

УДК 577.151.042+57.084.1

А.Г. ШЛЯХТУН

заведующий отраслевой лабораторией биологически активных веществ¹

Ю.З. МАКСИМЧИК

старший научный сотрудник отраслевой научно-исследовательской лаборатории
«ДНК-технологий»

Гродненский государственный аграрный университет, Республика Беларусь

Е.Ф. РАДУТА

старший научный сотрудник отраслевой лаборатории биологически активных веществ¹

В.Ч. ПОЛУБОК

научный сотрудник отраслевой лаборатории по доклиническому исследованию
лекарственных средств¹

Е.В. БУКША

младший научный сотрудник отраслевой лаборатории биологически активных веществ¹

Е.В. БОГДЕВИЧ

инженер отраслевой лаборатории биологически активных веществ¹

И.П. СУТЬКО, канд. биол. наук, доцент,

старший научный сотрудник отраслевой лаборатории биологически активных веществ¹

В.А. ГУРИНОВИЧ, канд. биол. наук,

ведущий научный сотрудник отдела витаминологии и нутрицевтики¹

А.А. ОСТРОВСКИЙ, доктор мед. наук, профессор,

ведущий научный сотрудник отдела доклинического и экспериментального исследования¹

¹Республиканское научно-исследовательское унитарное предприятие

«Институт биохимии биологически активных соединений

Национальной академии наук Беларуси», г. Гродно, Республика Беларусь

Статья поступила 11 апреля 2024 г.

**ВЛИЯНИЕ ТРИТЕРПЕНОИДА БЕТУЛИНА НА ЭКСПРЕССИЮ
КАРНИТИН-ПАЛЬМИТОИЛ ТРАНСФЕРАЗЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС
ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ С ПРИЗНАКАМИ
СТЕАТОГЕПАТИТА**

Впервые показано, что бетулин усиливает экспрессию и ферментативную активность карнитин-пальмитоилтрансферазы I типа в печени при экспериментальной неалкогольной жировой болезни печени с отдельными признаками стеатогепатита у крыс, что сопровождается усилением митохондриального β -окисления жирных кислот и, как следствие, уменьшением выраженности стеатогепатоза и проявлений дислипидемии. Установленный факт существенно расширяет знания о молекулярных механизмах гиполлипидемического действия бетулина и возможность его использования в качестве терапевтического средства при неалкогольной жировой болезни печени.

Ключевые слова: бетулин, неалкогольная жировая болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит, карнитин-пальмитоилтрансфераза I, обмен липидов.

SHLYAHTUN A.H., Head of the laboratory¹

MAKSIMCHYK YU.Z., Senior Researcher Applied-Research Laboratory of «DNA-technologies» of Educational Institution «Grodno State Agrarian University», Republic of Belarus

RADUTA A.F., Senior Researcher¹

POLUBOK V.CH., Researcher¹

BUKSHA E.V., Junior Researcher¹

BOGDEVICH Y.V., Industrial Laboratory Engineer¹

SUTSKO I.P., PhD in Biol. Sc., Associate Professor, Senior Researcher¹

GURINOVICH V.A., PhD in Biol. Sc., Leading Researcher¹

ASTROWSKI A.A., Doctor of Med.Sc., Professor, Leading Researcher¹

¹Institute of Biochemistry of Biologically Active Compounds

of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Republic of Belarus

EFFECT OF TRITERPENOID BETULIN ON EXPRESSION OF CARNITINE-PALMITOYLTRANSFERASE-I IN LIVER OF RATS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE WITH SIGNS OF STEATOHEPATITIS

The present study was the first to demonstrate that betulin increases both the expression and enzymatic function of carnitine palmitoyltransferase type 1 (CPT-1) in liver tissue during experimental non-alcoholic fatty liver disease, as determined by the use of certain steatohepatitis markers in rat models. This increase in CPT-1 correlated with an increase in mitochondrial β -oxidation of fatty acids, culminating in a reduction in the severity of steatohepatosis and dyslipidemia symptoms. This finding significantly expands the understanding of the molecular mechanisms underlying the lipid-lowering properties of betulin and its potential application as a therapeutic agent for non-alcoholic fatty liver disease.

