

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМ. М.І. ПИРОГОВА**

**НЕКРУТ ДАР'Я ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК: 616.379+546.221:616.36–003.826:616–008.9

**РОЛЬ ІНСУЛІНОПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ-1 ТА ГІДРОГЕН  
СУЛЬФІДУ В МЕХАНІЗМАХ ПРОГРЕСУВАННЯ І КОРЕКЦІЇ  
НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЇ З  
ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ**

14.01.32 – медична біохімія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Вінниця – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор  
**ЗАІЧКО Наталія Валентинівна,**  
Вінницький національний медичний університет  
ім. М.І. Пирогова МОЗ України, завідувач кафедри  
біологічної та загальної хімії.

**Офіційні опоненти:** - доктор медичних наук, професор,  
**НАКОНЕЧНА Оксана Анатоліївна,**  
Харківський національний медичний університет МОЗ  
України, м. Харків, завідувач кафедри біологічної хімії;

- доктор медичних наук, професор,  
**НЕПОРАДА Каріне Степанівна,**  
ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна  
академія» МОЗ України, завідувач кафедри медичної,  
біоорганічної та біологічної хімії.

Захист відбудеться «12» січня 2018 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 05.600.05 при Вінницькому національному медичному університеті ім. М.І. Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

Автореферат розісланий « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2017 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 05.600.05  
кандидат медичних наук

О.А. Назарчук

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) є одним із поширених хронічних захворювань, що охоплює від 20 до 40 % загальної популяції, зустрічається майже в усіх вікових групах і є вагомим фактором зростання смертності населення [Бабак О.Я., 2012; Харченко Н.В. та ін., 2014; Ткач С.М., Чеверда Т.Л., 2016; Lazo M. et al., 2013; Monjur A., 2015]. НАЖХП відноситься до провідних чинників розвитку цирозу печінки, гепатоцелюлярної карциноми, печінкової недостатності та портальної гіпертензії [Бабак О.Я., 2012; Мохорт Т.В., 2012; Харченко Н.В. та ін., 2014; Звягинцева Т.Д., Глущенко С.В., 2014; Chalasani N., 2012; Sharma M., 2015]. З НАЖХП пов'язано біля 80 % випадків криптогенних цирозів та біля 6 % трансплантацій печінки [Величко В.І., 2014].

Патогенез НАЖХП пояснюють теорією «двох ударів» [Day C.P., James O.F., 1998], що поступово трансформувалась в теорію «множинних ударів» [Tilg H., 2010; Takaki A., 2014; Monjur A., 2015]. «Першим ударом» вважають формування стеатозу через надмірну акумуляцію триацилгліцеролів в гепатоцитах; «другим ударом» - індукцію оксидативного та нітрозативного стресу, стресу ендоплазматичного ретикулума, цитокінового дисбалансу, бактеріальної ендотоксинемії, що викликають некрозапальні зміни гепатоцитів та індукують фіброгенез; «третьім ударом» – включення генетичних та епігенетичних механізмів, які детермінують прогресування стеатозу та фіброзу, дисрегуляцію репаративних процесів в печінці [Tilg H., 2010; Takaki A., 2014; Monjur A., 2015].

НАЖХП часто поєднується з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), яку розглядають як чинник акселерації печінкового стеатогенезу та фіброгенезу [Пентюк Н.О., 2011; Звягинцева Т.Д., Глущенко С.В., 2014; Dai Y., 2016]. Механізми гепатотоксичної дії ГГЦ включають оксидативний стрес, гіпометилування, порушення продукції вазоактивних медіаторів, мітохондріальну дисфункцію [Пентюк Н.О., 2009; 2013; Škovierová H., 2016; Medvedev D.V., 2016]. Між тим патогенетичне значення ГГЦ за НАЖХП з точки зору «множинного удару» потребує подальшого вивчення.

Важливу роль в регуляції функціонального стану печінки відіграє інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1), який контролює диференціацію та проліферацію гепатоцитів, ліпідний метаболізм, проявляє антиоксидантну та цитопротекторну дію [Рикало Н.А., 2015; Lewitt M.S., 2014; Inzaghi E., 2014; Aguirre G.A., 2016]. Також в печінці синтезується газотрансміттер гідроген сульфід ( $H_2S$ ), який проявляє властивості антиоксиданта, цитопротектора, вазодилататора, бере участь в регуляції аутофагії [Sun L., 2015]. Роль IGF-1 та  $H_2S$  як чинників, що можуть визначати репараційний потенціал гепатоцитів, в біохімічних механізмах розвитку НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, поки не з'ясована.

Сучасна фармакотерапія НАЖХП передбачає використання гіполіпідемічних засобів для корекції дисліпідемії [Харченко Н.В. та ін., 2014; Хобзей М.К. та ін., 2014; Chalasani N. et al., 2012; Filozof S. et al., 2015], однак їх вплив на вміст  $H_2S$ , IGF-1 та інші чинники «множинного удару» залишається не з'ясованим. Вважаємо, що встановлення нових патогенетичних аспектів НАЖХП є актуальним завданням медичної біохімії і його вирішення дозволить оптимізувати підходи до корекції вказаної патології.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в рамках планової НДР кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова «Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфїду та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології» (№ держреєстрації 0113U006461) та НДР кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології «Органопротекторна ефективність та безпека метаболічних коректорів в терапії коморбідних патологічних станів» (№ держреєстрації 0114U000195). Автор є співвиконавцем вказаних тем.

**Мета дослідження** – встановити роль інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфїду в механізмах прогресування експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією, у щурів та обґрунтувати патогенетичні підходи до її корекції гіполіпідемічними засобами з політропними властивостями.

**Завдання дослідження:**

1. Вивчити рівень гомоцистеїну в сироватці крові, масо-ростові параметри та біохімічні маркери функціонального стану печінки у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ.

2. Дослідити біохімічні маркери стеатозу та фіброзу печінки (показники ліпідного обміну, оксидативного стресу, антиоксидантної системи, рівень гідроксипроліну в печінці, рівень туморнекротичного фактору  $\alpha$  в сироватці крові) у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ.

3. Вивчити вміст гідроген сульфїду в печінці та рівень інсуліноподібного фактору росту-1 в сироватці крові у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, та оцінити зв'язок з маркерами печінкового стеатозу та фіброзу.

4. Оцінити вплив симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот на рівень гомоцистеїну, показники функціонального стану печінки, маркери стеатозу та фіброзу, рівень інсуліноподібного фактору росту-1 в крові та гідроген сульфїду в печінці у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ.

5. Оцінити антистеатозну ефективність симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот шляхом морфологічного дослідження стану печінки у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ.

**Об'єкт дослідження:** механізми стеатогенезу та фіброгенезу за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

**Предмет дослідження:** біохімічні маркери та модулятори печінкового стеатогенезу та фіброгенезу (показники ліпідного обміну, оксидативного стресу, антиоксидантної системи; сироватковий вміст інсуліноподібного фактору росту-1, гомоцистеїну, туморнекротичного фактору  $\alpha$ ; вміст гідроген сульфїду в печінці), антистеатозний ефект симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот.

**Методи дослідження:** біохімічні (визначення активності ензимів та концентрацій метаболітів), імуноферментні (визначення вмісту інсуліноподібного фактору росту-1, гомоцистеїну, туморнекротичного фактору  $\alpha$ ), патофізіологічні, фармакологічні, морфологічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено комплексне

дослідження біохімічних механізмів прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та обґрунтовані підходи до патогенетичної корекції гіполіпідемічними засобами з політропними властивостями. Встановлено, що ГГЦ посилює стеатогенний ефект високожирової дієти: підвищує (на 9,0-18,5%) приріст індексу маси тіла, маси вісцерального жиру, індексу ожиріння, акселерує розвиток гепато- та спленомегалії. НАЖХП, асоційована з ГГЦ, характеризується більш виразними (в 1,36 - 2,23 рази) порушеннями функціонального стану печінки (зростанням активності аланінамінотрансферази,  $\gamma$ -глутамілтрансферази, зниженням рівня альбуміну в сироватці крові), проатерогенною дисліпідемією, значною акумуляцією триацилгліцеролів, холестеролу та гідроксипроліну в печінці.

Механізми прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, реалізуються через чинники «множинного удару» - потенціювання оксидативного стресу (з підвищенням активності NADPH-оксидази, ліпопероксидації, карбонілювання протеїнів), пригнічення антиоксидантної активності (зі зниженням активності тіоредоксинредуктази), підвищення прозапальної стимуляції та пригнічення продукції антифіброзних модуляторів. Вперше встановлено, що за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, формується значний дефіцит  $H_2S$  в печінці та знижується рівень IGF-1 в сироватці крові. Між рівнем IGF-1 та рівнем гомоцистеїну в сироватці крові виявляється сильний обернений зв'язок ( $r_{xy} = -0,68$ ). Рівень IGF-1 обернено корелює з печінковим вмістом гідроксипроліну, маркерами стеатозу печінки ( $r_{sp} = -0,40-0,50$ ) і прямо корелює з вмістом  $H_2S$  та активністю тіоредоксинредуктази в печінці ( $r_{sp} = 0,47$  та  $0,50$ ).

Вперше встановлені особливості впливу гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями (симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот) на рівень антифіброзних медіаторів за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Показано, що препарат омега-3 поліненасичених жирних кислот сприяє нормалізації рівня  $H_2S$  в печінці та IGF-1 в сироватці крові, а також сприяє зниженню рівня гомоцистеїну в крові. Симвастатин менш ефективно коригує рівень  $H_2S$  в печінці, не впливає на рівень гомоцистеїну і потенціює зниження рівня IGF-1 в сироватці крові. Препарат омега-3 поліненасичених жирних кислот перевершує симвастатин за антистеатогенною та антифіброзною активністю за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, при гістологічному дослідженні.

