevens F., Jalan R., Mathurin P., Shah V.H., Bataller R. A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2014; 146(5): 1231–1239.e6, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.018>.
6. Gamboa J.M., Leong K.W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65(6): 800–810, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.01.003>.
7. Ramachandran A., Lebofsky M., Baines C.P., Lemasters J.J., Jaeschke H. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury.

Free Radic Res 2011; 45(2): 156–164, <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.520319>.

8. Sjögren E., Abrahamsson B., Augustijns P., Becker D., Bolger M.B., Brewster M., Brouwers J., Flanagan T., Harwood M., Heinen C., Holm R., Juretschke H.P., Kubbinga M., Lindahl A., Lukacova V., Munster U., Neuhoff S., Nguyen M.A., Peer A., Reppas C., Hodjegan A.R., Tannergren C., Weitschies W., Wilson C., Zane P., Lennernäs H., Langguth P. In vivo methods for drug absorption — comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation excipient characterization including food effects. *Eur J Pharm Sci* 2014; 57: 99–151, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.02.010>.

9. Akhtar A. The flaws and human harms of animal experimentation. *Camb Q Healthc Ethics* 2015; 24(4): 407–419, <https://doi.org/10.1017/s0963180115000079>.

10. Lozoya-Agullo I., Araújo F., González-Álvarez I., Merino-Sanjuán M., González-Álvarez M., Bermejo M., Sarmiento B. Usefulness of Caco-2/HT29-MTX and Caco-2/HT29-MTX/Raji B coculture models to predict intestinal and colonic permeability compared to Caco-2 monoculture. *Mol Pharm* 2017; 14(4): 1264–1270, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01165>.

11. Polli J.E. In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J* 2008; 10(2): 289–299, <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9027-6>.

12. Katt M.E., Placone A.L., Wong A.D., Xu Z.S., Searson P.C. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol* 2016; 4: 12, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>.

13. Cong Y., Han X., Wang Y., Chen Z., Lu Y., Liu T., Wu Z., Jin Y., Luo Y., Zhang X. Drug toxicity evaluation based on organ-on-a-chip technology: a review. *Micromachines (Basel)* 2020; 11(4): 381, <https://doi.org/10.3390/mi11040381>.

14. Xu Y., Shrestha N., Préat V., Belouqui A. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2021; 175: 113795, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.005>.

15. Thomson A., Smart K., Somerville M.S., Lauder S.N., Appanna G., Horwood J., Sunder Raj L., Srivastava B., Durai D., Scurr M.J., Keita A.V., Gallimore A.M., Godkin A. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC Gastroenterol* 2019; 19(1): 98, <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1002-4>.

16. Szalowska E., Stoopen G., Rijk J.C., Wang S., Hendriksen P.J., Groot M.J., Ossenkoppele J., Peijnenburg A.A. Effect of oxygen concentration and selected protocol factors on viability and gene expression of mouse liver slices. *Toxicol in Vitro* 2013; 27(5): 1513–1524, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.03.007>.

17. Petrasek J., Bala S., Csak T., Lippai D., Kodys K., Menashy V., Barrieau M., Min S.Y., Kurt-Jones E.A., Szabo G. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest* 2012; 122(10): 3476–3489, <https://doi.org/10.1172/jci60777>.

18. Bertola A., Mathews S., Ki S.H., Wang H., Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013; 8(3): 627–637, <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.032>.