Keywords: *betulin, non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis, carnitine palmitoyltransferase 1, lipid metabolism*

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени является важной медицинской и социальной проблемой современности. НАЖБП включает в себя целый спектр заболеваний, начиная от гепатостеатоза и заканчивая НАСГ, который в конечном итоге может привести к фиброзу, циррозу и гепатокарциноме. Согласно последним эпидемиологическим наблюдениям, распространенность НАЖБП среди населения может достигать 20-24 % [1], а для НАСГ – до 3 % населения [2]. Накопление липидов в печени, преимущественно ТГ, при развитии НАЖБП обусловлено нарушением баланса между их транспортом в/из гепатоцита, сниженным окислением и усиленным синтезом *de novo*. По оценкам вклад последнего в развитие ожирения печени составляет 20-30 %. [3].

Рекомендации по лечению НАЖБП включают в себя как консервативные немедикаментозные способы, например, изменение образа жизни, увеличение физической активности и диетотерапию, так и фармакологические вмешательства.

Учитывая умеренную клиническую эффективность синтетических препаратов и их побочные эффекты, возрастает интерес к поиску природных соединений, обладающих гипوليпидемическим действием [4].

В последние годы возрастает количество работ, посвященных одному из таких соединений – бетулину (луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол), природному пентациклическому тритерпеноиду ряда лупана, проявляющему различные виды биологической активности, в том числе гипوليпидемическую. В экспериментах бетулин снижал выраженность диетиндуцированного ожирения у грызунов, уменьшал содержание липидов в сыворотке крови и тканях и повышал чувствительность к инсулину. Нами установлено, что бетулин нормализует уровни ТГ, липопротеинов и СЖК в крови и печени крыс при различных экспериментальных патологиях патогенетически близких к НАЖБП, в том числе при сахарном диабете 2 типа и алкогольном стеатогепатите у крыс [5–9].

Одним из основных механизмов гиполлипидемического действия бетулина является его способность снижать биосинтез холестерина в печени за счет селективного блокирования созревания факторов транскрипции SREBP-2. Известно, что SREBP-2 регулирует биосинтез холестерина, но не участвует напрямую в метаболизме ТГ и СЖК [5].

Для объяснения эффектов бетулина на обмен ТГ и СЖК выдвинута гипотеза о том, что бетулин способен активировать катаболизм СЖК и ТГ в печени путем прямого влияния на экспрессию ферментов, вовлеченных в β -окисление жирных кислот. Подходящей мишенью для объяснения гиполлипидемического эффекта бетулина является митохондриальный фермент КПП1 – скорость-лимитирующий фермент карнитиновой транспортной системы, обеспечивающей транспорт активированных жирных кислот из цитозоля в митохондрии, где они подвергаются β -окислению.

Ранее установлено, что бетулин увеличивает ферментативную активность КПП1 в печени крыс и выявлена сильная отрицательная корреляция между активностью фермента и уровнями СЖК в крови [10].

В ряде исследований показано, что регуляция активности КПП1 может осуществляться на уровне экспрессии под влиянием инсулина, а также тиреоидных и половых гормонов, кроме того, показана посттрансляционная регуляция активности КПП1 путем фосфорилирования, ацетилирования или нитрования аминокислотных остатков фермента [11].

Предположено, что активация КПП1 под влиянием бетулина может быть обусловлена активацией экспрессии либо влиянием на посттрансляционную модификацию фермента.

Таким образом, целью настоящей работы стала оценка терапевтического потенциала бетулина при моделировании НАЖБП у крыс и уточнение механизмов его гиполлипидемического действия, в частности влияния бетулина на ферментативную активность и экспрессию КПП1 в печени крыс при НАЖБП.

