

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМ. М. І. ПИРОГОВА

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

НЕКРУТ ДАР'Я ОЛЕКСАНДРІВНА

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

ДИСЕРТАЦІЯ

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

14.01.32 – медична біохімія

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають
посилання на відповідне джерело

_____ Некрут Д.О.

Науковий керівник – **Заїчко Наталія Валентинівна**, доктор медичних наук,
професор

Вінниця – 2017

АНОТАЦІЯ

Некрут Д.О. Роль інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфїду в механїзмах прогресування і корекції неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктор філософії) за спеціальністю 14.01.32 «Медична біохімія» (22 - охорона здоров'я). – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2017.

Дисертація присвячена вивченню ролі інсуліноподібного фактору росту - 1 та гідроген сульфїду в механїзмах прогресування неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої із гіпергомоцистеїнемією та обґрунтуванню підходів для її корекції гіполіпідемічними засобами з політропними властивостями.

Проведено комплексне експериментальне дослідження біохімічних механїзмів прогресування неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП), асоційованої з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), та встановлені нові модулятори печінкового стеатогенезу та фіброгенезу. Досліди проведені на 156 білих лабораторних щурах-самцях масою 210-280 г. Протоколи дослідження схвалені комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 5 від 01 червня 2017 року) і не суперечать біоетичним нормам експериментів на тваринах.

Показано, що при застосуванні високожирової дієти (54 % ккал за рахунок жирів) у поєднанні з введенням тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг внутрішньошлунково 1 раз на добу) через 60 діб у щурів значно підвищується сироватковий рівень гомоцистеїну (на 55,0 %); збільшується індекс маси тіла, сумарна маса внутрішнього жиру та індекс ожиріння (на 9,0-18,5 %), знижується відношення печінка / селезінка; більш суттєво порушується

функціональний стан печінки, підвищується важкість дисліпідемії порівняно із окремим застосуванням високожирової дієти ($p < 0,05$). При поєднанні високожирової дієти з тіолактоною ГГЦ достовірно посилюється стеатогенний та профіброгенний ефект: в печінці 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; в крові виявляється вищий вміст TNF α порівняно із окремим застосуванням високожирової дієти ($p < 0,05$).

Вперше встановлено, що за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, формується значний дефіцит гідроген сульфїду (H_2S) в печінці та знижується рівень інсуліноподібного фактору росту-1 (IGF-1) в сироватці крові. Застосування високожирової дієти та введення тіолактону гомоцистеїну викликає у щурів зниження вмісту H_2S в печінці та рівня IGF-1 в сироватці крові, однак при поєднанні цих стеатогенних чинників депримує ефект істотно посилюється. Так, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, вміст H_2S та IGF-1 були достовірно нижчими на 22,6 та 32,2 %, ніж за НАЖХП ($p < 0,05$). Рівні H_2S та IGF-1 достовірно обернено корелюють з рівнем гомоцистеїну в сироватці крові ($r = -0,73$ та $-0,68$, $p < 0,05$), маркерами оксидативного стресу, стеатозу та фіброзу ($r = -0,40$ - $-0,65$, $p < 0,05$), і прямо корелюють з активністю тіоредоксинредуктази та вмістом фосфоліпідів в печінці ($r = 0,47$ - $0,65$, $p < 0,05$).

Показано, що застосування гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями - симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот (ω -3 ПНЖК) зменшувало метаболічні порушення у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ. Препарат ω -3 ПНЖК (150 мг/кг маси внутрішньошлунково 1 раз на добу) зменшував акумуляцію нейтральних жирів та холестеролу, підвищував вміст фосфоліпідів, зменшував оксидативний стрес (знижував активність NADPH-оксидази, вміст ТБК-

активних продуктів, карбонільованих протеїнів), підвищував активність антиоксидантних ензимів (тіоредоксинредуктази, супероксиддисмутази), знижував вміст гідроксипроліну в печінці. Симвастатин (20 мг/кг маси внутрішньошлунково 1 раз на добу) зменшував лише вміст холестеролу та активність NADPH-оксидази в печінці. У щурів, лікованих ω -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.