19. Gao B., Xu M.J., Bertola A., Wang H., Zhou Z.,

- Liangpunsakul S. Animal models of alcoholic liver disease: pathogenesis and clinical relevance. *Gen Expr* 2017; 17(3): 173–186, <https://doi.org/10.3727/105221617x695519>.
20. Zhou Z., Xu M.J., Cai Y., Wang W., Jiang J.X., Varga Z.V., Feng D., Pacher P., Kunos G., Torok N.J., Gao B. Neutrophil-hepatic stellate cell interactions promote fibrosis in experimental steatohepatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2018; 5(3): 399–413, <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.01.003>.
21. Khanova E., Wu R., Wang W., Yan R., Chen Y., French S.W., Llorente C., Pan S.Q., Yang Q., Li Y., Lazaro R., Ansong C., Smith R.D., Bataller R., Morgan T., Schnabl B., Tsukamoto H. Pyroptosis by caspase11/4-gasdermin-D pathway in alcoholic hepatitis in mice and patients. *Hepatology* 2018; 67(5): 1737–1753, <https://doi.org/10.1002/hep.29645>.
22. Baraona E., Lieber C.S. Alcohol and lipids. *Recent Dev Alcohol* 1998; 14: 97–134, https://doi.org/10.1007/0-306-47148-5_5.
23. Lieber C.S. Alcohol: its metabolism and interaction with nutrients. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 395–430, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.395>.
24. Kaplowitz N., Than T.A., Shinohara M., Ji C. Endoplasmic reticulum stress and liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27(4): 367–377, <https://doi.org/10.1055/s-2007-991513>.
25. Albano E. Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Mol Aspects Med* 2008; 29(1-2): 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.09.004>.
26. Petrasek J., Iracheta-Velvet A., Csak T., Satishchandran A., Kodys K., Kurt-Jones E.A., Fitzgerald K.A., Szabo G. STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(41): 16544–16549, <https://doi.org/10.1073/pnas.1308331110>.
27. Tsukamoto H., French S.W., Rektelberger R.D., Largman C. Cyclical pattern of blood alcohol levels during continuous intragastric ethanol infusion in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1985; 9(1): 31–37, <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1985.tb05046.x>.
28. French S.W. Intragastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J Biomed Sci* 2001; 8(1): 20–27, <https://doi.org/10.1159/000054009>.
29. Palma E., Doornebal E.J., Chokshi S. Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatol Int* 2019; 13(1): 51–57, <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9913-7>.
30. Affò S., Dominguez M., Lozano J.J., Sancho-Bru P., Rodrigo-Torres D., Morales-Ibanez O., Moreno M., Millán C., Loaeza-del-Castillo A., Altamirano J., García-Pagán J.C., Arroyo V., Ginès P., Caballería J., Schwabe R.F., Bataller R. Transcriptome analysis identifies TNF superfamily receptors as potential therapeutic targets in alcoholic hepatitis. *Gut* 2013; 62(3): 452–460, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301146>.
31. Avila M.A., Dufour J.F., Gerbes A.L., Zoulim F., Bataller R., Burra P., Cortez-Pinto H., Gao B., Gilmore I., Mathurin P., Moreno C., Poznyak V., Schnabl B., Szabo G., Thiele M., Thursz M.R. Recent advances in alcohol-related liver disease (ALD): summary of a Gut round table meeting. *Gut* 2019; 69(4): 764–780, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319720>.
32. Weber L.W.D., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33(2): 105–136, <https://doi.org/10.1080/713611034>.
33. Tanaka E., Terada M., Misawa S. Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* 2000; 25(3): 165–175, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2000.00282.x>.
34. Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189(1–2): 113–127, [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00157-4](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00157-4).
35. Castro J.A. Mechanistic studies and prevention of free radical cell injury. In: *Proceedings of IUPHAR 9th International Congress on Pharmacology*. Paton W., Mitchell J., Turner P. (editors). London; 1984; p. 243–250, https://doi.org/10.1007/978-1-349-86029-6_34.
36. Heindryckx F., Colle I., Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* 2009; 90(4): 367–386, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00656.x>.
37. Iwasako K., Jiang C., Zhang M., Cong M., Moore-Morris T.J., Park T.J., Liu X., Xu J., Wang P., Paik Y.H., Meng F., Asagiri M., Murray L.A., Hofmann A.F., Iida T., Glass C.K., Brenner D.A., Kisseleva T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(32): 3297–3305, <https://doi.org/10.1073/pnas.1400062111>.
38. Walkin L., Herrick S.E., Summers A., Brenchley P.E., Hoff C.M., Korstanje R., Margetts P.J. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6(1): 18, <https://doi.org/10.1186/1755-1536-6-18>.
39. Constandinou C., Henderson N., Iredale J.P. Modeling liver fibrosis in rodents. In: *Fibrosis research. Methods and protocols*. Varga J., Brenner D.A., Phan S.H. (editors). Humana Press; 2005; p. 237–250, <https://doi.org/10.1385/1-59259-940-0:237>.
40. Yanguas S.C., Cogliati B., Willebrords J., Maes M., Colle I., van den Bossche B., de Oliveira C.P.M.S., Andraus W., Alves V.A.F., Leclercq I., Vinken M. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol* 2016; 90(5): 1025–1048, <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1543-4>.
41. Jang J.H., Kang K.J., Kim Y.H., Kang Y.N., Lee I.S. Reevaluation of experimental model of hepatic fibrosis induced by hepatotoxic drugs: an easy, applicable, and reproducible model. *Transplant Proc* 2008; 40(8): 2700–2703, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.07.040>.
42. Scholten D., Trebicka J., Liedtke C., Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab Anim* 2015; 49(1 Suppl): 4–11, <https://doi.org/10.1177/0023677215571192>.
43. Bertolini A., Ferrari A., Ottani A., Guerzoni S., Tacchi R., Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev* 2006; 12(3–4): 250–275, <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x>.
44. Pu S., Ren L., Liu Q., Kuang J., Shen J., Cheng S., Zhang Y., Jiang W., Zhang Z., Jiang C., He J. Loss of 5-lipoxygenase activity protects mice against paracetamol-induced liver toxicity. *Br J Pharmacol* 2016; 173(1): 66–76, <https://doi.org/10.1111/bph.13336>.
45. Abdul Hamid Z., Budin S.B., Wen Jie N., Hamid A., Husain K., Mohamed J. Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet Smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012; 13(3): 176–185, <https://doi.org/10.1631/jzus.1100133>.
46. Hohmann M.S., Cardoso R.D.R., Fattori V., Arakawa N.S., Tomaz J.C., Lopes N.P., Casagrande R., Verri W.A. Jr. Hypericum perforatum reduces paracetamol-