Материалы и методы исследований. В работе использован аналитический стандарт бетулина ROTICHRON® Betulin (Carl Roth, Германия; кат. № 8763.1). Для введения животным использовали стрептозотоцин с со-

держанием ≥ 75 % α -аномера (Sigma-Aldrich, США; кат. № S0130). В качестве субстратов КПП1 использовали пальмитоил-КоА (Sigma-Aldrich, США; кат. № P9716) и L-карнитин (Sigma-Aldrich, США; кат. № C0283). В качестве ингибитора активности КПП1 использован 4-гидрокси-L-фенилглицин (Sigma-Aldrich, США; кат. № 56160). Все прочие реактивы имели квалификацию не ниже, чем «химически чистый». Буферные растворы готовили с использованием деионизированной воды, полученной на системе водоподготовки Direct Q3 (Merk Millipore, США).

Бетулин выделяли из коры *Betula pendula* Roth. путем экстракции, в соответствии с описанным ранее методом [7]. Для подтверждения подлинности бетулина использовали ИК-Фурье спектроскопию нарушенного полного внутреннего отражения. Измерения проводили на спектрометре Nicolet iS 10 (ThermoFisher Scientific, США) в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. Для оценки чистоты бетулина использовали обращеннофазную высокоэффективную жидкостную хроматографию в соответствии с ранее описанным методом Zhao с колл. [12]. Чистота полученного бетулина составила 98,9 %.

Моделирование НАЖБП проводили на самцах крыс линии Wistar. Животные содержались в стандартных условиях в помещении с контролируемым уровнем освещенности, температурой и влажностью, со свободным доступом к воде и корму. Для индукции НАЖБП у крыс использовали подход, заключающийся в содержании животных на протяжении 42 суток на рационе с высокожировой диетой, в котором 45 % калорий обеспечивалось животными жирами. Дополнительно, для развития инсулинорезистентности, на 14 и 28 день от начала эксперимента крысам вводили стрептозотоцин в дозе 25 мг/кг массы тела животного, внутривентриально, в виде раствора в 0,1 М натрий-цитратном буфере с pH 4,4 [13].

Через 42 дня от начала эксперимента животные были разделены на 5 групп по 8 животных в каждой – контрольную группу («Контроль»), «ВЖД», «ВЖД + Бетулин 50», «ВЖД + Бетулин 100» и «Бетулин».

Крысы в группах «Контроль» и «Бетулин» на протяжении всего эксперимента содержались на стандартной диете вивария, тогда как животные в группах «ВЖД», «ВЖД + Бету-

лин 50» и «ВЖД + Бетулин 100» продолжали содержаться на ВЖД до конца эксперимента.

Крысам, включенным в группы «ВЖД + Бетулин 50» и «ВЖД + Бетулин 100» вводили внутривентрикулярно в течение 28 дней суспензию бетулина в дозах 50 и 100 мг/кг/сут соответственно в 2 % желатинизированном крахмале. Крысам в группе «Бетулин» ежедневно внутривентрикулярно вводили бетулин в дозе 100 мг/кг/сут на протяжении 28 суток. Контрольные животные получали эквивалентные количества 2 % крахмала.

По окончании эксперимента крыс декапитировали под эфирным наркозом. После декапитации животных собирали образцы крови, печень выделяли без перфузирования, на холоде (0–4 °С). После забора крови форменные элементы осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. В сыворотке крови животных определяли уровни ТГ, ОХ и ХЛВП при помощи клинико-диагностических наборов реагентов «НТПК АнализХ» (Беларусь) в соответствии с инструкциями производителя. Измерение уровней СЖК в крови проводили по методу Duncombe [14].

Образцы тканей печени для гистологического исследования фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, промывали в проточной воде, обезжировали в спиртах восходящей концентрации и заключали в парафин. Изготовление гистологических препаратов и их описание выполнено профессиональными гистологами. Интенсивность воспалительного процесса в печени оценивали по количеству очагов лимфоцитарной инфильтрации, обнаруженных в десяти полях зрения микроскопа.

Для определения содержания ТГ и ОХ в печени липидную фракцию из навесок печени (500 мг) экстрагировали по Folch с колл. [15]. Определение содержания ТГ и ОХ в экстрактах после удаления хлороформа осуществляли с использованием наборов «НТПК АнализХ» (Беларусь).

Активность КПП1 определяли по методу Bieber с соавт. [16] в митохондриальной фракции печени, полученной путем дифференциального центрифугирования. Содержание белка определяли по методу Peterson [17] с помощью калибровочного графика, для построения которого использовали стандарт-

ные растворы бычьего сывороточного альбумина.