**Практичне значення одержаних результатів.** Проведені дослідження поглиблюють сучасні уявлення про роль IGF-1 та  $H_2S$  в біохімічних механізмах прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та окреслюють нові біохімічні маркери ефективності антистеатозної та антифіброзної фармакотерапії. Обґрунтовано перспективність застосування препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот для лікування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та встановлено недостатню ефективність симвастатину за цих умов. Розроблена нова модель НАЖХП з прискореною трансформацією стеатозу у стеатогепатит шляхом застосування високожирової дієти та одночасного введення тіолактону гомоцистеїну. Практичне значення результатів даного дослідження підтверджується 2 патентами України на корисну модель (№ 109085; №119010).

Результати дослідження впроваджені в наукову роботу та навчальний процес кафедр біологічної та загальної хімії, фармакології, патологічної фізіології

Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії ДВНЗ «Українська медична стоматологічна академія»; кафедри фармакології з клінічною фармакологією ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського»; біологічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького; біологічної хімії Харківського національного медичного університету МОЗ України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійною науковою працею автора. Автором особисто обрано тему, мету та завдання роботи, проведений патентний пошук та аналіз літератури, статистично опрацьовані результати дослідження, оформлено дисертацію. Автором самостійно проведено моделювання НАЖХП, виконані основні біохімічні дослідження на базі кафедри біологічної та загальної хімії і науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №049/15 від 02.03.2015 р.). Морфологічні дослідження виконані за допомогою доцента Короля А.П. на базі науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №050/15 від 02.03.2015 р.). Дисертантом особисто оформлені наукові публікації, патенти, впровадження. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, ідеї та розробки співавторів не запозичувались.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації оприлюднені на: VIII та IX науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2015, 2016); VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини (Вінниця, 2015), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальные вопросы клинико-лабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией» (Самарканд, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодення» (Вінниця, 2016), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я 2016» (Запоріжжя, 2016), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2016), IX та X всеукраїнській науковій конференції студентів, аспірантів, молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, 2016, 2017), XIII та XIV міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016; 2017» (Вінниця, 2016, 2017), міжнародній науково-практичній конференції «Natural science readings» (Bratislava, 2016), міжнародній науково-практичній конференції «Рівень ефективності та необхідність впливу медичної науки на розвиток медичної практики» (Київ, 2017), міжнародній науково-практичній конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки і практики» (Одеса, 2017), LX науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2017).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 26 наукових праць: 7 статей у

наукових фахових виданнях ДАК України та 1 стаття у науковому періодичному виданні іншої держави (з них 4 включені до міжнародних наукометричних баз), 16 тез в матеріалах з'їздів та конференцій, 2 патенти України на корисну модель.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 198 сторінках (основна текстова частина - 140 сторінок) і включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, 3 розділи власних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних літературних джерел, що включає 316 найменувань (82 кирилицею, 234 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 21 рисунком та 29 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**В огляді літератури** наведені сучасні уявлення про патогенез НАЖХП, механізми гепатотоксичної дії ГГЦ, шляхи фармакологічної корекції НАЖХП.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження проведені на 156 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) масою 210-280 г, отриманих з віварію ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Досліди виконані згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), Директивами Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», що засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім. М.І.Пирогова (протокол № 6 від 14.05.2017). Всі тварини були розподілені на 2 серії дослідів (n=10-14 в групі).

**Модель НАЖХП** створювали шляхом 60-добового утримування тварин на високожировій дієті (ВЖД), що постачала 54% ккал за рахунок жирів, 29% ккал за рахунок вуглеводів, 17% ккал за рахунок протеїнів [Пентюк Н.О., 2013; Takahashi Y. et al., 2012]. ВЖД містила казеїну - 230 г, крохмалю - 390 г, жиру - 320 г (лярду - 160 г, соняшникової олії - 160 г), суміші вітамінів - 5 г, сольової суміші - 35 г, целюлози - 20 г на 1 кг сухого корму. Тварини контрольної групи отримували стандартну дієту (СД), що постачала 62% ккал за рахунок вуглеводів, 21% ккал за рахунок жирів, 17% ккал за рахунок протеїнів.

**ГГЦ** викликали веденням щурам D, L-тіолактону гомоцистеїну гідрохлориду (Acros Organics, Італія) в дозі 100 мг/кг в/шл 1 раз на добу, що дозволяло підвищити рівень гомоцистеїну в крові в 2-3 рази за відсутності гіперметіоніемії та дефіциту вітамінів групи В [Заїчко Н. В., 2010].

**Модель НАЖХП, асоційованої з ГГЦ (НАЖХП+ГГЦ)**, створювали шляхом 60-добового утримання тварин на ВЖД із одночасним введенням тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг в/шл 1 раз на добу).

**Дослідження антистеатозної дії гіполіпідемічних засобів** проводили на моделі НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. З 61-ої доби і до завершення досліду 6 груп щурів з НАЖХП + ГГЦ (n=10) переводили на СД і за цих умов 4 групам тварин упродовж 14 та 28 днів вводились гіполіпідемічні засоби - симвастатин (20 мг/кг маси) або препарат  $\omega$ -3 поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) (150 мг/кг маси) в/шл 1 раз на добу. В роботі застосовані фармакопейні препарати симвастатину (Вазиліп, КРКА) та  $\omega$ -3 ПНЖК (Епадол-Нео, АТ «Київський вітамінний завод»).

Одна капсула епадолу-нео містить 300 мг ейкозапентаєнової кислоти, 200 мг докозагексаєнової кислоти, 498 мг інших жирних кислот, 2 мг d- $\alpha$ -токоферолу.

У визначені терміни досліду тварин знеживлювали методом швидкої декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію 100 мг/кг в/оч), кров та печінку забирали для подальших досліджень.

Показники функціонального стану печінки. В сироватці крові визначали активність аланінамінотрансферази (АЛТ, КФ 2.6.1.2); рівень ліпідів - загального холестеролу (ЗХС), триацилгліцеролів (ТГ), холестеролу ліпопротеїнів високої щільності (ХС ЛПВЩ), холестеролу ліпопротеїнів низької щільності (ХС ЛПНЩ), холестеролу ліпопротеїнів дуже низької щільності (ХС ЛПДНЩ) спектрофотометричними методами на аналізаторі Beckman Coulter AU 480 OLYMPUS. Рівень альбуміну в сироватці крові визначали за реакцією з бромкрезоловим зеленим за набором «Альбумин Агат (Біоконт)»; вміст сечовини - за реакцією діацетилмонооксимом за набором «Мочевина Агат (Біоконт)»; вміст білірубіну - за реакцією з діазотованою сульфаніловою кислотою в присутності кофеїнового реактиву (метод Ендрашика) за набором «Білірубін» (Філісіт-Діагностика, Україна); активність  $\gamma$ -глутамілтрансферази (ГГТ, КФ 2.3.2.2) - за швидкістю вивільнення 4-нітроаніліну з  $\gamma$ -глутамілнітроаніліду за набором «ГГТ» (Філісіт-Діагностика, Україна). Вміст модуляторів печінкового стеато- та фіброгенезу – гомоцистеїну, туморонекротичного фактору  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IGF-1 в сироватці крові визначали імуноферментним методом ELISA за наборами «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія); «Rat TNF- $\alpha$  ELISA Kit» (InvitroGen<sup>TM</sup>); «m/r IGF-1-ELISA (IGFBP-blocked)» (Mediagnost, Німеччина); згідно інструкції виробника на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS (Awareness Technologies, США).

Біохімічні дослідження печінки. Печінку гомогенізували 1-2 хв. в охолоджену середовищі 1,15 % KCl у відношенні маса/об'єм - 1:4 при 3000 об/хв. Центрифугували 30 хв при 600 g, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в мікропробірки Eppendorf і до проведення досліджень зберігали при -20°C. Для оцінки стеатозу в гомогенатах печінки визначали вміст ЗХС та ТГ за наборами «Холестерин-Ф», «Тригліцериди-Ф» (Філісіт-Діагностика, Україна). Вміст фосфоліпідів визначали екстракційно-фотометричним методом за утворенням гідрофобного комплексу з феротіоціанатом амонію [Пентюк О.О. та співавт., 1987]. В якості маркера фіброзу визначали вміст гідроксипроліну за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом [Siddiqi N. J., 2003]. Для оцінки оксидативного стресу визначали активність NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1) за поглинанням NADPH при 340 нм [Fukui T., 1997], тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) - за швидкістю NADPH-залежного відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) - DTNB [Jung H.I. et al., 2004], супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) – за інгібуванням окиснення кверцетину [Костюк В.А., 1990]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за набором «ТБК-Агат (Біоконт)». Вміст карбонільованих протеїнів визначали за утворенням фенілгідразонів при взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразиним [Патент України № 58110А].

Вміст H<sub>2</sub>S в печінці визначали спектрофотометричним методом [Wiliński B., 2011]. Печінку перфузували холодним 1,15 % розчином KCl, наважку тканини



гомогенізували протягом 1-2 хв в охолодженому середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50 %  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , центрифугували при 3000 об/хв 15 хв, відбирали супернатант. Вміст  $\text{H}_2\text{S}$  визначали за реакцією N,N-диметил-парафенілендіаміном сульфатом в присутності  $\text{FeCl}_3$ . Вміст протеїну в гомогенатах печінки визначали мікробіуретовим методом [Кочетов Г.А., 1980].

Дослідження масо-ростових параметрів. Масу тіла тварин (г) та назально-анальну довжину тіла (см) вимірювали 1 раз на тиждень. Індекс маси тіла (ІМТ) розраховували за формулою:  $\text{ІМТ (г/см}^2\text{)} = \text{маса тіла, г} / (\text{довжина тіла, см})^2$  [Anyanwu G. O., 2013]. Відносну масу органів (печінки, селезінки) розраховували як (маса органа, г / маса тіла, г)\*100 %. Визначали відношення маси печінки (г) до маси селезінки (г) на 100 г маси тіла (П/С). Вилучали вісцеральну, епідідімальну, ретроперітонеальну жирову тканину, висушували, зважували. Індекс ожиріння визначали як відношення сумарної маси жиру (г) до маси тіла (г)\*100 % [Anyanwu G.O., 2013]. Для гістологічних досліджень (світлова мікроскопія, гематоксилін-еозин, Ван Гізон, судан III) брали фрагменти центральної частини правої долі печінки. Стадію стеатозу печінки у щурів визначали за [Mashmoul M., 2016].