Вперше встановлені особливості впливу гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями - симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на рівень антифіброзних медіаторів (H_2S , IGF-1) за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Препарат ω -3 ПНЖК більш ефективно, ніж симвастатин, знижував рівень гомоцистеїну та підвищував вміст H_2S в печінці. Рівень IGF-1 в сироватці крові підвищувався (на 12,3 та 31,1 %) при застосуванні ω -3 ПНЖК і знижувався (на 12,2 та 25,6 %) при застосуванні симвастатину на 14 та 28 добу. Через 28 діб рівень IGF-1 у щурів, лікованих ω -3 ПНЖК, був вищим на 76,2 % ($p < 0,001$), ніж у щурів, лікованих симвастатином.

Засвідчено, що препарат ω -3 ПНЖК перевершує симвастатин за антистеатозною та антифіброзною активністю за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, при гістологічному дослідженні. 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 ω -3 ПНЖК викликало зменшення гістологічних ознак жирової дистрофії та некрозапальних змін в печінці, в той час як застосування симвастатину справляло незначний антистеатозний ефект.

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 (Епадол-Нео) для лікування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ (патент України №119010), та встановлено недостатню ефективність симвастатину за цих умов. Розроблена нова модель НАЖХП з прискороною трансформацією стеатозу у стеатогепатит (патент № 109085), що може бути використана для оцінки ефективності антистеатозних засобів у перспективі.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, гомоцистеїн, гідроген сульфід, інсуліноподібний фактор росту-1, омега-3 поліненасичені жирні кислоти, 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. Qualification scientific work as a manuscript.

The dissertation for scientific degree of the candidate of medical sciences, speciality 14.01.32 «Medical biochemistry» (22 Healthcare). - National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2017.

The dissertation is devoted to the determination 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.

A complex experimental study of biochemical mechanisms of progressing of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) associated with hyperhomocysteinemia (HHC) was carried out and new modulators of liver steatogenesis and fibrogenesis were identified. The research was carried out on 156 white laboratory male rats, with

a weight of 210-280 g. Research protocols were approved by the Committee on Bioethics of National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya (protocol No. 5 of June 1, 2017) and do not contradict bioethical norms of experiments on animals.

It has been shown that the application of a high-fat diet (54 % of kcal for fats) in combination with the administration of thiolactone homocysteine (100 mg/kg intragastrically once a day) during 60 days in rats significantly increases serum homocysteine level (by 55,0%), increases (by 9,0-18,5 %) body mass index, the total mass of internal fat and obesity index, but liver/spleen weight ratio decreases; the functional state of the liver is significantly disturbed, the severity of dyslipidemia is increased in comparison with the separate application of a high-fat diet ($p < 0,05$).

When a high-fat diet is combined with thiolactone HHC, the steatogenic and profibrogenic effect is significantly increased: the liver exhibits higher levels of triacylglycerols and cholesterol (by 69,3 and 12,2 %) and lower phospholipid content (by 20,6 %); higher hydroxyproline content; signs of oxidative stress increase - higher activity of NADPH oxidase (by 36,0 %), higher content of TBA-active products and carbonylated proteins (by 58,0 and 42,0 %), lower activity of superoxide dismutase and thioredoxine reductase; higher levels of TNF α are found in blood serum compared to a separate application of a high-fat diet ($p < 0,05$).

For the first time, it was established that under NAFLD associated with HHC significant deficiency of hydrogen sulphide (H_2S) in liver is formed and the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in serum is reduced. The use of a high-fat diet or the administration of homocysteine thiolactone leads to a decrease of H_2S content in liver and decrease of IGF-1 in serum levels, but the combination of these steatogenic factors substantially reinforces the depriving effect. Thus, under NAFLD associated with HHC, H_2S and IGF-1 content was significantly lower by 22,6 and 32,2% than under NAFLD ($p < 0,05$). The levels of H_2S and IGF-1 are reliably reverse correlated with serum homocysteine levels ($r = -0,73$ and $-0,68$, $p < 0,05$), with markers of oxidative stress, steatosis and fibrosis ($r = -0,40-0,65$,

$p < 0,05$), and directly correlated with the activity of thioredoxine reductase and the content of phospholipids in liver ($r = 0,47-0,65$, $p < 0,05$).