Для определения содержания КПП1 в печени использовали твердофазный иммуноферментный анализ (FineTest, КНР; кат. № ER0287). Измерения проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Для выделения РНК из тканей использовали TRIzol (Invitrogen Life Technologies, США; кат. № 15596-026). Выделенную РНК очищали от примесей ДНК обработкой коммерческим препаратом смеси ДНКаз (ThermoFisher Scientific, США; кат. № AM1906). Концентрацию и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически по соотношению A260/A280 (1,95–2,10). Образцы РНК хранили при температуре –80°С в морозильнике ультранизких температур Forma 705 (ThermoFisher Scientific, США).

Для оценки экспрессии мРНК КПП1 использовали ОТ-ПЦР с помощью набора реагентов iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit (Bio-Rad, США) и систему CFX96 (Bio-Rad, США). В качестве праймеров к мРНК *Cpt1a* (NM_031559.2) использовали олигонуклеотидные последовательности AGG TCT GGC TCT ACC ACG AT (прямой праймер) и TAG GTC TGC CGA CAC TTT GC (обратный праймер). Для нормализации количественных данных ОТ-ПЦР при оценке уровня экспрессии мРНК *Cpt1a* в ткани печени крыс в качестве референса использовался *Actb* (NM_031144.3) и следующие олигонуклеотидные последовательности: ATG GAT GAC GAT ATC GCT GC (прямой праймер) и CTT CTG ACC CAT ACC CAC CA (обратный праймер). Анализ ОТ-ПЦР проводили с использованием программного обеспечения CFX Manager 3.1 (Bio-RAD, США). Относительный уровень экспрессии мРНК гена *Cpt1a* рассчитывался по методу Livak и Schmittgen [18].

При работе с животными соблюдались этические нормы, установленные «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [19].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения Prism v. 8.0 (GraphPad, США). Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для выявления значимости отличий

между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный тест Тьюки в случае нормального распределения данных и равенства дисперсий выборок, либо, в противном случае – тест Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна для множественных сравнений. Различия между группами считали статистически значимыми, если вероятность ошибочной оценки не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего значения.

Результаты и обсуждение. Результаты проведенных исследований показали, что содержание крыс на ВЖД сопровождается значительными изменениями метаболизма липидов в печени и в целом организме. Прежде всего, отмечено развитие выраженной дислипидемии атерогенного типа. Обнаружено, что уровень ОХ в сыворотке крови увеличивался на 65 %, концентрация ТГ возрастала в два с половиной раза, концентрации СЖК были выше на 37 % чем в контрольной группе, при этом содержание ХЛВП в сыворотке крови было ниже на 31 % чем в контроле (таблица 1).

В гистологической картине печени животных, содержащихся на ВЖД, отмечено развитие жировой дистрофии и выраженной лимфоцитарной инфильтрации ткани, что вкупе с данными по содержанию печеночных ТГ и ОХ позволяет говорить о развитии у крыс НАЖБП с отдельными признаками НАСГ (таблица 2).

Введение бетулина крысам на фоне ВЖД дозозависимым образом снижало проявления гиперлипидемии. Показано, что бетулин в дозе 50 мг/кг/сут в полтора раза уменьшал содержание ТГ в сыворотке, в то время как увеличение дозы бетулина до 100 мг/кг/сут в еще большей степени снижало уровни ТГ, ОХ и СЖК в сыворотке крови по сравнению с группой «ВЖД».

Аналогичный гиполлипидемический эффект бетулина отмечен в ткани печени. Гистологическая картина печени крыс, получавших бетулин на фоне ВЖД, характеризовалась снижением проявлений стеатоза, что коррелировало со снижением уровней ТГ в печеночной ткани, а также дозозависимым уменьшением количества очагов лимфоцитарной инфильтрации (таблица 2).