**Статистичну обробку первинного матеріалу** проводили за допомогою статистичних програм MS Excel, SPSS22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Визначали середнє значення, стандартні помилки. Для оцінки відмінностей показників застосовували при нормальному розподілі - параметричний t-критерій Ст'юдента, при відхиленні від нормального розподілу - непараметричні критерії U Мана-Уїтні та Краскела-Уолліса, нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уїлка. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірманом. Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ . Результати наведено як  $M \pm m$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Для дослідження біохімічних особливостей НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, щурі були розподілені на 4 групи (n=14): 1 - контроль (СД); 2 - ГГЦ (на тлі СД); 3 - ВЖД; 4 - ВЖД+ГГЦ. Встановлено, що введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД забезпечувало формування помірної ГГЦ, в той час як застосування ВЖД індукувало розвиток легкої ГГЦ (табл. 1): на 60 добу рівні гомоцистеїну у щурів груп 2 та 3 були вищими на 88,1 та 38,2 %, ніж в групі контролю ( $p < 0,05$ ). Введення тіолактону гомоцистеїну на тлі ВЖД викликало найбільш виразну ГГЦ: рівень гомоцистеїну був достовірно вищим на 114,2 %, ніж в контролі ( $p < 0,001$ ). Крім того, рівень гомоцистеїну у щурів групи 4 був вищим на 13,9 та 55,0 %, ніж у щурів груп 2 та 3 ( $p < 0,05$ ).

Виявилось, що за ГГЦ посилюється стеатогенний ефект ВЖД: у щурів групи 4 реєструвався більш значний приріст ІМТ, сумарної маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння (на 8,9; 28,0; 18,5 %,  $p < 0,05$ ) порівняно із щурами групи 3. Рівень гомоцистеїну прямо корелював з ІМТ та індексом ожиріння ( $r_{sp} = 0,59-0,60$ ,  $p < 0,01$ ). Розвиток НАЖХП за умов ГГЦ характеризувався достовірно більшим зростанням відносної маси печінки і селезінки (на 7,03; 19,2 %,  $p < 0,05$ ) та зниженням відношення П/С (на 14,1 %,  $p < 0,05$ ), ніж за ізольованої НАЖХП. Підвищення вмісту внутрішнього жиру є ознакою інсулінорезистентності – чинника «першого

удару» за НАЖХП [Takamura T. et al., 2012], а збільшення розмірів селезінки може свідчити про трансформацію стеатозу у стеатогепатит [Tsushima Y., Endo K., 2000].

Таблиця 1 - Біохімічні показники крові та печінки, масо-ростові параметри у щурів за високожирової дієти та її поєднання з ГГЦ (M±m)

Показники	Група 1 (контроль), n=14	Група 2 (ГГЦ), n=14	Група 3 (ВЖД), n=14	Група 4 (ВЖД+ГГЦ), n=14
Показники сироватки крові				
Гомоцистеїн, мкмоль/л	5,37±0,17	10,1±0,32 <sup>*</sup>	7,42±0,34 <sup>##</sup>	11,5±0,29 <sup>##§</sup>
АЛТ, Од/л	51,4±2,67	60,4±3,39 <sup>*</sup>	62,8±3,40 <sup>*</sup>	92,5± 8,52 <sup>##§</sup>
ГГТ, мккат/л	1,38±0,11	2,06±0,10 <sup>*</sup>	2,25±0,11 <sup>*</sup>	3,06±0,11 <sup>##§</sup>
Альбумін, г/л	41,4±0,75	39,8±0,69	40,1±0,69	37,3±0,45 <sup>##§</sup>
ЗХС, ммоль /л	1,28±0,06	1,61±0,05 <sup>*</sup>	1,44±0,04 <sup>##</sup>	1,97±0,09 <sup>##§</sup>
ТГ, ммоль /л	0,59±0,07	0,62±0,04	0,81±0,07 <sup>##</sup>	1,07±0,07 <sup>##§</sup>
ХС ЛПВЩ, ммоль /л	0,70±0,03	0,63±0,04	0,69±0,05	0,56±0,04 <sup>*</sup>
ХС ЛПНЩ, ммоль /л	0,31±0,06	0,70±0,07 <sup>*</sup>	0,39±0,05 <sup>#</sup>	0,92±0,11 <sup>§</sup>
ХС ЛПДНЩ, ммоль/л	0,27±0,03	0,28±0,02	0,37±0,03 <sup>##</sup>	0,48±0,03 <sup>##§</sup>
Індекс атерогенності	0,86±0,12	1,70±0,20 <sup>*</sup>	1,21±0,17	2,71±0,30 <sup>##§</sup>
Показники печінки (мкмоль/г тканини)				
ТГ	19,2±0,96	28,3±1,54 <sup>*</sup>	33,5±1,70 <sup>##</sup>	56,7±2,25 <sup>##§</sup>
ЗХС	6,90±0,20	8,91±0,30 <sup>*</sup>	8,53±0,29 <sup>*</sup>	10,4±0,35 <sup>##§</sup>
Фосфоліпіди	25,6±1,06	20,7±1,37 <sup>*</sup>	23,8±1,12	18,9±0,88 <sup>§</sup>
Гідроксипролін	2,85±0,10	3,74±0,12 <sup>*</sup>	3,50±0,10 <sup>*</sup>	4,56±0,16 <sup>§</sup>
Масо-ростові параметри				
ІМТ, г/см <sup>2</sup>	0,67±0,01	0,69±0,01	0,79±0,02 <sup>##</sup>	0,86±0,02 <sup>##§</sup>
Сумарна маса жиру, г	8,64±0,17	9,41±0,35	11,8±0,44 <sup>##</sup>	15,1±0,54 <sup>##§</sup>
Індекс ожиріння, ум.од.	2,54±0,05	2,63±0,07	3,08±0,05 <sup>##</sup>	3,65±0,26 <sup>##§</sup>
П/С, ум.од.	3,02±0,07	3,08±0,08	3,11±0,47	2,67±0,09 <sup>##§</sup>

Примітки:

1. <sup>\*</sup> - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
2. <sup>#</sup> - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. <sup>§</sup> - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

При поєднанні ВЖД з ГГЦ порушення функціонального стану печінки у щурів поглиблювались: активність АЛТ та ГГТ в сироватці крові у щурів в групі 4 була вищою на 47,3 та 36,0 %, а вміст альбуміну – на 6,98 % нижчим, ніж у щурів в групі 3 (p<0,05). Між рівнем гомоцистеїну та активністю АЛТ та ГГТ виявлявся прямий кореляційний зв'язок ( $r_{sp} = 0,55; 0,68, p<0,01$ ). При поєднанні ВЖД з ГГЦ формувалась дисліпідемія, яка характеризувалась високим сироватковим рівнем ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ на тлі зниження рівня ХС ЛПВЩ. Окреме застосування ВЖД індукувало лише підвищення рівня ТГ та ХС ЛПДНЩ і не викликало суттєвих змін рівня ЗХС, а окреме застосування тіолактону гомоцистеїну підвищувало рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ. Отже, у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, були вищими

гіперхолестеролемія, гіпертриацилгліцеролемія та індекс атерогенності (на 36,8; 32,1 та 123,4%,  $p < 0,05$ ), ніж у щурів з ізольованою НАЖХП.

Дослідження вмісту фракцій ліпідів в печінці підтвердило, що ГГЦ чинила власний ліпогенний ефект та посилювала стеатогенний ефект ВЖД. Так, у щурів з ГГЦ в печінці виявлявся підвищений вміст ТГ та ЗХС (на 47,4 та 29,1 %), знижений вміст фосфоліпідів (на 19,1 %) порівняно з контролем. За ВЖД в печінці щурів спостерігалось підвищення вмісту ТГ (на 74,5 %) та помірне підвищення вмісту ЗХС (на 23,6 %), але вміст фосфоліпідів суттєво не змінився. Водночас, поєднання ВЖД та ГГЦ спричинило підвищення вмісту ТГ та ЗХС (на 195,3 %, та 50,7 %), зниження вмісту фосфоліпідів (на 26,2 %) відносно контролю. Крім того, за ВЖД + ГГЦ вміст ТГ та ЗХС в печінці був достовірно вищим (на 69,3 та 12,2 %), а вміст фосфоліпідів достовірно нижчим (на 20,6 %), ніж за ВЖД.

Рівень гомоцистеїну достовірно корелював з маркерами дисліпідемії: прямий зв'язок виявлявся з рівнем ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ ( $r_{sp} = 0,55; 0,48; 0,51, p < 0,05$ ) і обернений – з рівнем ХС ЛПВЩ ( $r_{sp} = -0,50, p < 0,05$ ) в сироватці крові. Більш тісний прямий зв'язок зареєстрований між рівнем гомоцистеїну та вмістом ЗХС та ТГ ( $r_{sp} = 0,61; 0,63, p < 0,01$ ), а обернений зв'язок – з вмістом фосфоліпідів ( $r_{sp} = -0,46, p < 0,05$ ) у печінці. Отже, ГГЦ та ВЖД є взаємопотенціюючими чинниками порушення ліпідного обміну та розвитку НАЖХП.