It was shown administration of hypolipidemic agents - simvastatin and omega-3 polyunsaturated fatty acids preparation (ω -3 PUFA) reduced metabolic disorders in rats with NAFLD associated with HHC. The ω -3 PUFA preparation (100 mg/kg weight intragastrically once a day) reduced the accumulation of neutral fats and cholesterol, increased phospholipid content, reduced oxidative stress (decreased NADPH-oxidase activity, content of TBA-active products and carbonylated proteins), increased the activity of antioxidant enzymes (thioredoxine reductase, superoxide dismutase), reduced the hydroxyproline content in liver. Simvastatin (20 mg/kg weight intragastrically once a day) reduced only the content of cholesterol and the activity of NADPH-oxidase in liver. In rats treated with ω -3 PUFA, in liver, on 28th day the content of triacylglycerols and hydroxyproline was significantly lower (by 34,9 and 28,3 %) than that of simvastatin-treated rats.

The characteristics of the influence of hypolipidemic agents with the polytropic properties - simvastatin and ω -3 PUFA preparation - on the level of antifibrosis mediators (H_2S , IGF-1) under NAFLD associated with HHC were first established. The ω -3 PUFA preparation is more effectively lowered the level of homocysteine and increased H_2S content in liver, than simvastatin. The level of IGF-1 in serum on 14th or 28th day was elevated (by 12,3-31,1 %) with the use of ω -3 PUFA and decreased (by 12,2-25,6 %) with the use of simvastatin. After 28 days, the level of IGF-1 in rats treated with ω -3 PUFAs was higher by 76,2 % ($p < 0,001$) than in rats treated with simvastatin.

It was shown that in histological study ω -3 PUFA preparation is superior to simvastatin in antisteatosis and antifibrosis activity under NAFLD associated with HHC. In rats with NAFLD associated with HHC, more pronounced morphological changes in liver (histioleukocytic infiltration of portal areas, perivascular and intralobular lymphocytic infiltration, hyperplasia of hepatic stellate cells, necrosis and fatty degeneration of hepatocytes, fibrosis in portal areas and around central veins) were recorded in rats than in rats with NAFLD. The use of the ω -3 PUFA

resulted in a decrease in histological signs of fatty dystrophy and necroinflammatory changes in liver, while the use of simvastatin produced insignificant antisteatosis effect.

The studies deepen the current understanding of the role of IGF-1 and H₂S in biochemical mechanisms of NAFLD associated with HHC progression and outline new biochemical markers for antisteatosis and anti-fibrosis pharmacotherapy effectiveness. The perspective for the use of omega-3 polyunsaturated fatty acids (Epadol-Neo) for treatment of NAFLD associated with HHC has been substantiated (patent No119010), and the weak efficacy of simvastatin in these conditions has been proved. A new model of NAFLD with accelerated transformation of steatosis into steatohepatitis (patent No. 109085) was developed, which can be used to evaluate the effectiveness of antisteatosis agents in future.

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

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 сульфід у печінці, рівнів IGF-1 та TNF α 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 α 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 міжнародною участю «Актуальные вопросы клинико-лабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией», 10-11 ноября 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 IX 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 градууювального графіка при визначенні концентрації гомоцистеїну імуноферментним методом // Матеріали IX 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 сьогодення», 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 сульфїду у формуванні неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією // Матеріали Х Української наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення», 27-29 березня 2017 р., Вінниця. 2017. С. 50. (Виконала експериментальні дослідження, провела 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 ХІV 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, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	18
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ ТА ЛІКУВАННЯ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ (огляд літератури)	26
1.1 Епідеміологія, патогенетичні чинники та біохімічні механізми неалкогольної жирової хвороби печінки	27
1.2 Роль гіпергомоцистеїнемії в механізмах ушкодження печінки	39
1.3 Сучасні підходи до лікування неалкогольної жирової хвороби печінки	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
2.1 Експериментальні моделі, дієти та тварини	50
2.2 Біохімічні методи дослідження	56
2.3 Морфологічні методи дослідження	59
2.4 Методи статистичної обробки цифрового матеріалу	60
РОЗДІЛ 3 БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПРОГРЕСУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЇ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ	61
3.1 Рівень гомоцистеїну, масо-ростові параметри та біохімічні маркери функціонального стану печінки у щурів за умов високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією	62
3.2 Біохімічні маркери стеатозу та фіброзу печінки у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією	70
3.3 Рівень гідроген сульфїду та інсуліноподібного фактору росту-1 у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією;	76