Таблица 1. – Влияние бетулина на содержание липидов в сыворотке крыс с НАЖБП, ммоль/л

Группы	Показатели			
	ОХ	ХЛВП	ТГ	СЖК
Контроль	4,53±0,61	3,26±0,49	0,71±0,06	0,51±0,04
ВЖД	7,49±0,94 ^А	2,24±0,28	1,78±0,08 ^А	0,70±0,06 ^А
ВЖД + Бетулин 50	5,71±0,57	2,31±0,24	1,17±0,1 ^В	0,67±0,03
ВЖД + Бетулин 100	3,58±0,65 ^В	2,64±0,45	1,03±0,13 ^В	0,60±0,04
Бетулин	4,51±0,51 ^В	3,68±0,39	0,79±0,07 ^В	0,45±0,02

Примечание – (здесь и далее) – **А** – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, **В** – $p < 0,05$ по сравнению с группой ВЖД

Таблица 2. – Влияние бетулина на маркеры развития НАЖБП в печени крыс

Группы	Содержание липидов		Число лейкоцитарных инфильтратов
	ТГ, мг/г печени	ОХ, мкг/г печени	
Контроль	10,92±0,85	3,38±0,22	0
ВЖД	24,77±1,6 ^А	4,67±0,27 ^А	12,5±2,1
ВЖД + Бетулин 50	19,14±1,13 ^{АВ}	4,03±0,33	8,5±2,2
ВЖД + Бетулин 100	15,08±1,01 ^В	3,52±0,21 ^В	5,4±1,6 ^В
Бетулин	8,39±0,77 ^В	3,57±0,16 ^В	0

Полученные данные позволяют утверждать, что бетулин в условиях эксперимента проявлял выраженное гепатопротекторное и гиполипидемическое действие, снижая выраженность признаков НАЖБП и НАСГ у крыс, что в целом, согласуется с ранее полученными данными.

При молекулярно-биологических исследованиях печени крыс с НАЖБП установлено, что не смотря на увеличенный уровень экспрессии как мРНК КПП1, так и белка КПП1, активность фермента была существенно снижена по сравнению с контрольной группой крыс (таблица 3).

Увеличенная экспрессия КПП1 при содержании животных на ВЖД объясняется увеличенным поступлением в гепатоциты СЖК, которые как известно являются индуктором экспрессии генов ферментов окисления жирных кислот в том числе КПП1. Установлено, что длинноцепочечные СЖК напрямую способны активировать транскрипцию *Cpt1a* связываясь с промоторными элементами в интронах гена, а также действуя через PPAR α -зависимый путь [20].

Наиболее вероятной причиной наблюдаемого снижения активности КПП1 при НАЖБП является ингибирование фермента. Увеличенное содержание липидов в печени крыс с НАЖБП (таблица 2) свидетельствует об усиленном процессе липогенеза в гепатоцитах, что, очевидно, сопряжено с увеличенной активностью участвующих в этом ферментов и, в частности, АКК – важнейшего регулятора биогенеза липидов, катализирующего образование малонил-КоА из ацетил-КоА.

Малонил-КоА как известно, является ингибитором активности КПП1, блокирующим

транспорт жирных кислот в митохондрии [21].

Введение бетулина крысам на фоне ВЖД сопровождалось увеличением экспрессии мРНК КПП1 и, закономерно, содержания белка фермента. В отличие от крыс в группе «ВЖД» наблюдалось значительное усиление ферментативной активности КПП1. При этом эффекты носили дозозависимый характер (таблица 3).

Введение бетулина животным, которые содержались на стандартном рационе вивария, также сопровождалось усилением ферментативной активности и уровней экспрессии КПП1 в печени (таблица 3), что коррелировало с некоторым снижением содержания липидов как в печени, так и в сыворотке крови (таблицы 1-2).

Таким образом, установлено, что введение бетулина крысам сопровождается увеличением экспрессии КПП1 и активности фермента в печени как здоровых животных, так и крыс с НАЖБП.

Полученные результаты значительно дополняет один из известных механизмов гиполипидемического действия бетулина [5], демонстрируя, что бетулин способен активировать процессы β -окисления СЖК в печени. Тем не менее, открытым остается вопрос о том, почему у крыс, которые содержались на ВЖД, происходит ингибирование активности КПП1, а введение бетулина на фоне ВЖД не сопровождается снижением активности фермента. Наиболее вероятным представляется то, что бетулин также способен воздействовать на активность АКК, вероятно уменьшая активность этого фермента и, тем самым, снижая концентрацию малонил-КоА.