Встановлено, що при поєднанні ВЖД з ГГЦ, відбувається акселерація печінкового фіброгенезу. За ГГЦ, ВЖД та, особливо, за їх поєднання (ВЖД+ГГЦ) реєструвалось підвищення вмісту гідроксипроліну в печінці щурів (на 31,2; 22,8 та 60,0%,  $p < 0,05$ ) порівняно з контролем. Вміст гідроксипроліну у щурів в групі 4 (ВЖД+ГГЦ) достовірно перевищував такий на 21,9 та 30,3 % у щурів в групах 2 (ГГЦ) та 3 (ВЖД), відповідно. Між рівнем гомоцистеїну та рівнем гідроксипроліну в печінці виявлявся прямий кореляційний зв'язок ( $r_{sp} = 0,74, p < 0,01$ ).

Виникає питання щодо патогенетичних механізмів, які можуть прискорювати трансформацію простого стеатозу у стеатогепатит за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Результати наших досліджень підтвердили, що механізми прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, реалізуються через ключовий чинник «другого удару» - потенціювання оксидативного стресу (внаслідок гіперпродукції супероксид-аніону та пригнічення антиоксидантної активності) й підвищення рівня профіброгенного цитокіну TNF $\alpha$  в сироватці крові (табл. 2). Зокрема, у щурів в групі 4 (ВЖД+ГГЦ) активність NADPH-оксидази була вищою на 32,5 та 36,0 %, активність СОД – нижчою на 23,0 та 36,3 %, активність тіоредоксинредуктази – нижчою на 17,9 та 19,9 %, вміст ТБК-активних продуктів вищим на 41,3 та 58,0 %, а карбонільних груп протеїнів – вищим на 14,9 та 42,0 %, ніж у щурів в групах 2 (ГГЦ) та 3 (ВЖД), відповідно. За ГГЦ та ВЖД, і особливо за їхнього поєднання підвищувався вміст TNF $\alpha$  в сироватці крові. При цьому, у щурів групи 4 (ВЖД+ГГЦ) рівень TNF $\alpha$  був на 12,6 та 69,8% вищим, ніж у щурів в групах 2 (ГГЦ) та 3 (ВЖД). Вміст гомоцистеїну в сироватці крові прямо корелював з активністю NADPH-оксидази, рівнем ТБК-активних продуктів, карбонільних груп протеїнів ( $r_{sp} = 0,69; 0,70$  та  $0,58, p < 0,01$ ) і обернено – з активністю СОД та тіоредоксинредуктази ( $r_{sp} = -0,64$  та  $-0,61, p < 0,01$ ) в печінці. Прямий зв'язок виявлявся і між рівнями гомоцистеїну та TNF $\alpha$  в сироватці крові ( $r = 0,64, p < 0,01$ ).

Таблиця 2 - Маркери оксидативного стресу в печінці та вміст TNF $\alpha$  в сироватці крові у щурів за високожирової дієти та її поєднання з ГГЦ (M $\pm$ m)

Показники	Група 1 (контроль), n=14	Група 2 (ГГЦ), n=14	Група 3 (ВЖД), n=14	Група 4 (ВЖД+ГГЦ), n=14
NADPH-оксидаза, нмоль / хв·мг протеїну	1,23 $\pm$ 0,04	1,94 $\pm$ 0,03 <sup>*</sup>	1,89 $\pm$ 0,04 <sup>*</sup>	2,57 $\pm$ 0,10 <sup>*#§</sup>
СОД, ум.од. /·мг протеїну	3,69 $\pm$ 0,11	2,57 $\pm$ 0,18 <sup>*</sup>	3,11 $\pm$ 0,16 <sup>*#</sup>	1,98 $\pm$ 0,14 <sup>*#§</sup>
Тіоредоксинредуктаза, нмоль / хв·мг протеїну	5,83 $\pm$ 0,14	4,96 $\pm$ 0,22 <sup>*</sup>	5,08 $\pm$ 0,17 <sup>*</sup>	4,07 $\pm$ 0,16 <sup>*#§</sup>
ТБК-активні продукти, мкмоль / мг протеїну	4,38 $\pm$ 0,23	6,34 $\pm$ 0,14 <sup>*</sup>	5,67 $\pm$ 0,19 <sup>*#</sup>	8,96 $\pm$ 0,33 <sup>*#§</sup>
Карбонільні групи, нмоль/ мг протеїну	2,09 $\pm$ 0,08	3,03 $\pm$ 0,14 <sup>*</sup>	2,45 $\pm$ 0,10 <sup>*#</sup>	3,48 $\pm$ 0,12 <sup>*#§</sup>
TNF $\alpha$ , пг/мл (сироватка)	7,26 $\pm$ 0,52	28,5 $\pm$ 2,09 <sup>*</sup>	18,9 $\pm$ 0,84 <sup>*#</sup>	32,1 $\pm$ 2,48 <sup>*§</sup>

Примітки:

1. <sup>\*</sup> - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
2. <sup>#</sup> - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. <sup>§</sup> - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

На наступному етапі ми дослідили вплив ВЖД та ГГЦ на чинники, що мають антифіброзну активність та можуть визначати репараційний потенціал печінки - H<sub>2</sub>S та IGF-1. Застосування тіолактону гомоцистеїну та ВЖД забезпечувало формування помірного дефіциту H<sub>2</sub>S в печінці, який суттєво поглиблювався при поєднанні вказаних стеатогенних чинників (рис. 1). Вміст H<sub>2</sub>S в печінці щурів груп 2, 3 та 4 був достовірно нижчим на 26,3; 21,0 та 38,9 %, ніж у щурів групи 1. Крім того, вміст H<sub>2</sub>S в печінці у щурів групи 4 (ВЖД+ГГЦ) був достовірно нижчим на 17,1 та 22,6 %, ніж у щурів груп 2 та 3, відповідно. Кореляційний аналіз підтвердив значимий обернений зв'язок між рівнем H<sub>2</sub>S в печінці та рівнем гомоцистеїну в сироватці крові (r<sub>xy</sub> = -0,73, p<0,01). Вміст H<sub>2</sub>S в печінці обернено корелював з маркерами деструкції гепатоцитів, оксидативного стресу, печінкового стеатозу та фіброзу (r<sub>sp</sub> = -0,47-0,60, p<0,05), рівнем TNF $\alpha$  в сироватці (r<sub>sp</sub> = -0,40, p<0,05). Натомість, між печінковим вмістом H<sub>2</sub>S та маркерами антиоксидантного захисту (активністю тіоредоксинредуктази та СОД), вмістом фосфоліпідів в печінці виявлялись прямі зв'язки (r<sub>sp</sub> = 0,53-0,65, p<0,01). Отже, зниження вмісту H<sub>2</sub>S в гепатоцитах може бути чинником трансформації стеатозу у стеатогепатит за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

Встановлено, що за ГГЦ, ВЖД і, особливо, за їх поєднання знижується рівень IGF-1 в сироватці крові. Так, у щурів групи 1 рівень IGF-1 в сироватці крові становив 303,4 $\pm$ 7,91 нг/мл, а в групах 2 (ГГЦ), 3 (ВЖД) та 4 (ВЖД+ГГЦ) - 208,2 $\pm$ 11,5; 255,9 $\pm$ 9,87 та 173,6 $\pm$ 5,48 нг/мл. Отже, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, рівень IGF-1 був на 16,6 та 32,2 % нижчим, ніж за ізольованої ГГЦ та НАЖХП (критерій Краскела-Уолліса, p<0,001). Рівень IGF-1 достовірно обернено корелював з активністю АЛТ та ГГТ (r<sub>sp</sub> = -0,58; -0,52), печінковим вмістом гідроксипроліну

( $r_{sp} = -0,54$ ), маркерами стеатозу печінки ( $r_{sp} = -0,40-0,47$ ), але прямо корелював з вмістом  $H_2S$  й активністю тіоредоксинредуктази в печінці ( $r_{sp} = 0,47; 0,50$ ). Найбільш тісний обернений зв'язок виявлявся між рівнями IGF-1 та гомоцистеїну ( $r = -0,68, p < 0,01$ ). Відомо, що біля 75 % циркулюючого в крові IGF-1 секретується гепатоцитами [Aguirre G.A., 2016]. Очевидно, за НАЖХП з ГГЦ пригнічується продукція IGF-1 у печінці. Таким чином, НАЖХП, асоційована з ГГЦ, характеризується більш «агресивними» змінами на рівні оксидативного стресу, продукції прозапального та профіброгенного медіатора  $TNF\alpha$ , чинників антифіброзного та репараційного потенціалу гепатоцитів - IGF-1 та  $H_2S$ , що веде до прискореної акумуляції жиру та продукції колагенових протеїнів у печінці.

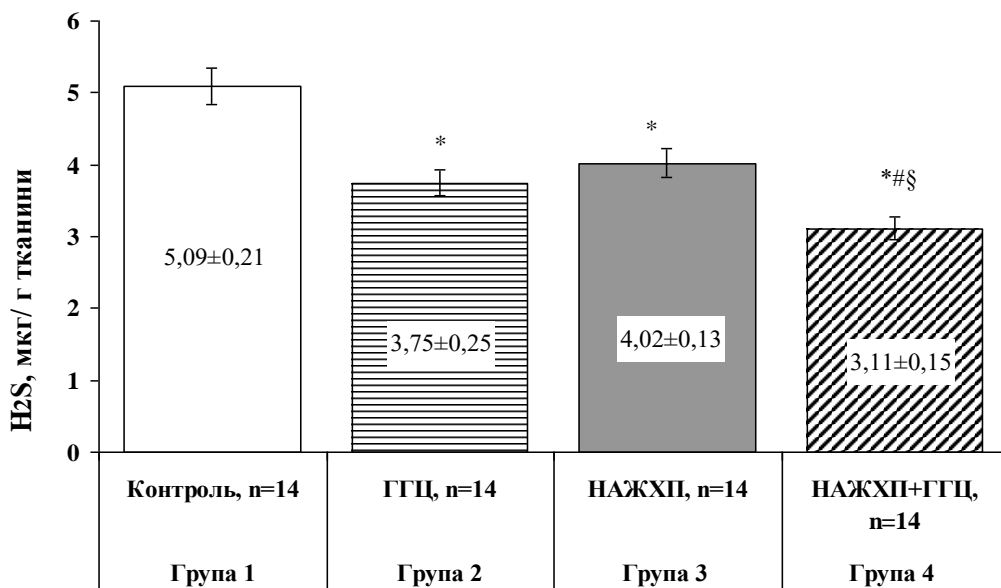


Рисунок 1 - Вміст  $H_2S$  в печінці щурів за високожирової дієти та її поєднання з ГГЦ ( $M \pm m$ ); \* -  $p < 0,05$  відносно групи 1; # -  $p < 0,05$  відносно групи 2; § -  $p < 0,05$  відносно групи 3.