- induced hepatotoxicity and lethality in mice by modulating inflammation and oxidative stress. *Phytother Res* 2015; 29(7): 1097–1101, <https://doi.org/10.1002/ptr.5350>.
47. Das S., Roy P., Ghosh Auddy R., Mukherjee A. Sillymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. *Int J Nanomed* 2011; 6: 1291–1301, <https://doi.org/10.2147/ijn.s15160>.
48. Naggayi M., Mukiibi N., Iliya E. The protective effects of aqueous extract of *Carica papaya* seeds in paracetamol induced nephrotoxicity in male Wistar rats. *Afr Health Sci* 2015; 15(2): 598–605, <https://doi.org/10.4314/ahs.v15i2.37>.
49. Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J.P. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. *Pathol Biol (Paris)* 2004; 52(6): 314–322, <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.01.001>.
50. Firdous A.P., Sindhu E.R., Kuttan R. Hepato-protective potential of carotenoid meso-zeaxanthin against paracetamol, CCl₄ and ethanol induced toxicity. *Indian J Exp Biol* 2011; 49(1): 44–49.
51. Arafa H.M. Carnitine deficiency: a possible risk factor in paracetamol hepatotoxicity. *Arch Toxicol* 2009; 83(2): 139–150, <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0330-x>.
52. Madkour F.F., Abdel-Daim M.M. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Dunaliella salina* in paracetamol-induced acute toxicity in rats. *Indian J Pharm Sci* 2013; 75(6): 642, <https://doi.org/10.4103/0250-474X.124747>.
53. Zubairi M.B., Ahmed J.H., Al-Haroon S.S. Effect of adrenergic blockers, carvedilol, prazosin, metoprolol and combination of prazosin and metoprolol on paracetamol-induced hepatotoxicity in rabbits. *Indian J Pharmacol* 2014; 46(6): 644–648, <https://doi.org/10.4103/0253-7613.144937>.
54. Ekor M., Odewabi A.O., Kale O.E., Bamidele T.O., Adesanoye O.A., Farombi E.O. Modulation of paracetamol-induced hepatotoxicity by phosphodiesterase isozyme inhibition in rats: a preliminary study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2013; 24(1): 73–79, <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2012-0043>.
55. Polat M., Cerrah S., Albayrak B., Ipek S., Arabal M., Aslan F., Yilmaz O. Assessing the effect of leptin on liver damage in case of hepatic injury associated with paracetamol poisoning. *Gastroenterol Res Pract* 2015; 2015: 357360, <https://doi.org/10.1155/2015/357360>.
56. Wang X., Wu Q., Liu A., Anadón A., Rodríguez J.L., Martínez-Larrañaga M.R., Yuan Z., Martínez M.A. Paracetamol: overdose-induced oxidative stress toxicity, metabolism, and protective effects of various compounds in vivo and in vitro. *Drug Metab Rev* 2017; 49(4): 395–437, <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1354014>.
57. Ihsan A., Wang X., Liu Z., Wang Y., Huang X., Liu Y., Yu H., Zhang H., Li T., Yang C., Yuan Z. Long-term mequindox treatment induced endocrine and reproductive toxicity via oxidative stress in male Wistar rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252(3): 281–288, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.02.020>.
58. Wang Y., Li D., Cheng N., Gao H., Xue X., Cao W., Sun L. Antioxidant and hepatoprotective activity of vitex honey against paracetamol induced liver damage in mice. *Food Funct* 2015; 6(7): 2339–2349, <https://doi.org/10.1039/c5fo00345h>.
59. Wang X., Wu Q., Wan D., Liu Q., Chen D., Liu Z., Martínez-Larrañaga M.R., Martínez M.A., Anadón A., Yuan Z. Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro. *Arch Toxicol* 2016; 90(1): 81–101, <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1604-8>.
60. Karcioğlu S.S., Palabiyik S.S., Bayir Y., Karakus E., Mercantepe T., Halici Z., Albayrak A. The role of RAAS inhibition by Aliskiren on paracetamol-induced hepatotoxicity model in rats. *J Cell Biochem* 2015; 117(3): 638–646, <https://doi.org/10.1002/jcb.25313>.
61. Galal R.M., Zaki H.F., Seif El-Nasr M.M., Agha A.M. Potential protective effect of honey against paracetamol-induced hepatotoxicity. *Arch Iran Med* 2012; 15(11): 674–680.
62. Karakus E., Halici Z., Albayrak A., Polat B., Bayir Y., Kiki I., Cadirci E., Topcu A., Aksak S. Agomelatine: an antidepressant with new potent hepatoprotective effects on paracetamol-induced liver damage in rats. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32(8): 846–857, <https://doi.org/10.1177/0960327112472994>.
63. Rasool M.K., Sabina E.P., Ramya S.R. Hepatoprotective and antioxidant effects of gallic acid in paracetamol-induced liver damage in mice. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62(5): 638–643, <https://doi.org/10.1211/jpp.62.05.0012>.
64. Anstee Q.M., Goldin R.D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006; 87(1): 1–16, <https://doi.org/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>.
65. Farrell G.C., Mridha A.R., Yeh M.M., Arsov T., Van Rooyen D.M., Brooling J., Nguyen T., Heydet D., Delghingaro-Augusto V., Nolan C.J., Shackel N.A., McLennan S.V., Teoh N.C., Larter C.Z. Strain dependence of diet-induced NASH and liver fibrosis in obese mice is linked to diabetes and inflammatory phenotype. *Liver Int* 2014; 34(7): 1084–1093, <https://doi.org/10.1111/liv.12335>.
66. Hansen B.C., Liang Z., Sun F., Yang Z., Tang C., Chen Z., Yubo S., Yao Z., Wu M., Chen Y., Gao F., Zeng W. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in obese rhesus monkeys provides the first animal model that accurately reflects the human condition. *FASEB J* 2017; 31(S1): 895.6–895.6, https://doi.org/10.1096/fasebj.31.1_supplement.895.6.
67. Itagaki H., Shimizu K., Morikawa S., Ogawa K., Ezaki T. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(12): 2683–2696.
68. Cole L.K., Vance J.E., Vance D.E. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821(5): 754–761, <https://doi.org/10.1016/j.bbailp.2011.09.009>.
69. Gibbons G.F., Wiggins D., Brown A.M., Hebbachi A.M. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(1): 59–64, <https://doi.org/10.1042/bst0320059>.
70. Lu S.C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Asp Med* 2009; 30(1–2): 42–59, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>.
71. Greene M.W., Burrington C.M., Lynch D.T., Davenport S.K., Johnson A.K., Horsman M.J., Chowdhry S., Zhang J., Sparks J.D., Tirrell P.C. Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 2014; 9(1): e85848, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085848>.
72. Tosello-Tramont A.C., Landes S.G., Nguyen V., Novobrantseva T.I., Hahn Y.S. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production.