	зв'язок з маркерами стеатозу та фіброзу печінки	
РОЗДІЛ 4	ВПЛИВ СИМВАСТАТИНУ ТА ОМЕГА-3 ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ НА ЧИННИКИ ПРОГРЕСУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЇ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ	85
4.1	Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на рівень гомоцистеїну та показники функціонального стану печінки у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією	86
4.2	Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на біохімічні маркери стеатозу та фіброзу печінки у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією	97
4.3	Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на рівень гомоцистеїну, інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфїду у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією	105
РОЗДІЛ 5	ВПЛИВ СИМВАСТАТИНУ ТА ОМЕГА-3 ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ НА МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ З НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЮ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ	112
5.1	Морфологічна характеристика експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією	113
5.2	Вплив симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот на морфологічний стан печінки у щурів з неалкогольною жировою	121

хворобою печінки, асоційованою гіпергомоцистеїнемією	3
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	132
ВИСНОВКИ	156
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	159
ДОДАТКИ	191

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АЛТ	- аланінамінотрансфераза
в/шл	- внутрішньошлунково
ВЖД	- високожирова дієта
ЖК (ВЖК)	- жирні кислоти (вільні жирні кислоти)
ГГЦ	- гіпергомоцистеїнемія
ГМГ-КоА	- 3-гідрокси-3-метилглутарилкоензим А
ГГТ	- гама-глутамілтрансфераза
ЗХС	- загальний холестерол
ІМТ	- індекс маси тіла
КоА	- коензим А
ЛПВЩ	- ліпопротеїни високої щільності
ЛПДНЩ	- ліпопротеїни дуже низької щільності
ЛПНЩ	- ліпопротеїни низької щільності
НАЖХП	- неалкогольна жирова хвороба печінки
НАСГ	- неалкогольний стеатогепатит
ω-3 ПНЖК	- омега-3 поліненасичені жирні кислоти
П/С	- відношення печінка / селезінка
ПОЛ	- перекисне окиснення ліпідів
СД	- стандартна дієта
СОД	- супероксиддисмутаза
ТГ	- триацилгліцероли
ТБК	- тіобарбітурова кислота
ТБК-АП	- ТБК-активні продукти перекисного окиснення ліпідів
ЦД-2	- цукровий діабет 2 типу
IGF-1	- інсуліноподібний фактор росту-1
DTNB	- 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоат)
NADPH	- нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
TNF α	- туморонекротичний фактор альфа

ВСТУП

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 [1, 4, 78, 226, 245]. НАЖХП відноситься до провідних чинників розвитку цирозу печінки, гепатоцелюлярної карциноми, печінкової недостатності та портальної гіпертензії [1, 4, 12, 21, 36, 291, 299]. З НАЖХП пов'язано біля 80 % випадків криптогенних цирозів та біля 6 % трансплантацій печінки [56].

Патогенез НАЖХП пояснюють теорією «двох ударів» [126], що поступово трансформувалась в теорію «множинних ударів» [226, 289, 305]. «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 [226, 289, 305].

НАЖХП часто поєднується з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), яку розглядають як чинник акселерації печінкового стеатогенезу та фіброгенезу [12, 21, 62, 106]. Механізми гепатотоксичної дії ГГЦ включають оксидативний стрес, гіпометилування, порушення продукції вазоактивних медіаторів, мітохондріальну дисфункцію [60, 216, 297]. 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 [70, 192, 195, 208]. Також в печінці синтезується газотрансмітер гідроген сульфід (H_2S), який проявляє властивості антиоксиданта, цитопротектора, вазодилататора, бере участь в регуляції аутофагії [184]. 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 [1, 80, 235, 291], 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 сульфідом 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 сульфідом 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 печінки (показники ліпідного обміну, оксидативного стресу, антиоксидантної системи, рівень гідроксипроліну в печінці, рівень туморнекротичного фактору α в сироватці крові) у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ.
3. Вивчити вміст гідроген сульфід у 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 сульфід у 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 α , вміст гідроген сульфід у 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 α), 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, γ -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 патентами України на корисну модель (№ 109085; №119010).

Результати дослідження впроваджені в наукову роботу та навчальний процес кафедр біологічної та загальної хімії, клінічної фармації та клінічної фармакології, 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).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація викладена на 198 сторінках (основий обсяг становить 140 сторінок) і включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів дослідження, власні дослідження, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних літературних джерел, що включає 316 найменувань (82 кирилицею, 234 латиницею). Робота ілюстрована 21 рисунком та 29 таблицями.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ ТА ЛІКУВАННЯ НЕАЛКОГОЛЬНОЇ
ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ
(огляд літератури)

Неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) є хронічним захворюванням, що об'єднує широкий спектр морфологічних змін у печінці (стеатоз, стеатогепатит, стеатофіброз, цироз) і є вагомим чинником зростання смертності населення [1, 12, 21, 80, 291]. Раніше НАЖХП вважали доброякісним станом з тривалим безсимптомним перебігом, який при модифікації способу життя має зворотній розвиток. За сучасними уявленнями, НАЖХП є одним із провідних чинників цирозу печінки, гепатоцелюлярної карциноми, печінкової недостатності та портальної гіпертензії [1, 36, 121, 243, 291, 299]. НАЖХП розглядають як печінкову маніфестацію метаболічного синдрому, цукрового діабету 2 типу (ЦД-2), фактор ризику атеросклерозу та кардіоваскулярних ускладнень [4, 12, 21, 36].

Захворювання розпочинається з аберантного накопичення триацилгліцеролів (ТГ) у печінці, зазвичай має тривалий латентний період і за умов простого стеатозу не викликає підвищення смертності. Однак, в частині випадків печінковий стеатоз асоціюється з швидким розвитком запальної відповіді, фіброзу, цирозу та раку печінки. Механізми акселерації прозапальних та профіброгенних змін у печінці при НАЖХП є дискутабельними, а можливості терапевтичної корекції залишаються обмеженими. В експериментальних та клінічних дослідженнях був показаний зв'язок між стеатозом печінки, стеатогепатитом та підвищенням рівня гомоцистеїну в сироватці крові [9, 12, 21, 62, 106, 120]. Однак, особливості патогенезу та лікування НАЖХП при поєднанні з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ) потребують окремого вивчення.

Завданням даного розділу роботи було узагальнення сучасної інформації про патогенез НАЖХП, роль ГГЦ як потенційного чинника акселерації печінкового стеато- та фіброгенезу та напрямки сучасної фармакотерапії жирової дистрофії печінки.

1.1 Епідеміологія, патогенетичні чинники та біохімічні механізми неалкогольної жирової хвороби печінки

НАЖХП є одним із поширених хронічних захворювань печінки, що охоплює від 20 до 40 % загальної популяції і зустрічається майже в усіх вікових групах населення [36, 78, 245, 226]. В останні роки спостерігається неухильне збільшення частки НАЖХП серед захворювань печінки. Так, в США питома вага НАЖХП до 1994 року складала біля 47 %, у 1994 - 2004 р.р. зросла до 63 %, а за 2004-2008 р.р. перевищила 75 % [116, 245]. Стрімке зростання поширеності НАЖХП здебільшого пояснюється високою розповсюдженістю ожиріння, ЦД-2 та метаболічного синдрому [5, 226].

За різними даними, частота НАЖХП у хворих на ЦД-2 може коливатись від 28 до 70 %, у осіб з ожирінням - від 60 до 95 %, у осіб з гіперліпідемією – від 27 до 92 % [135, 155, 204, 226]. Частота неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ) в загальній популяції складає 3 %, а серед осіб з ожирінням – перевищує 25 % [246]. В країнах Азії поширеність НАЖХП є майже аналогічною - біля 15-30 % в загальній популяції та понад 50 % серед пацієнтів з ЦД-2 та метаболічним синдромом [314]. За результатами гістологічної оцінки потенційних донорів печінки частота НАЖХП коливається від 20 % до 51 % [101, 244, 264], а за даними сонографічного дослідження - від 17 до 46 % [311]. НАЖХП вважається однією з найчастіших причин підвищення рівня трансаміназ в сироватці крові [16, 82], 80 % криптогенних цирозів печінки та біля 6 % трансплантацій печінки [56]. НАСГ прогресує у цироз у 21-26 % осіб упродовж 8,2 років [299]. За даними мета-аналізу, НАЖХП істотно підвищує ризик загальної смертності населення (OR 1,57, 95 % CI: 1,18-2,10) [217].

У XXI сторіччі метаболічні порушення, асоційовані з НАЖХП, набули характеру епідемії - біля 366 млн людей хворіє на ЦД, біля 1,6 млрд людей мають надлишкову масу тіла, біля 400 млн людей страждає на ожиріння [56, 109]. За даними National Health and Nutrition Examination Surveys (2009-2010 р.р.) в США поширеність ожиріння становить 35,5 % серед чоловіків та 35,8 % серед жінок [246], а морбідне ожиріння зареєстровано у 2,8 % чоловіків та 6,9 % жінок [111]. За прогнозами IDF (International Diabetes Federation) до 2030 року кількість хворих на ЦД зросте до 552 млн [109]. За прогнозами ВООЗ кількість осіб з ожирінням у 2025 році може подвоїтись [56].