Таблица 3. – Влияние бетулина на ферментативную активность и уровни экспрессии КПП1 в печени крыс с НАЖБП

Группы	Активность КПП1, нмоль/мин/мг белка	Содержание белка КПП1, пг/мл	Уровень относительной экспрессии мРНК КПП1
Контроль	10,11±0,72	234,0±47,6	1,03±0,04
ВЖД	9,48±0,59 ^A	254,7±40,1	1,37±0,10 ^A
ВЖД + Бетулин 50	17,06±1,03 ^{AB}	278,2±17,7	1,40±0,11 ^A
ВЖД + Бетулин 100	19,05±1,08 ^{AB}	359,5±35,0	1,79±0,11 ^{AB}
Бетулин	14,80±0,83 ^{AB}	313,9±41,9	1,30±0,08 ^A

Для установления точных механизмов наблюдаемого эффекта требуются дополнительные исследования.

Заключение. Впервые показано, что введение бетулина сопровождается увеличением ферментативной активности и уровней экспрессии КПП1 в печени крыс, сопровождающееся снижением концентраций СЖК и ТГ в сыворотке крови, снижением уровней ОХ и ТГ в ткани печени.

Введение бетулина животным с НАЖБП дозозависимым образом усиливает экспрессию КПП1 на транскрипционном и трансляционном уровнях, что приводит к увеличению активности фермента, сопровождающееся снижением проявлений гиперлипидемии и стеногепатоза, а также предотвращением развития НАСГ.

Выраженное гиполлипидемическое действие и установленные особенности влияния бетулина на обмен липидов позволяют рассматривать его как потенциального кандидата для использования в качестве биологически активной добавки к пище, а в перспективе, как лекарственное средство, для профилактики и терапии НАЖБП/НАСГ.

Список обозначений

АКК – ацетил-КоА-карбоксилаза (КФ 6.4.1.2); ВЖД – высокожировая диета; КоА – кофермент А; КПП1 – карнитин-пальмитоилтрансфераза 1 типа (КФ 2.3.1.21); НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; НАСГ – неалкогольный стеатогепатит; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией; ОХ – общий холестерин; СЖК – свободные жирные кислоты; ТГ – триацилглицеролы; ХЛВП – холестерол липопротеинов высокой плотности; SREBP-2 – фактор транскрипции SREBP-2

Благодарности. Работы выполнены при финансовой поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант № Б16М-120, Рег. № 20163318). Авторы выражают свою искреннюю благодарность д.б.н., профессору В.У. Буко за участие в разноплановом обсуждении результатов исследований, к.м.н., доценту Н.И. Прокончику (Гродненский государственный медицинский университет) и д.м.н., профессору

L. Chyczewski (Высшая медицинская школа г. Белосток, Польша) за неоценимую помощь и консультации в гистопатологических исследованиях, M. Tomulewicz (Высшая медицинская школа г. Белосток, Польша) и S. Szycko, M.D., PhD. (Гданьский медицинский университет, Польша) за бескорыстное предоставление некоторых реагентов и доступа к оборудованию, использованных в настоящем исследовании.

Список литературы

1. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease / M. L. Teng [et al.] // Clin. Mol. Hepatol. – 2023. – Vol. 29 (Suppl). – P. 32–42. DOI: 10.3350/cmh.2022.0365
2. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review / Z. M. Younossi [et al.] // Hepatology. – 2023. – Vol. 77, Iss. 4. – P. 1335–1347. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004
3. Lim, S. Crosstalk between nonalcoholic fatty liver disease and cardiometabolic syndrome / S. Lim, M. R. Taskinen, J. Borén // Obes. Rev. – 2019. – Vol. 20, Iss. 4. – P. 599–611. DOI: 10.1111/obr.12820
4. Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult (2021) / G. J. Pearson [et al.] // Can. J. Cardiol. – 2021. – Vol. 37, Iss. 8. – P. 1129–1150. DOI: 10.1016/j.cjca.2021.03.016
5. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques / J. J. Tang [et al.] // Cell Metab. – 2011. – Vol. 13, Iss. 1. – P. 44–56. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.12.004
6. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis / V. Buko [et al.] // Physiology International. – 2019. – Vol. 106, Iss. 4. – P. 323–334. DOI: 10.1556/2060.106.2019.26
7. Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity / V. Buko [et al.] // J. Mol. Liq. – 2020. – Vol. 309. – Article 113118. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113118.