- J Biol Chem* 2012; 287(48): 40161–40172, <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.417014>.
73. Ramadori P., Weiskirchen R., Trebicka J., Streetz K. Mouse models of metabolic liver injury. *Lab Anim* 2015; 49(Suppl 1): 47–58, <https://doi.org/10.1177/0023677215570078>.
74. Rinella M.E., Green R.M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004; 40(1): 47–51, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.09.020>.
75. Larter C.Z., Yeh M.M., Williams J., Bell-Anderson K.S., Farrell G.C. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol* 2008; 49(3): 407–416, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.03.026>.
76. Yamazaki Y., Kakizaki S., Takizawa D., Ichikawa T., Sato K., Takagi H., Mori M. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23(2): 276–282, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.05150.x>.
77. Passman A.M., Strauss R.P., McSpadden S.B., Finch-Edmondson M.L., Woo K.H., Diepeveen L.A., London R., Callus B.A., Yeoh G.C. A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet reduces morbidity and retains a liver progenitor cell response in mice. *Dis Model Mech* 2015; 8(12): 1635–1641, <https://doi.org/10.1242/dmm.022020>.
78. Ochoa-Callejero L., Pérez-Martínez L., Rubio-Mediavilla S., Oteo J.A., Martínez A., Blanco J.R. Maraviroc, a CCR5 antagonist, prevents development of hepatocellular carcinoma in a mouse model. *PLoS One* 2013; 8(1): e53992, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053992>.
79. Gogoi-Tiwari J., Köhn-Gaone J., Giles C., Schmidt-Arras D., Gratte F.D., Elsegood C.L., McCaughan G.W., Ramm G.A., Olynyk J.K., Tirnitz-Parker J.E.E. The murine choline-deficient, ethionine-supplemented (CDE) diet model of chronic liver injury. *J Vis Exp* 2017; 128: e56138, <https://doi.org/10.3791/56138>.
80. Passman A.M., Strauss R.P., McSpadden S.B., Finch-Edmondson M.L., Woo K.H., Diepeveen L.A., London R., Callus B.A., Yeoh G.C. A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet reduces morbidity and retains a liver progenitor cell response in mice. *Dis Model Mech* 2015; 8(12): 1635–1641, <https://doi.org/10.1242/dmm.022020>.
81. Nevzorova Y.A., Boyer-Díaz Z., Cubero F.J., Gracia-Sancho J. Animal models for liver disease — a practical approach for translational research. *J Hepatol* 2020; 73(2): 423–440, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.011>.
82. Hansen H.H., Feigh M., Veidal S.S., Rigbolt K.T., Vrang N., Fosgerau K. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discov Today* 2017; 22(11): 1707–1718, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.007>.
83. Hebbard L., George J. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 35–44, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.191>.
84. Pedersen H.D., Galsgaard E.D., Christoffersen B.Ø., Cirera S., Holst D., Fredholm M., Latta M. NASH-inducing diets in Göttingen minipigs. *J Clin Exp Hepatol* 2020; 10(3): 211–221, <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2019.09.004>.
85. Hariri N., Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010; 23(2): 270–299, <https://doi.org/10.1017/s0954422410000168>.
86. White P.J., Marette A. Potential role of omega-3-derived resolution mediators in metabolic inflammation. *Immun Cell Biol* 2014; 92(4): 324–330, <https://doi.org/10.1038/icb.2013.112>.
87. Ito M., Suzuki J., Tsujioka S., Sasaki M., Gomori A., Shirakura T., Hirose H., Ito M., Ishihara A., Iwaasa H., Kanatani A. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res* 2007; 37(1): 50–57, <https://doi.org/10.1111/j.1872-034x.2007.00008.x>.
88. Asgharpour A., Cazanave S.C., Pacana T., Seneshaw M., Vincent R., Banini B.A., Kumar D.P., Daita K., Min H.K., Mirshahi F. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* 2016; 65(3): 579–588, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.005>.
89. Montgomery M.K., Hallahan N.L., Brown S.H., Liu M., Mitchell T.W., Cooney G.J., Turner N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia* 2013; 56(5): 1129–1139, <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2846-8>.
90. Ibrahim S.H., Hirsova P., Malhi H., Gores G.J. Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: eat, delete, and inflame. *Dig Dis Sci* 2016; 61(5): 1325–1336, <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3977-1>.
91. Ichimura M., Kawase M., Masuzumi M., Sakaki M., Nagata Y., Tanaka K., Suruga K., Tamaru S., Kato S., Tsuneyama K., Omagari K. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatol Res* 2014; 45(4): 458–469, <https://doi.org/10.1111/hepr.12358>.
92. Kopp W. How Western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; 12: 2221–2236, <https://doi.org/10.2147/dmso.s216791>.
93. Kohli R., Kirby M., Xanthakos S.A., Softic S., Feldstein A.E., Saxena V., Tang P.H., Miles L., Miles M.V., Balistreri W.F., Woods S.C., Seeley R.J. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 52(3): 934–944, <https://doi.org/10.1002/hep.23797>.
94. Charlton M., Krishnan A., Viker K., Sanderson S., Cazanave S., McConico A., Masuoko H., Gores G. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiology* 2011; 301(5): G825–G834, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2011>.
95. Tsuchiya H., Ebata Y., Sakabe T., Hama S., Kogure K., Shiota G. High-fat, high-fructose diet induces hepatic iron overload via a hepcidin-independent mechanism prior to the onset of liver steatosis and insulin resistance in mice. *Metabolism* 2013; 62(1): 62–69, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.06.008>.
96. Ramboer E., Vanhaecke T., Rogiers V., Vinken M. Immortalized human hepatic cell lines for in vitro testing and research purposes. *Methods Mol Biol* 2015; 1250: 53–76, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_4.
97. Soret P.A., Magusto J., Housset C., Gautheron J. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease: a critical appraisal. *J Clin Med* 2021; 10(1): 36, <https://doi.org/10.3390/jcm10010036>.
98. Schyschka L., Martínez Sánchez J.J., Wang Z., Burkhardt B., Müller-Vieira U., Zeilinger K., Bachmann A.,