Сучасна фармакотерапія НАЖХП передбачає використання гіполіпідемічних засобів для корекції гіперхолестеринемії та гіпертриацилгліцеролемії. Питання щодо ефективності засобів з різними механізмами гіполіпідемічної дії (зокрема, симвастатину та  $\omega$ -3 ПНЖК), їх вплив на вміст  $H_2S$  та IGF-1 за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, залишається не з'ясованим. Зауважимо, що нормалізація кількості жирів в раціоні (СД) не викликала позитивних змін біохімічних показників крові та печінки у щурів з НАЖХП+ГГЦ (група порівняння). Застосування гіполіпідемічних засобів зменшувало проатерогенний патерн та масштабність інших біохімічних змін у щурів з НАЖХП+ГГЦ, і достовірна позитивна динаміка реєструвалась переважно на 28 добу лікування. Через 28 діб у щурів з НАЖХП+ГГЦ в групі симвастатину рівні ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ та ЛПДНЩ були нижчими на 31,4; 44,8; 59,7 та 44,7 %, а в групі  $\omega$ -3 ПНЖК - на 23,3; 48,6; 46,8 та 51,1 %, ніж в групі порівняння, що отримувала СД ( $p < 0,05$ ). Також, прийом  $\omega$ -3 ПНЖК підвищував рівень ХС ЛПВЩ (на 20,6 %,  $p < 0,05$ ).

За здатністю коригувати стеатоз печінки за ГГЦ, більш ефективним виявився препарат  $\omega$ -3 ПНЖК, який не лише зменшував акумуляцію нейтральних жирів та холестеролу, а сприяв нормалізації вмісту фосфоліпідів в гепатоцитах (рис. 2). Застосування симвастатину зменшувало рівень ЗХС (на 27,0 % відносно нелікованих щурів,  $p < 0,05$ ), але не викликало суттєвих змін рівня ТГ та фосфоліпідів в печінці на 28 добу. У щурів, що отримували  $\omega$ -3 ПНЖК, на 28 добу вміст ТГ був достовірно нижчим - на 42,5 %, ніж у нелікованих щурів, і на 34,9 %, ніж у щурів, що отримували симвастатин ( $p < 0,05$ ). Застосування препарату  $\omega$ -3 ПНЖК упродовж 28 діб спричиняло статистично значуще підвищення вмісту фосфоліпідів в печінці (на 19,2% відносно групи порівняння,  $p < 0,05$ ).

Прийом симвастатину не спричиняв вірогідних змін вмісту гідроксипроліну в печінці. Натомість при застосуванні  $\omega$ -3 ПНЖК цей показник був нижчим на 58,7 %, ніж в групі порівняння ( $p < 0,05$ ), й на 28,3 % нижчим, ніж у щурів, що отримували симвастатин ( $p < 0,05$ ).

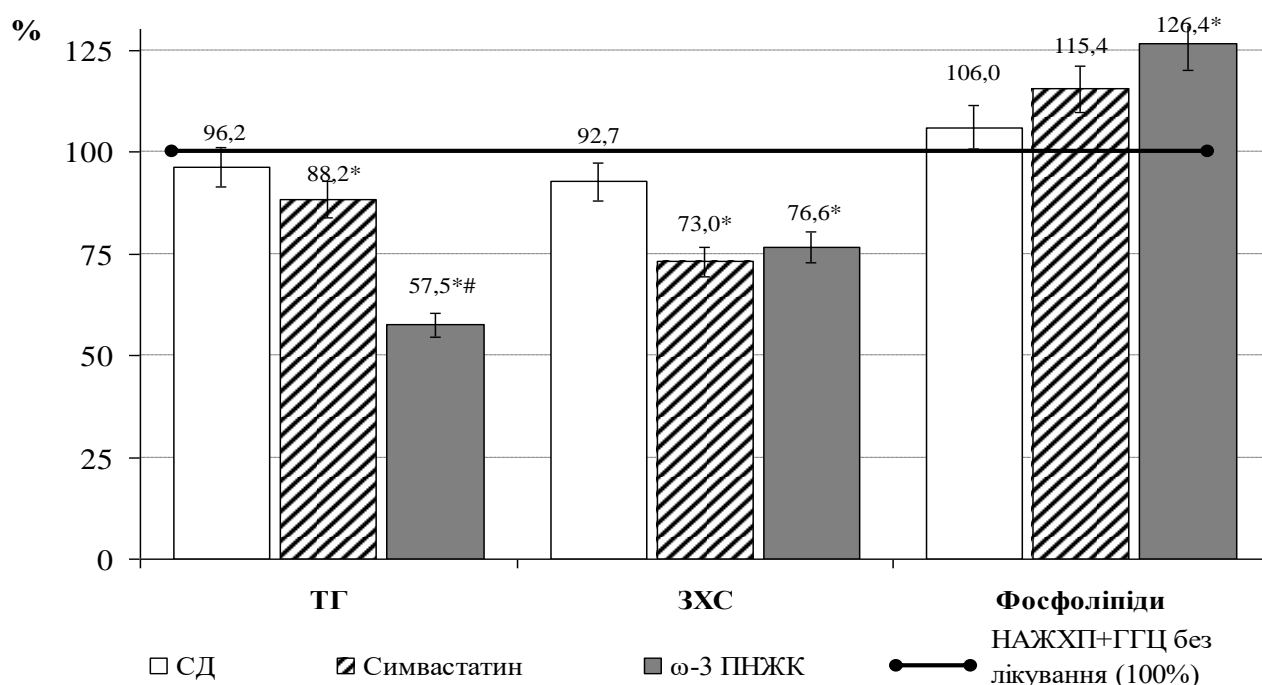


Рисунок 2 - Вплив гіполіпідемічних засобів на вміст ліпідів в печінці щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, станом на 28 добу (\* -  $p < 0,05$  відносно групи «НАЖХП+ГГЦ без лікування»; # -  $p < 0,05$  відносно групи «Симвастатин»; показники групи «НАЖХП+ГГЦ без лікування» прийняті за 100%).

Виявилось, що препарат  $\omega$ -3 ПНЖК істотно перевершував симвастатин за впливом на чинники «другого удару» у різні терміни досліджу. Так, застосування препарату  $\omega$ -3 ПНЖК вірогідно зменшувало ознаки оксидативного стресу – на 28 добу знижувалась активність NADPH-оксидази (на 30,5% відносно нелікованих щурів), вміст ТБК-активних продуктів та карбонільних груп протеїнів (на 44,3 та 22,3%), підвищувалась активність антиоксидантних ензимів тіоредоксинредуктази СОД (на 16,3 та 53,7 %). Натомість застосування симвастатину викликало на 28 добу помірне зниження активності NADPH-оксидази (на 20,7% відносно щурів без

лікування), тенденцію до зниження вмісту продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів і не впливало на активність антиоксидантних ензимів в гепатоцитах.

Застосування симвастатину не викликало вірогідних змін рівня гомоцистеїну в сироватці крові у щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни досліджу. Станом на 28 добу у щурів, лікованих препаратом  $\omega$ -3 ПНЖК, рівень гомоцистеїну був вірогідно нижчим на 29,6 та 27,6 % ніж у щурів групи порівняння та щурів, що отримували симвастатин ( $p < 0,05$ ). Застосування симвастатину не викликало вірогідних змін вмісту  $H_2S$  в печінці у щурів з НАЖХП+ГГЦ, в той же час, 28-добове застосування препарату  $\omega$ -3 ПНЖК викликало підвищення печінкового вмісту  $H_2S$  на 41,2 %. За здатністю коригувати вміст  $H_2S$  в печінці препарат  $\omega$ -3 ПНЖК вірогідно перевершував симвастатин (на 32,0 %,  $p < 0,05$ ).

Аналіз сироваткового рівня IGF-1 виявив найбільш суттєві відмінності в дії гіполіпідемічних засобів (рис. 3). На 14 та 28 добу прийом симвастатину викликав зниження рівня IGF-1 в сироватці крові (на 12,2 та 25,6 %), натомість прийом препарату  $\omega$ -3 ПНЖК викликав підвищення рівня IGF-1 (на 12,3 та 31,1 %) відносно нелікованих щурів. Рівень IGF-1 у щурів, лікованих препаратом  $\omega$ -3 ПНЖК, був достовірно вищим на 28,0 та 76,2 % ( $p < 0,05$ ), ніж у щурів, лікованих симвастатином.