8. Protective effects of triterpenoid betulin on type 2 diabetes mellitus in rats / A. H. Shlyahtun [et al.] // *Biochemistry and Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 3(1). – P. 220–229.
9. Shlyahtun, A. H. Effect of betulin on levels of main circulating adipocytokines in the blood of rats with type 2 diabetes mellitus / A. H. Shlyahtun // *Transactions of the educational establishment “Vitebsk the Order of “the Badge of Honor” State Academy of Veterinary Medicine*. – 2023. – Vol. 59, Iss. 4. – P. 110–114. DOI: 10.52368/2078-0109-2023-59-4-110-114
10. Влияние бетулина на активность карнитин-пальмитилтрансферазы 1 типа в митохондриях печени крыс / А. Г. Шляхтун [и др.] // *Вестник Полесского государственного университета. Серия природо-ведческих наук*. – 2022. – № 2. – С. 57–63.
11. Schlaepfer, I. R. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential / I. R. Schlaepfer, M. Joshi // *Endocrinology*. – 2020. – Vol. 161, Iss. 2. – Article bqz046. DOI: 10.1210/endo/bqz046
12. Zhao, G. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC / G. Zhao, W. Yan, D. Cao // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – Vol. 43, Iss. 3. – P. 959–962. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.09.026
13. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis / L. Lo [et al.] // *J. Hepatol.* – 2011. – Vol. 55, Iss. 2. – P. 435–444. doi: 10.1016/j.jhep.2010.10.039
14. Duncombe, W. G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma / W. G. Duncombe // *Clinica Chim. Acta*. – 1964. – Vol. 9. – P. 122–125. DOI: 10.1016/0009-8981(64)90004-x
15. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5
16. Bieber, L. L. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase / L. L. Bieber, T. Abraham, T. Helmrath // *Anal. Biochem.* – 1972. – Vol. 50, Iss. 2. – P. 509–518. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90061-9
17. Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall / G. L. Peterson // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 100, Iss. 2. – P. 201–220. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90222-7
18. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods (San Diego, Calif.)*. – 2001. – Vol. 25, Iss. 4. – P. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
19. European Treaty Series No.170. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. – Strasbourg, 1998. – 3 p.
20. Fatty acids induce L-CPT I gene expression through a PPAR α -independent mechanism in rat hepatoma cells / C. Le May [et al.] // *J. Nutr.* – 2005. – Vol. 135, Iss. 10. – P. 2313–2319. DOI: 10.1093/jn/135.10.2313
21. Liang, K. Mitochondrial CPT1A: insights into structure, function, and basis for drug development / K. Liang // *Front. Pharmacol.* – 2023. – Vol. 14. – Article 1160440. DOI: 10.3389/fphar.2023.1160440

References

1. Teng M.L., Ng C.H., Huang D.Q., Chan K.E., Tan D.J., Lim W.H., Yang J.D., Tan E., Muthiah M.D. Global incidence and prevalence of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, 2023, vol. 29 (suppl), pp. 32–42. DOI: 10.3350/cmh.2022.0365
2. Younossi Z.M., Golabi P., Paik J.M., Henry A., Van Dongen C., Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*, 2023, vol. 77, no. 4, pp. 1335–1347. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004
3. Lim S., Taskinen M.R., Borén J. Crosstalk between nonalcoholic fatty liver disease and cardiometabolic syndrome. *Obesity Reviews*, 2019, vol. 20, no. 4, pp. 599–611. DOI: 10.1111/obr.12820
4. Pearson G.J., Thanassoulis G., Anderson T.J., Barry A.R. et al. Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of