- Nadalin S., Damm G., Nussler A.K. Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol* 2013; 87(8): 1581–1593, <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1080-y>.
99. Sathaye S., Bagul Y., Gupta S., Kaur H., Redkar R. Hepatoprotective effects of aqueous leaf extract and crude isolates of *Murraya koenigii* against in vitro ethanol-induced hepatotoxicity model. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(6): 587–591, <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.04.012>.
100. Lee J., Choi B., No da Y., Lee G., Lee S.R., Oh H., Lee S.H. A 3D alcoholic liver disease model on a chip. *Integr Biol (Camb)* 2016; 8(3): 302–308, <https://doi.org/10.1039/c5ib00298b>.
101. Deng J., Chen Z., Zhang X., Luo Y., Wu Z., Lu Y., Liu T., Zhao W., Lin B. A liver-chip-based alcoholic liver disease model featuring multi-non-parenchymal cells. *Biomed Microdevices* 2019; 21(3): 57, <https://doi.org/10.1007/s10544-019-0414-9>.
102. Corrado B., De Gregorio V., Imparato G., Attanasio C., Urciuolo F., Netti P.A. A three-dimensional microfluidized liver system to assess hepatic drug metabolism and hepatotoxicity. *Biotechnol Bioeng* 2019; 116(5): 1152–1163, <https://doi.org/10.1002/bit.26902>.
103. Jang K.J., Otieno M.A., Ronxhi J., Lim H.K., Ewart L., Kodella K.R., Petropolis D.B., Kulkarni G., Rubins J.E., Conegliano D., Nawroth J., Simic D., Lam W., Singer M., Barale E., Singh B., Sonee M., Streeter A.J., Manthey C., Jones B., Srivastava A., Andersson L.C., Williams D., Park H., Barrile R., Sliz J., Herland A., Haney S., Karalis K., Ingber D.E., Hamilton G.A. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip. *Sci Transl Med* 2019; 11(517): eaax5516, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax5516>.
104. Poli G., Gravela E. Lipid peroxidation in isolated hepatocytes. In: *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*. McBrien D.C.H., Slater T.F. (editors). Academic Press; 1982; p. 215–224.
105. Boll M., Weber L.W., Becker E., Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch C J Biosci* 2001; 56(7–8): 649–659, <https://doi.org/10.1515/znc-2001-7-826>.
106. Perrissoud D., Auderset G., Reymond O., Maignan M.F. The effect of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1981; 35(2): 83–91, <https://doi.org/10.1007/bf02889151>.
107. Cai Y., Gong L.K., Qi X.M., Li X.H., Ren J. Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26(8): 969–975, <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00143.x>.
108. Jamil I., Symonds A., Lynch S., Alalami O., Smyth M., Martin J. Divergent effects of paracetamol on reactive oxygen intermediate and reactive nitrogen intermediate production by U937 cells. *Int J Mol Med* 1999; 4(3): 309–321, <https://doi.org/10.3892/ijmm.4.3.309>.
109. Perez M.J., Gonzalez-Sanchez E., Gonzalez-Loyola A., Gonzalez-Buitrago J.M., Marin J.J.G. Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells. *Br J Pharmacol* 2011; 162(8): 1686–1699, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01174.x>.
110. Simeonova R., Vitcheva V., Kondeva-Burdina M., Krasteva I., Manov V., Mitcheva M. Hepatoprotective and antioxidant effects of saponarin, isolated from *Gypsophila trichotoma* Wend. on paracetamol-induced liver damage in rats. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 757126, <https://doi.org/10.1155/2013/757126>.