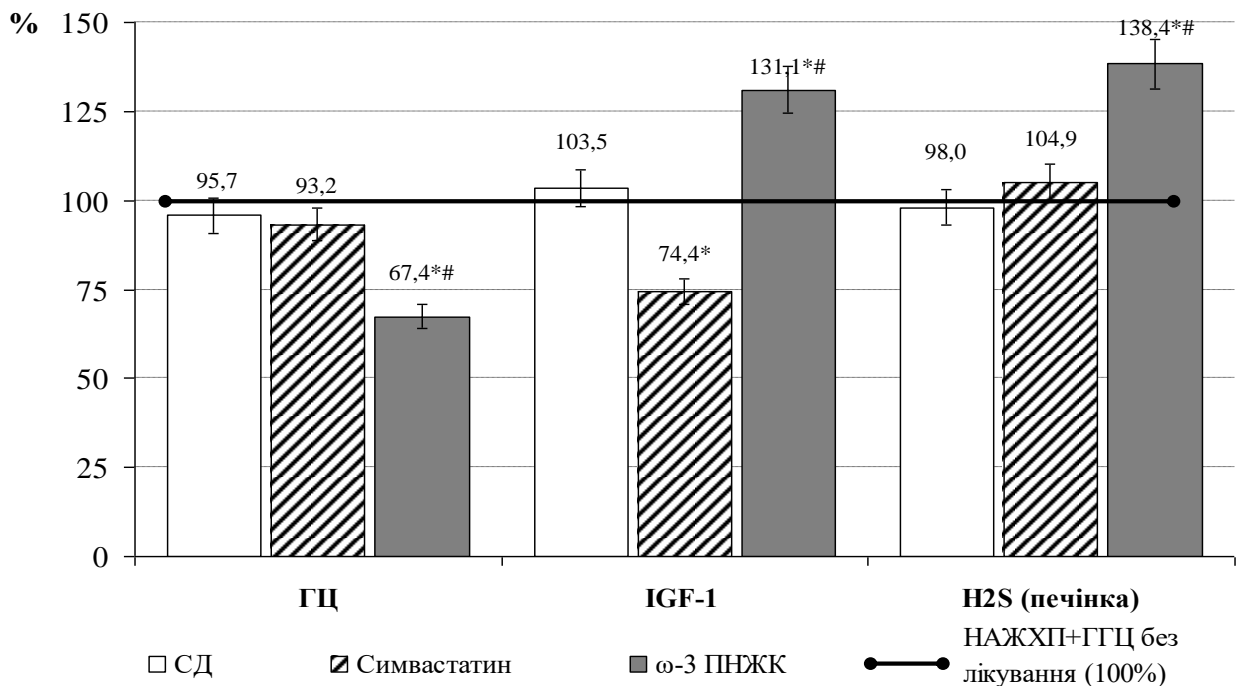


Рисунок 3 - Вплив гіполіпідемічних засобів на рівень гомоцистеїну та IGF-1 в сироватці крові, рівень  $H_2S$  в печінці у щурів із НАЖХП, асоційованої із ГГЦ станом на 28 добу (\* -  $p < 0,05$  відносно групи «НАЖХП+ГГЦ без лікування»; # -  $p < 0,05$  відносно групи «Симвастатин»; показники групи «НАЖХП+ГГЦ без лікування» прийняті за 100%).

Виникає питання, в якій мірі зміни біохімічних маркерів стеатозу та фіброзу узгоджуються з морфологічними змінами печінки за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. ГГЦ прискорювала розвиток стеатозу печінки та його трансформацію у

стеатогепатит у щурів за 60-добового застосування ВЖД. У щурів з НАЖХП+ГГЦ більшість гепатоцитів знаходилась в стані гідропічної та жирової дистрофії; в класичних печінкових часточках наявна гістіолімфоцитарна інфільтрація, переважно по ходу синусоїдів, в портальних зонах сполучна тканина інфільтрована лімфоцитами, гістіоцитами, плазматичними клітинами; наявні перипортальні, східчасті некрози, прояви лобулярного гепатиту, місткові некрози, повнокрів'я міжчасточкових вен в портальних зонах, синусоїдів та центральних вен. У щурів з НАЖХП були наявні осередки жирової дистрофії, некрозу гепатоцитів та лейкоцитарної інфільтрації, але вони були менш вираженим, ніж у щурів з НАЖХП+ГГЦ (рис. 4). При морфометричному аналізі ступінь стеатозу у щурів з НАЖХП+ГГЦ був достовірно вищим, ніж у щурів з ізольованою НАЖХП ( $1,60 \pm 0,24$  проти  $2,80 \pm 0,20$ ,  $p < 0,05$ ). Застосування симвастатину не забезпечило регресу морфологічних ознак стеатогепатиту. Станом на 28 добу в печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ, яких лікували симвастатином, виявлені гепатоцити з явищами гідропічної дистрофії цитоплазми, в проміжній зоні класичних печінкових часточок - гепатоцити з крупно- та мілкокрапельною жировою дистрофією цитоплазми, хоча ознаки некрозу та запалення були меншими, ніж у нелікованих тварин. У щурів з НАЖХП+ГГЦ, яким проводили корекцію  $\omega$ -3 ПНЖК, через 28 діб було виявлено зменшення кількості гепатоцитів із жировою дистрофією цитоплазми, а також площі некрозу гепатоцитів. Ступінь стеатозу у щурів, лікованих  $\omega$ -3 ПНЖК, був меншим, ніж у щурів, лікованих симвастатином ( $1,20 \pm 0,20$  проти  $2,20 \pm 0,20$ ,  $p < 0,05$ ).

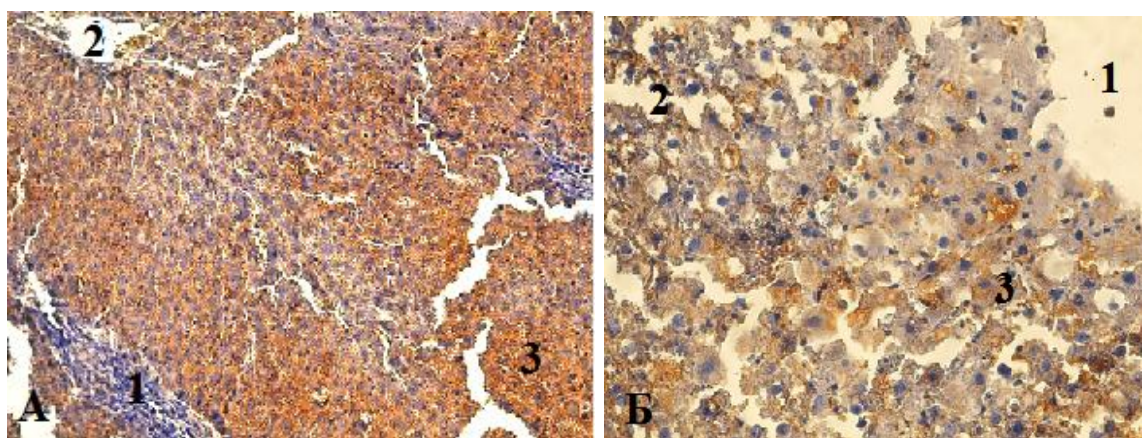


Рисунок 4 - Морфологічний стан тканин печінки у щурів з НАЖХП, асоційованою із ГГЦ. Судан Ш. Ок. x 10. Об. x 10. А) НАЖХП+ГГЦ (60 доба). Лейкоцитарна інфільтрація портальної зони (1); центральна вена (2); жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів (3). Б) НАЖХП+ГГЦ + омега-3 ПНЖК (28 доба). Центральна вена (1); синусоїди (2); . жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів (3).

Таким чином, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, препарат  $\omega$ -3 ПНЖК виявив більший лікувальний ефект, ніж симвастатин, за результатами біохімічного та морфологічного дослідження маркерів стеатозу та фіброзу печінки.



## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукового завдання - на основі встановлення нових біохімічних чинників прогресування експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією, патогенетично обґрунтовані підходи до її корекції за допомогою гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями.

1. При застосуванні високожирової дієти (54% ккал за рахунок жирів) у поєднанні з введенням тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг в/шл) упродовж 60 діб у щурів реєструється більш значне підвищення сироваткового рівня гомоцистеїну (на 55,0%); збільшення індексу маси тіла, сумарної маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння (на 8,9; 28,0 та 18,5 %), зниження відношення печінка / селезінка (на 14,1%); більш суттєво порушується функціональний стан печінки (вища активність АЛТ та ГГТ на 47,3 та 36,0 %, менший рівень альбуміну на 6,98 %), підвищується важкість дисліпідемії (гіперхолестеролемія, гіпертриацилгліцеролемія, індекс атерогенності є вищими на 36,8; 32,1; 23,4 %) порівняно з окремим застосуванням високожирової дієти ( $p < 0,05$ ). Рівень гомоцистеїну прямо корелює з індексом маси тіла, індексом ожиріння, маркерами цитолізу та дисліпідемії ( $r = 0,48-0,60$ ).

2. При поєднанні високожирової дієти з тіолактоновою ГГЦ достовірно посилюється стеатогенний та профіброгенний ефект: в печінці щурів виявляється вищий вміст триацилгліцеролів та холестеролу (на 69,3 та 12,2 %) та нижчий вміст фосфоліпідів (на 20,6 %); вищий вміст гідроксипроліну (на 30,3 %); збільшуються ознаки оксидативного стресу - вища активність NADPH-оксидази (на 36,0 %), вищий вміст ТБК-активних продуктів та карбонільованих протеїнів (на 58,0 та 42,0%), нижча активність супероксиддисмутази та тіоредоксинредуктази (на 36,3 та 19,9 %); в сироватці крові виявляється вищий рівень TNF $\alpha$  (на 69,8 %) порівняно із окремим застосуванням високожирової дієти ( $p < 0,05$ ). Між рівнем гомоцистеїну та маркерами стеатозу і фіброзу печінки виявляються значимі кореляційні зв'язки ( $r = 0,55-0,68$ ).

3. Застосування високожирової дієти та введення тіолактону гомоцистеїну викликає зниження вмісту H<sub>2</sub>S в печінці та зниження рівня IGF-1 в сироватці крові щурів, однак при поєднанні цих стеатогенних чинників депримує ефект істотно посилюється. За НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, вміст H<sub>2</sub>S та IGF-1 були достовірно нижчими на 22,6 та 32,2 %, ніж за НАЖХП. Рівні H<sub>2</sub>S та інсуліноподібного фактору росту-1 достовірно обернено корелюють з рівнем гомоцистеїну в сироватці крові ( $r = -0,73$  та  $-0,68$ ), маркерами оксидативного стресу, стеатозу та фіброзу ( $r = -0,40-0,65$ ), і прямо корелюють з активністю тіоредоксинредуктази та вмістом фосфоліпідів в печінці ( $r = 0,47-0,65$ ).