- cardiovascular disease in the adult (2021). *Canadian Journal of Cardiology*, 2021, vol. 37, no. 8, pp. 1129–1150. DOI: 10.1016/j.cjca.2021.03.016
5. Tang J.J., Li J.G., Qi W., Qiu W.W., Li P.S., Li B.L., Song B.L. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metabolism*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 44–56. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.12.004
 6. Buko V., Kuzmitskaya I., Kirko S., Belonovskaya E., Naruta E., Lukivskaya O., Shlyahtun A., Ilyich T., Zakreska A., Zavodnik I. Betulin attenuated liver damage by prevention of hepatic mitochondrial dysfunction in rats with alcoholic steatohepatitis. *Physiology International*, 2019, vol. 106, no. 4, pp. 323–334. DOI: 10.1556/2060.106.2019.26
 7. Buko V., Zavodnik I., Palecz B., Stepniak A., Kirko S., Shlyahtun A., Misiuk W., Belonovskaya E., Lukivskaya O., Naruta E., Kuzmitskaya I., Ilyich T., Erdenebayar B., Rakhmadiyeva S. Betulin/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: physicochemical characterization and hepatoprotective activity. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, vol. 309, article 113118. DOI: 10.1016/j.molliq.2020.113118
 8. Shlyahtun A.H., Maksimchik Yu.Z., Zakrzeska A., Sutsko I.P., Raduta A.F., Polubok V.Ch., Buksha E.V., Bogdevich E.V., Kitlas P., Tomulewicz M. Protective effects of triterpenoid betulin on type 2 diabetes mellitus in rats. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2024, vol. 3(1), pp. 220–229.
 9. Shlyahtun A.H. Effect of betulin on levels of main circulating adipocytokines in the blood of rats with type 2 diabetes mellitus. *Transactions of the educational establishment “Vitebsk the Order of “the Badge of Honor” State Academy of Veterinary Medicine*, 2023, vol. 59, no. 4, pp. 110–114. DOI: 10.52368/2078-0109-2023-59-4-110-114
 10. Shlyahtun A.H., Maksimchik Yu.Z., Raduta E.F., Sutsko I.P. Vliyanie betulina na aktivnost' karnitin-pal'mitoiltransferazy I tipa v mitohondriyah pecheni krysa [Effect of betulin on carnitine-palmitoyltransferase-I activity in rats liver]. *Vestnik Polesskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskih nauk.* [Bulletin of Palesky state university. Series in Natural Sciences], 2022, no. 2, pp. 57–63. (In Russian)
 11. Schlaepfer I.R., Joshi M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential. *Endocrinology*, 2020, vol. 161, no. 2, article bqz046. DOI: 10.1210/endo/bqz046
 12. Zhao G., Yan W., Cao D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, vol. 43, no. 3, pp. 959–962. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.09.026
 13. Lo L., McLennan S.V., Williams P.F., Bonner J., Chowdhury S., McCaughan G.W., Gorrell M.D., Yue D.K., Twigg S.M. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 2011, vol. 55, no. 2, pp. 435–444. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.039
 14. Duncombe W.G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 1964, vol. 9, pp. 122–125. DOI: 10.1016/0009-8981(64)90004-x
 15. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, vol. 226, pp. 497–509. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5
 16. Bieber L.L., Abraham T., Helmrath T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Analytical Biochemistry*, 1972, vol. 50, no. 2, pp. 509–518. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90061-9
 17. Peterson G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, 1979, vol. 100, no. 2, pp. 201–220. doi: 10.1016/0003-2697(79)90222-7
 18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods (San Diego, California)*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
 19. European Treaty Series No.170. Protocol of amendment to the European convention for the protection of vertebrate animals used for

- experimental and other scientific purposes / Council of Europe, Strasbourg, 1998, 3 p.
20. Le May C., Caüzac M., Diradourian C., Perdereau D., Girard J., Burnol A.F., Pégrier J.P. Fatty acids induce L-CPT I gene expression through a PPAR α -independent mechanism in rat hepatoma cells. *Journal of Nutrition*, 2005, vol. 135, no. 10, pp.2313–2319. DOI: 10.1093/jn/135.10.2313
21. Liang K. Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, vol. 14, article 1160440. DOI: 10.3389/fphar.2023.1160440.

Received 11 April 2024