111. Bader A., Petters O., Keller M., Pavlica S. Paracetamol treatment increases telomerase activity in rat embryonic liver cells. *Pharmacol Rep* 2011; 63(6): 1435–1441, [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70707-1](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70707-1).
112. Zhou X., Cheung C.M., Yang J.M., Or P.M., Lee W.Y., Yeung J.H. Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) water extract inhibits paracetamol-induced toxicity in primary rat hepatocytes via reducing CYP2E1 activity and oxidative stress. *J Pharm Pharmacol* 2015; 67(7): 980–989, <https://doi.org/10.1111/jphp.12381>.
113. Pierce R.H., Franklin C.C., Campbell J.S., Tonge R.P., Chen W., Fausto N., Bruschi S.A. Cell culture model for acetaminophen-induced hepatocyte death in vivo. *Biochem Pharmacol* 2002; 64(3): 413–424, [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01180-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01180-2).
114. Clarke G.A., Hartse B.X., Niaraki Asli A.E., Taghavimehr M., Hashemi N., Abbasi Shirsavar M., Montazami R., Alimoradi N., Nasirian V., Ouedraogo L.J., Hashemi N.N. Advancement of sensor integrated organ-on-chip devices. *Sensors (Basel)* 2021; 21(4): 1367, <https://doi.org/10.3390/s21041367>.
115. Foster A.J., Chouhan B., Regan S.L., Rollison H., Amberntsson S., Andersson L.C., Srivastava A., Darnell M., Cairns J., Lazic S.E., Jang K.J., Petropolis D.B., Kodella K., Rubins J.E., Williams D., Hamilton G.A., Ewart L., Morgan P. Integrated in vitro models for hepatic safety and metabolism: evaluation of a human Liver-Chip and liver spheroid. *Arch Toxicol* 2019; 93(4): 1021–1037, <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02427-4>.
116. Rodimova S., Elagin V., Karabut M., Koryakina I., Timin A., Zagaynov V., Zyuzin M., Zagaynova E., Kuznetsova D. Toxicological analysis of hepatocytes using FLIM technique: in vitro versus ex vivo models. *Cells* 2021; 10(11): 2894, <https://doi.org/10.3390/cells10112894>.
117. Prot J.M., Bunescu A., Elena-Herrmann B., Aninat C., Snouber L.C., Griscom L., Razan F., Bois F.Y., Legallais C., Brochot C., Corlu A., Dumas M.E., Leclerc E. Predictive toxicology using systemic biology and liver microfluidic “on chip” approaches: application to acetaminophen injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 259(3): 270–280, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.017>.
118. Gall W.E., Beebe K., Lawton K.A., Adam K.P., Mitchell M.W., Nakhle P.J., Ryals J.A., Milburn M.V., Nannipieri M., Camastra S., Natali A., Ferrannini E.; RISC Study Group. α -Hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS One* 2010; 5(5): e10883, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010883>.
119. Beger R.D., Sun J., Schnackenberg L.K. Metabolomics approaches for discovering biomarkers of drug-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicol Applied Pharmacol* 2010; 243(2): 154–166, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.019>.
120. Soga T., Baran R., Suematsu M., Ueno Y., Ikeda S., Sakurakawa T., Kakazu Y., Ishikawa T., Robert M., Nishioka T., Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J Biol Chem* 2006; 281(24): 16768–16776, <https://doi.org/10.1074/jbc.m601876200>.
121. Aoudjehane L., Gautheron J., Le Goff W., Goumard C., Gilaizeau J., Nget C.S., Savier E., Atif M.,