4. Введення гіполіпідемічних засобів зменшувало метаболічні порушення у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, і більший ефект виявлявся на 28 добу. Препарат  $\omega$ -3 ПНЖК (150 мг/кг в/шл) зменшував в печінці акумуляцію нейтральних жирів та холестеролу, підвищував вміст фосфоліпідів, зменшував оксидативний стрес (знижував активність NADPH-оксидази на 30,5 %, вміст ТБК-активних продуктів та карбонільованих протеїнів на 44,3 та 22,3 %); підвищував активність антиоксидантних ензимів тіоредоксинредуктази та супероксиддисмутази на 16,3 та 53,7%; знижував вміст гідроксипроліну на 58,7%.

Симвастатин (20 мг/кг в/шл) зменшував лише вміст холестеролу (на 27,0%) та активність NADPH-оксидази (на 20,7%) в печінці. У щурів, лікованих  $\omega$ -3 ПНЖК, в печінці станом на 28 добу вміст триацилгліцеролів та гідроксипроліну був вірогідно нижчим (на 34,9 та 28,3 %), ніж у щурів, лікованих симвастатином ( $p < 0,05$ ).

5. Гіполіпідемічні засоби відрізнялись за впливом на профіброгенні та антифіброгенні модулятори за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Препарат  $\omega$ -3 ПНЖК більш ефективно, ніж симвастатин, знижував рівень гомоцистеїну (на 13,3 та 27,6 %) та підвищував вміст  $H_2S$  в печінці (на 28,9 та 32,0 %) на 14 та 28 добу лікування. Рівень IGF-1 в сироватці крові на 14 та 28 добу підвищувався (на 12,3 та 31,1%) при застосуванні  $\omega$ -3 ПНЖК і знижувався (на 12,2 та 25,6%) при застосуванні симвастатину. Через 28 діб рівень IGF-1 у щурів, лікованих  $\omega$ -3 ПНЖК, був вищим на 76,2%, ніж у щурів, лікованих симвастатином ( $p < 0,001$ ).

6. У щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, реєструвались більш виражені морфологічні зміни печінки (гістіолейкоцитарна інфільтрація портальних зон, периваскулярна та інтралобулярна лімфоцитарна інфільтрація, гіперплазія зірчастих клітин, некроз та жирова дистрофія гепатоцитів, фіброз в портальних зонах та навколо центральних вен), ніж у щурів з НАЖХП. Застосування препарату  $\omega$ -3 ПНЖК (150 мг/кг) на 28 добу викликало зменшення гістологічних ознак жирової дистрофії та некрозапальних змін в печінці, в той час як застосування симвастатину (20 мг/кг) справляло незначний антистеатозний ефект.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Некрут Д.О., Яковлева О.О.** Про можливий зв'язок неалкогольної жирової хвороби печінки з гіпергомоцистеїнемією // Вісник морфології. 2015. Т. 21, №2. С. 542–547. (Особистий внесок – провела збір та аналіз літератури, узагальнення матеріалу та написання статті).

2. **Nekrut D.O.** Hyperhomocysteinemia as a factor contributing to the development of non-alcoholic fatty liver disease // Deutscher Wissenschaftsherold German Science Herald. 2016. №3. P. 34–38. (Особистий внесок – моделювання стеатозу печінки за гіпергомоцистеїнемії, біохімічні дослідження, статистичний аналіз результатів, написання статті).

3. **Некрут Д.О.** Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування неалкогольної жирової хвороби печінки у щурів // Вісник морфології. 2016. Т. 22, №1. С. 40–45. (Особистий внесок - розробка моделі неалкогольної жирової хвороби печінки за гіпергомоцистеїнемії, біохімічні дослідження, статистичний аналіз результатів, написання статті).

4. **Заїчко Н.В., Некрут Д.О.** Вплив гіполіпідемічних засобів на рівень модуляторів стеатогенезу та фіброгенезу у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою із гіпергомоцистеїнемією // ScienceRise. 2017. Т. 4, №12. С. 43–49. (Особистий внесок – моделювання та корекція неалкогольної жирової хвороби печінки у тварин, визначення рівня гідроген сульфїду в печінці, рівнів IGF-1 та  $TNF\alpha$  в сироватці крові, статистичний аналіз результатів, написання статті).

5. **Некрут Д.О.,** Заїчко Н.В, Король А.П. Вплив гіполіпідемічних засобів на морфологічні зміни в печінці щурів за неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією // *Biomedical and biosocial antropology*. 2017. №28. С. 66–71. (Особистий внесок – моделювання неалкогольної жирової хвороби печінки за гіпергомоцистеїнемії у щурів, введення гіполіпідемічних засобів, участь в аналізі результатів та підготовці статті).

6. **Некрут Д.О.,** Заїчко Н.В. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот та симвастатину на маркери цитолізу, дисліпідемії та оксидативного стресу у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією // *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Т. 2, №136. С. 123–129. (Особистий внесок – моделювання неалкогольної жирової хвороби печінки за гіпергомоцистеїнемії, біохімічні дослідження гомогенатів печінки, участь в аналізі результатів та підготовці статті).

7. **Некрут Д.О.,** Заїчко Н.В. Вплив поєднання високожирової дієти та тіолактонової гіпергомоцистеїнемії на масо-ростові параметри та біохімічні маркери стану печінки у щурів // *Буковинський медичний вісник*. 2017. Т. 21, №2. С. 36–41. (Особистий внесок – проведення експериментальних досліджень, обробка результатів та написання статті).

8. **Некрут Д.О.,** Заїчко Н.В., Струтинська О.Б. Рівень інсуліноподібного фактору росту-1 та гідрогенсульфіду у щурів із неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою із гіпергомоцистеїнемією // *Медична та клінічна хімія*. 2017. Т. 19, №1. С. 40–46. (Особистий внесок – моделювання неалкогольної жирової хвороби печінки у тварин, визначення рівня IGF-1 та TNF $\alpha$  в сироватці крові методом ELISA, рівня гідроген сульфід у печінці, статистичний аналіз результатів, написання статті).

9. **Некрут Д.О.,** Яковлева О.О., Луцюк М.Б., Заїчко Н.В., Остренюк Р.С. Експериментальна модель неалкогольної жирової хвороби печінки у щурів: пат. 109085 України: МПК G09B23/28, G01N33/50 № u2016 01482; заявл. 18.02.16; опубл. 10.08.16; Бюл. № 15. (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

10. **Некрут Д.О.,** Заїчко Н.В., Штатко О.І. Спосіб корекції неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією: пат. 119010 України: МПК A61K31/00, G09B23/28 № u2017 01693; заявл. 22.02.17; опубл. 11.09.17; Бюл. № 17. (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

11. **Некрут Д.О.** Неалкогольна жирова хвороба печінки – сучасний погляд на проблему // *Матеріали VIII науково – практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», 1-2 жовтня 2015 р., Тернопіль*. 2015. С. 65. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

12. **Некрут Д.О.,** Яковлева О.О. Роль гіпергомоцистеїнемії у формуванні неалкогольної жирової хвороби печінки // *Матеріали VIII Всеукраїнської науково–практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини», 9-10 листопада 2015 р. Вінниця*. 2015. С. 191–193. (Виконала експериментальні дослідження,

провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

13. **Nekrut D.A., Il'chenko A.V.** About the possible connection of nonalcoholic fatty liver disease with hyperhomocysteinemia // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародним участим «Актуальні питання клініко-лабораторної і функціональної діагностики с клінічної патологією», 10-11 листопада 2015 р., Самарканд, 2015. С. 177. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

14. **Ільченко О.В., Некрут Д.О.** Депротейнізація біологічних рідин як етап пробопідготовки // Матеріали ІХ Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення», 29-30 березня 2016 р., Вінниця. 2016. С. 13. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

15. **Некрут Д.О., Ільченко О.В.** Автоматизація розрахунку параметрів зворотної 4-параметричної логістичної кривої як градувального графіка при визначенні концентрації гомоцистеїну імуноферментним методом // Матеріали ІХ Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення», 29-30 березня 2016 р. Вінниця. 2016. С. 22. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

16. **Некрут Д.А.** Морфологические изменения ткани печени при неалкогольной жировой болезни печени на фоне гипергомоцистеинемии // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я 2016», 24-25 березня 2016 р., Запоріжжя. 2016. С. 14–16. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

17. **Некрут Д.А.** Применение методов автоматизации для определения концентрации гомоцистеина иммуноферментным методом // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я 2016», 24-25 березня 2016 р., Запоріжжя. 2016. С. 67 – 68. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

18. **Nekrut D.O.** Comparison of therapeutic effects of simvastatin and omega-3 fatty acids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (steatosis) with hyperhomocysteinemia available // Abstract book «Natural science readings», May 19-22, 2016. Bratislava, VSEMVS. 2016. P. 14–16. (Виконала експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

19. **Некрут Д.О.** Щодо можливості застосування симвастатину та омега-3 жирних кислот для лікування неалкогольної жирової хвороби печінки // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2016», 12-13 травня 2016 р., Запоріжжя. 2016. С. 239. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення

матеріалу, написання тез).

20. **Некрут Д.О.**, Ільченко О.В. Оптимізація наркотизації щурів тіопенталом натрію для подальшої декапітації // Матеріали Всеукраїнської науково–практичної конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні», 24 лютого 2016 р., Вінниця, ВМК. 2016. С. 68–70. (Виконала експериментальні дослідження, провела узагальнення матеріалу, написання тез).

21. Луцюк М.Б., Заїчко Н.В., Артемчук М.А., **Некрут Д.О.** Гомоцистеїнові парадокси // Матеріали ІХ науково–практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм», 29 - 30 вересня 2016 р., Тернопіль. 2016. С. 49–50. (Брала участь у зборі та аналізі літератури, узагальненні матеріалу, написанні тез).