- Lesnik P., Morichon R., Chrétien Y., Calmus Y., Scatton O., Housset C., Conti F. Novel defatting strategies reduce lipid accumulation in primary human culture models of liver steatosis. *Dis Model Mech* 2020; 13(4): dmm042663, <https://doi.org/10.1242/dmm.042663>.
- 122.** Wang L., Chen J., Ning C., Lei D., Ren J. Endoplasmic reticulum stress related molecular mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Curr Drug Targets* 2018; 19(9): 1087–1094, <https://doi.org/10.2174/1389450118666180516122517>.
- 123.** Lin Y., Ding D., Huang Q., Liu Q., Lu H., Lu Y., Chi Y., Sun X., Ye G., Zhu H., Wei J., Dong S. Downregulation of MiR-192 causes hepatic steatosis and lipid accumulation by inducing SREBF1: novel mechanism for bisphenol A-triggered non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2017; 1862(9): 869–882, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2017.05.001>.
- 124.** Ling J., Lewis J., Douglas D., Kneteman N.M., Vance D.E. Characterization of lipid and lipoprotein metabolism in primary human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831(2): 387–397, <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.08.012>.
- 125.** Barbero-Becerra V.J., Giraudi P.J., Chávez-Tapia N.C., Uribe M., Tiribelli C., Rosso N. The interplay between hepatic stellate cells and hepatocytes in an in vitro model of NASH. *Toxicol in Vitro* 2015; 29(7): 1753–1758, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.010>.
- 126.** Suurmond C.E., Lasli S., van den Dolder F.W., Ung A., Kim H.J., Bandaru P., Lee K., Cho H.J., Ahadian S., Ashammakhi N., Dokmeci M.R., Lee J., Khademhosseini A. In vitro human liver model of nonalcoholic steatohepatitis by coculturing hepatocytes, endothelial cells, and kupffer cells. *Adv Healthc Mater* 2019; 8(24): e1901379, <https://doi.org/10.1002/adhm.201901379>.
- 127.** Giraudi P.J., Becerra V.J., Marin V., Chavez-Tapia N.C., Tiribelli C., Rosso N. The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Exp Mol Pathol* 2015; 98(1): 85–92, <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.12.006>.
- 128.** Feaver R.E., Cole B.K., Lawson M.J., Hoang S.A., Marukian S., Blackman B.R., Figler R.A., Sanyal A.J., Wamhoff B.R., Dash A. Development of an *in vitro* human liver system for interrogating non-alcoholic steatohepatitis. *JCI Insight* 2016; 1(20): e90954, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90954>.
- 129.** Chen Y., Ma K. NLRC4 inflammasome activation regulated by TNF- α promotes inflammatory responses in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 511(3): 524–530, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.099>.
- 130.** Müller F.A., Sturla S.J. Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Toxicol* 2019; 16: 9–16, <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.03.001>.
- 131.** Gori M., Simonelli M.C., Giannitelli S.M., Businaro L., Trombetta M., Rainer A. Investigating nonalcoholic fatty liver disease in a liver-on-a-chip microfluidic device. *PLoS One* 2016; 11(7): e0159729, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159729>.
- 132.** Banaeiyan A.A., Theobald J., Paukštyte J., Wölfl S., Adiels C.B., Goksör M. Design and fabrication of a scalable liver-lobule-on-a-chip microphysiological platform. *Biofabrication* 2017; 9(1): 015014, <https://doi.org/10.1088/1758-5090/9/1/015014>.
- 133.** Hassan S., Sebastian S., Maharjan S., Lesha A., Carpenter A.M., Liu X., Xie X., Livermore C., Zhang Y.S., Zarrinpar A. Liver-on-a-chip models of fatty liver disease. *Hepatology* 2020; 71(2): 733–740, <https://doi.org/10.1002/hep.31106>.
- 134.** Kostrzewski T., Cornforth T., Snow S.A., Ouro-Gnao L., Rowe C., Large E.M., Hughes D.J. Three-dimensional perfused human in vitro model of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2017; 23(2): 204–215, <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i2.204>.
- 135.** Braunersreuther V., Viviani G.L., Mach F., Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18(8): 727–735, <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i8.727>.
- 136.** Lee S.Y., Sung J.H. Gut–liver on a chip toward an in vitro model of hepatic steatosis. *Biotechnol Bioeng* 2018; 115(11): 2817–2827, <https://doi.org/10.1002/bit.26793>.
- 137.** Freag M.S., Namgung B., Reyna Fernandez M.E., Gherardi E., Sengupta S., Jang H.L. Human nonalcoholic steatohepatitis on a chip. *Hepato Commun* 2020; 5(2): 217–233, <https://doi.org/10.1002/hep4.1647>.
- 138.** Kleiner D.E., Brunt E.M., Van Natta M., Behling C., Contos M.J., Cummings O.W., Ferrell L.D., Liu Y.C., Torbenson M.S., Unalp-Arida A., Yeh M., McCullough A.J., Sanyal A.J.; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6): 1313–1321, <https://doi.org/10.1002/hep.20701>.
- 139.** Bracken M.B. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J R Soc Med* 2009; 102(3): 120–122, <https://doi.org/10.1258/jrsm.2008.08k033>.
- 140.** Wu X., Roberto J.B., Knupp A., Kenerson H.L., Truong C.D., Yuen S.Y., Brempeis K.J., Tuefferd M., Chen A., Horton H., Yeung R.S., Crispe I.N. Precision-cut human liver slice cultures as an immunological platform. *J Immunol Methods* 2018; 455: 71–79, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.01.012>.
- 141.** Fisher R.L., Vickers A.E. Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica* 2013; 43(1): 8–14, <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.728013>.
- 142.** De Graaf I.A.M., Olinga P., de Jager M.H., Merema M.T., de Kanter R., van de Kerkhof E.G., Groothuis G.M. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat Protoc* 2010; 5(9): 1540–1551, <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.111>.
- 143.** Klassen L.W., Thiele G.M., Duryee M.J., Schaffert C.S., DeVeney A.L., Hunter C.D., Olinga P., Tuma D.J. An in vitro method of alcoholic liver injury using precision cut liver slices from rats. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(3): 426–436, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.012>.
- 144.** Schaffert C.S., Todero S.L., McVicker B.L., Tuma P.L., Sorrell M.F., Tuma D.J. WIF-B cells as a model for alcohol-induced hepatocyte injury. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(11): 2167–2674, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.01.022>.
- 145.** Bruguera M., Bertran A., Bombi J. A., Rodes J. Giant mitochondria in hepatocytes: a diagnostic hint for alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1977; 73(6): 1383–1387, [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(19\)31518-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(19)31518-5).
- 146.** Teli M.R., Day C.P., Burt A.D., Bennett M.K., James O.F. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet* 1995; 346(8981): 987–990, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91685-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91685-7).

147. Palma E., Riva A., Mudan S., Manyakin N., Morrison D., Moreno C., Degré D., Trepo E., Sancho-Bru P., Altamirano J., Caballeria J., Odena G., Bataller R., Williams R., Chokshi S. Perturbation of mitochondrial dynamics in alcoholic liver disease. *J World Mitochondria Soc* 2016; 2(2): 1–4, https://doi.org/10.18143/jwms_v2i2_1948.
148. Palma E., Riva A., Moreno C., Odena G., Mudan S., Manyakin N., Manyakin N., Miquel R., Degré D., Trepo E., Sancho-Bru P., Altamirano J., Caballeria J., Zamalloa A., Menon K., Heaton N., Williams R., Bataller R., Chokshi S. Perturbations in mitochondrial dynamics are closely involved in the progression of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2020; 44(4): 856–865, <https://doi.org/10.1111/acer.14299>.
149. Li F., Zhou J., Li Y., Sun K., Chen J. Mitochondrial damage and Drp1 overexpression in rifampicin- and isoniazid-induced liver injury cell model. *J Clin Transl Hepatol* 2019; 7(1): 40–45, <https://doi.org/10.14218/jcth.2018.00052>.
150. Granitzny A., Knebel J., Schaudien D., Braun A., Steinberg P., Dasenbrock C., Hansen T. Maintenance of high quality rat precision cut liver slices during culture to study hepatotoxic responses: acetaminophen as a model compound. *Toxicol in Vitro* 2017; 42: 200–213, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.001>.
151. Ji J., Yu F., Ji Q., Li Z., Wang K., Zhang J., Lu J., Chen L., E Q., Zeng Y., Ji Y., Qun E. Comparative proteomic analysis of rat hepatic stellate cell activation: a comprehensive view and suppressed immune response. *Hepatology* 2012; 56(1): 332–349, <https://doi.org/10.1002/hep.25650>.
152. Li J.T., Wang H., Pan X.L., Yan Y.E., Guo Y., Zhang B.J. Establishment of an acetaminophen-induced hepatotoxicity model of precision-cut liver slices and the regulation of cytochrome P450 2E1. *Chin J Clin Pharmacol Ther* 2008; 13(1): 46.
153. McGill M.R., Williams C.D., Xie Y., Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 264(3): 387–394, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.015>.
154. Dewyse L., De Smet V., Verhulst S., Eysackers N., Kunda R., Messaoudi N., Reynaert H., van Grunsven L.A. Improved precision-cut liver slice cultures for testing drug-induced liver fibrosis. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9:862185, <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.862185>.
155. Schreiter T., Sowa J.P., Schlattjan M., Treckmann J., Paul A., Strucksberg K.H., Baba H.A., Odenthal M., Gieseler R.K., Gerken G., Arteel G.E., Canbay A. Human ex-vivo liver model for acetaminophen-induced liver damage. *Sci Rep* 2016; 6(1): 31916, <https://doi.org/10.1038/srep31916>.
156. Kanani T., Isherwood J., Issa E., Chung W.Y., Ravaioli M., Oggioni M.R., Garcea G., Dennison A. A narrative review of the applications of ex-vivo human liver perfusion. *Cureus* 2023; 15(2): e34804, <https://doi.org/10.7759/cureus.34804>.
157. Van de Bovenkamp M., Groothuis G.M., Draaisma A.L., Merema M.T., Bezuijen J.I., van Gils M.J., Meijer D.K.F., Friedman S.L., Olinga P. Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Toxicol Sci* 2005; 85(1): 632–638, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi127>.
158. Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. *Cell Tissue Res* 2012; 347(1): 225–243, <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1178-6>.
159. Green C.J., Parry S.A., Gunn P.J., Ceresa C.D.L., Rosqvist F., Piché M.E., Hodson L. Studying non-alcoholic fatty liver disease: the ins and outs of in vivo, ex vivo and in vitro human models. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2020; 41(1): 20180038, <https://doi.org/10.1515/hmbci-2018-0038>.
160. Graulet B., Gruffat D., Durand D., Bauchart D. Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. *J Biochem* 1998; 124(6): 1212–1219, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022240>.
161. Pullen D.L., Liesman J.S., Emery R.S. A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *J Anim Sci* 1990; 68: 1395–1399, <https://doi.org/10.2527/1990.6851395x>.
162. Alam S., Mustafa G., Alam M., Ahmad N. Insulin resistance in development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2016; 7(2): 211–217, <https://doi.org/10.4291/wjgp.v7.i2.211>.
163. Prins G.H., Luangmonkong T., Oosterhuis D., Mutsaers H.A.M., Dekker F.J., Olinga P. A pathophysiological model of non-alcoholic fatty liver disease using precision-cut liver slices. *Nutrients* 2019; 11(3): 507, <https://doi.org/10.3390/nu11030507>.
164. Ly L.D., Xu S., Choi S.K., Ha C.M., Thoudam T., Cha S.K., Wiederkehr A., Wollheim C.B., Lee I.K., Park K.S. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. *Exp Mol Med* 2017; 49(2): e291, <https://doi.org/10.1038/emm.2016.157>.
165. Prins G.H., Rios-Morales M., Gerding A., Reijngoud D.J., Olinga P., Bakker B.M. The effects of butyrate on induced metabolic-associated fatty liver disease in precision-cut liver slices. *Nutrients* 2021; 13(12): 4203, <https://doi.org/10.3390/nu13124203>.
166. Lake B.G., Price R.J. Evaluation of the metabolism and hepatotoxicity of xenobiotics utilizing precision-cut slices. *Xenobiotica* 2012; 43(1): 41–53, <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.734643>.