22. **Некрут Д.О.** Значення гідроген сульфід у формуванні неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією // Матеріали Х Української наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодні», 27-29 березня 2017 р., Вінниця. 2017. С. 50. (Виконала експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

23. Луцюк М.Б., Артемчук М.А., **Некрут Д.О.** Участь у метаболізмі білків як одна із можливих фізіологічних функцій гомоцистеїну // Матеріали міжнародної науково–практичної конференції «Рівень ефективності та необхідність впливу медичної науки на розвиток медичної практики», 3-4 березня 2017 р., Київ. «Київський медичний науковий центр», 2017. С. 36–38. (Брала участь у зборі та аналізі літератури, узагальненні матеріалу, написанні тез).

24. **Некрут Д.О.** Роль інсуліноподібного фактору росту-1 у формуванні неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої із гіпергомоцистеїнемією // Матеріали XIV міжнародної науково–практичної конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017», 26-28 квітня 2017 р., Вінниця. 2017. С. 217–218. (Виконала експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

25. Луцюк М.Б., **Некрут Д.О.**, Артемчук М.А. До фізіології гомоцистеїну: участь в метаболізмі холіну, метильних груп та утворенні активних форм кисню // Матеріали міжнародної науково–практичної конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки і практики», 19-20 травня 2017 р., Одеса. ГО «Південна фундація медицини», 2017. С. 100–104. (Брала участь у зборі та аналізі літератури, узагальненні матеріалу, написанні тез).

26. **Некрут Д.О.**, Заїчко Н.В., Король А.П. Вплив омега-3 поліненасичених жирних кислот та симвастатину на морфологічні зміни тканини печінки у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією // Матеріали LX науково–практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», 14-15 червня 2017 р., Тернопіль. 2017. С. 335 – 337. (Виконала експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

### АНОТАЦІЯ

**Некрут Д.О. Роль інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфід у механізмах прогресування і корекції неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.32 - медична біохімія. - Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2017.

Дисертаційна робота присвячена встановленню ролі інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфід у механізмах прогресування експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією та обґрунтуванню патогенетичних підходів до її корекції гіполіпідемічними засобами з політропними властивостями.

З'ясовано, що при застосуванні високожирової дієти у поєднанні з введенням тіолактону гомоцистеїну підвищується сироватковий рівень гомоцистеїну, збільшується індекс маси тіла, суттєво порушується функціональний стан печінки, підвищується важкість дисліпідемії, посилюється стеатогенний та профіброгенний ефекти, збільшуються ознаки оксидативного стресу, а також знижується вміст  $H_2S$  в печінці та рівень IGF-1 в сироватці крові порівняно із окремим застосуванням високожирової дієти. Введення гіполіпідемічних засобів зменшувало метаболічні порушення у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ. Препарат  $\omega$ -3 ПНЖК більш ефективно, ніж симвастатин, знижував рівень гомоцистеїну та підвищував вміст  $H_2S$  в печінці. Рівень IGF-1 в сироватці крові підвищувався при застосуванні  $\omega$ -3 ПНЖК і знижувався при застосуванні симвастатину. Застосування препарату  $\omega$ -3 ПНЖК викликало зменшення гістологічних ознак жирової дистрофії та некрозапальних змін в печінці, в той час як застосування симвастатину справляло незначний антистеатозний ефект.

**Ключові слова:** неалкогольна жирова хвороба печінки, гомоцистеїн, гідроген сульфід, інсуліноподібний фактор росту-1, омега-3 поліненасичені жирні кислоти, симвастатин.

### АННОТАЦИЯ

**Некрут Д.А. Роль инсулиноподобного фактора роста-1 и гидроген сульфида в механизмах прогрессирования и коррекции неалкогольной жировой болезни печени, ассоциированной с гипергомоцистеинемией. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.32 - медицинская биохимия. - Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2017.

Диссертация посвящена установлению роли инсулиноподобного фактора роста-1 и гидроген сульфида в механизмах прогрессирования экспериментальной неалкогольной жировой болезни печени, ассоциированной с гипергомоцистеинемией, и обоснованию патогенетических подходов к ее коррекции гиполлипидемическими средствами с политропными свойствами.

Установлено, что при применении высокожировой диеты в сочетании с введением тиолактона гомоцистеина повышается сывороточный уровень

гомоцистеина, увеличивается индекс массы тела, существенно нарушается функциональное состояние печени, повышается тяжесть дислипидемии, усиливается стеатогенный и профиброгенный эффекты, увеличиваются признаки оксидативного стресса, а также снижается содержание  $H_2S$  в печени и уровень IGF-1 в сыворотке крови по сравнению с изолированным применением высокожировой диеты. Введение гиполипидемических средств уменьшало метаболические нарушения у крыс с НАЖХП, ассоциированной с ГГЦ. Препарат  $\omega$ -3 ПНЖК более эффективно, чем симвастатин, снижал уровень гомоцистеина и повышал содержание  $H_2S$  в печени. Уровень IGF-1 в сыворотке крови повышался при применении  $\omega$ -3 ПНЖК и снижался при применении симвастатина. Применение препарата  $\omega$ -3 ПНЖК вызвало уменьшение гистологических признаков жировой дистрофии и некровоспалительных изменений в печени, в то время как применение симвастатина оказывало незначительный антистеатозный эффект.

**Ключевые слова:** неалкогольная жировая болезнь печени, гомоцистеин, гидроден сульфид, инсулиноподобный фактор роста-1, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, симвастатин.

## SUMMARY

**Nekrut D.O. The role of insulin-like growth factor-1 and hydrogen sulfide in the mechanisms of progression and correction of non-alcoholic fatty liver disease, associated with hyperhomocysteinemia. - Manuscript.**

The dissertation for scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 14.01.32 – medical biochemistry. - National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2017.

The dissertation is devoted to the establishment of the role of insulin-like growth factor-1 and hydrogen sulfide in the mechanisms of progression of non-alcoholic fatty liver disease, associated with hyperhomocysteinemia and substantiation of its correction approaches by hypolipidemic means with polytropic properties.

The research was carried out on 156 white laboratory male rats, with a weight range from 210 to 280 g. All animals were divided into 2 main series of experiments (n = 10-14 in each group). On certain stages of the experiment, animals were decapitated under thiopental anesthesia. 24 hours after substances administration, the animals were euthanized, blood and liver were taken for further research (determination of rats mass-growth parameters, biochemical examination of blood serum and liver homogenates, morphological examination of liver tissues).

It was proved that the use of a high-fat diet in combination with the administration of thiolactone homocysteine during 60 days significantly increased serum homocysteine level, body mass index, but weight ratio liver/spleen decreased; the functional state of the liver was significantly impaired, the severity of dyslipidemia was increased in comparison with the use of a high-fat diet only.

When high-fat diet is combined with thiolactone HHC, the steatogenic and profibrogenic effect was significantly increased; higher hydroxyproline content, signs of oxidative stress increased; higher levels of  $TNF\alpha$  were found in blood serum compared to the use of a high-fat diet only. The use of a high-fat diet together with the administration of homocysteine thiolactone led to  $H_2S$  content in liver and IGF-1 in serum levels

decrease, but the combination of these steatogenic factors substantially reinforced the depriving effect.

Administration of hypolipidemic agents reduced metabolic disorders in rats with NAFLD associated with HHC. The  $\omega$ -3 PUFA drug reduced the accumulation of neutral fats and cholesterol, oxidative stress, hydroxyproline content in liver and increased phospholipid content and the activity of antioxidant. Simvastatin reduced only the content of cholesterol and the activity of NADPH-oxidase in liver. In rats treated by  $\omega$ -3 PUFA, on 28<sup>th</sup> day in liver the content of triacylglycerols and hydroxyproline was significantly lower than that in simvastatin-treated rats. The  $\omega$ -3 PUFA drug is more effectively lowered the level of homocysteine and increased the H<sub>2</sub>S content in liver, than simvastatin. The level of IGF-1 in serum was increased with the use of  $\omega$ -3 PUFA and decreased with the use of simvastatin.

In rats with NAFLD associated with HHC, more significant morphological changes in liver (necrosis and fatty degeneration of hepatocytes etc.) were recorded than in rats with NAFLD. The use of  $\omega$ -3 PUFA resulted in decrease of fatty dystrophy histological signs and necroinflammatory changes in liver, while the use of simvastatin produced insignificant antisteatosis effect.

The studies deepened the current understanding of the role of IGF-1 and H<sub>2</sub>S in biochemical mechanisms of NAFLD, associated with HHC progression and outlined new biochemical markers for antisteatosis and anti-fibrosis pharmacotherapy effectiveness.

**Key words:** non-alcoholic fatty liver disease, homocysteine, hydrogen sulfide, insulin-like growth factor-1, omega-3 polyunsaturated fatty acids, simvastatin.

### ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЛТ	- аланінамінотрансфераза
в/шл	- внутрішньошлунково
ВЖД	- високожирова дієта
ГГЦ	- гіпергомоцистеїнемія
ГГТ	- $\gamma$ -глутамілтрансфераза
ЗХС	- загальний холестерол
ІМТ	- індекс маси тіла
ЛПВЩ	- ліпопротеїни високої щільності
ЛПДНЩ	- ліпопротеїни дуже низької щільності
ЛПНЩ	- ліпопротеїни низької щільності
НАЖХП	- неалкогольна жирова хвороба печінки
$\omega$ -3 ПНЖК	- омега-3 поліненасичені жирні кислоти
П/С	- відношення печінка / селезінка
СД	- стандартна дієта
СОД	- супероксиддисмутаза
ТГ	- триацилгліцероли
ТБК	- тіобарбітурова кислота
IGF-1	- інсуліноподібний фактор росту-1
NADPH	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
TNF $\alpha$	- туморонекротичний фактор альфа







---

Підписано до друку 29.11.2017 р. Замовл. № 689.  
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,9 Друк офсетний.  
Наклад 100 примірників.

---

Вінниця. Друкарня ВНМУ імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