В Україні (м. Дніпро) серед дорослого населення надлишкова маса тіла виявляється у 39,18 % осіб, ожиріння I-III ступеня – у 31,56 % осіб, а морбідне ожиріння - у 1,4 % осіб [10, 75]. В Україні реєструється висока поширеність ЦД: у 2013 році за даними IDF зафіксовано 1,04 млн хворих, за даними Центру медичної статистики МОЗ України - 1 380 047 хворих або 3041,6 випадків на 100 тис. населення [79], а за період 2003-2013 р.р. кількість осіб з ЦД зросла майже вдвічі (на 55,1 %) [79]. Поширеність НАЖХП в Україні залишається не визначеною, що частково пояснюється несвоєчасним зверненням пацієнтів за медичною допомогою внаслідок малосимптомного перебігу захворювання, що відмічено у відповідних нормативних документах МОЗ України [1, 80].

Відповідно до рекомендацій AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases), ACG (American College of Gastroenterology), AGA (American Gastroenterological Association), Української гастроентерологічної асоціації та вітчизняних нормативних документів (наказ МОЗ України від 06.11.2014 р. №826) нозологічна форма НАЖХП включає стеатоз печінки, НАСГ, фіброз та цироз печінки (табл.1.1) [1, 80, 291]. Доведеними факторами ризику НАЖХП є ожиріння, ЦД-2, дисліпідемія, метаболічний синдром [291]. Чинниками вторинної НАЖХП можуть виступати синдром полікістозних яєчників, гіпотирозидизм, гіпопітуїтаризм, гіпогонадизм, панкреато-дуоденальна резекція, синдром апное уві сні [291]. До факторів ризику НАСГ відноситься старший вік, чоловіча стать, іспанська етнічна приналежність [291, 243].

НАЖХП та пов'язані терміни (AASLD, ACG, AGA, 2012 [291])

Термін	Характеристика
Неалкогольна жирова хвороба печінки	Включає повний спектр змін в печінці від стеатозу печінки до стеатогепатиту та цирозу печінки у осіб, що не вживають алкоголь
Неалкогольний стеатоз печінки	Стеатоз печінки без ознак гепатоцелюлярного пошкодження (балонних гепатоцитів) та фіброзу. Ризик прогресування у цироз мінімальний
Неалкогольний стеатогепатит	Стеатоз печінки із ознаками перипортального та лобулярного запалення, пошкодженням гепатоцитів (балонні клітини) та проявами фіброзу. Високий ризик прогресування у цироз
Цироз печінки	Цироз печінки із гістологічно підтвердженим стеатозом та /або стеатогепатитом

Патогенез НАЖХП є складним багатofакторним процесом, тригерним механізмом якого виступає інсулінорезистентність. Залучаючись до патологічного процесу, печінка стає не тільки органом-мішенню, а й сама посилює метаболічні порушення. Традиційно розвиток НАЖХП пояснюють теорією «двох ударів» (two-hit) [36], яка була запропонована Day С.Р., James О.Ф. у 1998 році [126]. Однак, накопичення інформації щодо молекулярних механізмів НАЖХП викликало трансформацію теорії «двох ударів» в теорію «множинних ударів» (multiple hits) [226, 289, 305].

«Першим ударом» вважають формування стеатозу печінки через надмірну акумуляцію ТГ в гепатоцитах, «другим ударом» - індукцію в гепатоцитах різних видів клітинного стресу - оксидативного та нітрозативного стресу, стресу ендоплазматичного ретикулума, апоптозу, цитокінового дисбалансу, які викликають некрозапальні зміни гепатоцитів та індукують фіброгенез; «третьім ударом» – включення генетичних та епігенетичних механізмів, які детермінують прогресування печінкового стеато- та фіброгенезу та дисрегуляцію репаративної регенерації печінки [226, 289, 305].

Пусковим механізмом «першого удару» є жирова інфільтрація печінки, зумовлена надмірним поступленням вільних жирних кислот (ВЖК) в

гепатоцити та включенням їх у шляхи ліпогенезу. Вказують на три основних причини первинного накопичення жиру в печінці: надмірне надходження ТГ та ВЖК в гепатоцити (високий вміст жирів в раціоні, посилення ліполізу при інсулінорезистентності та голодуванні); дисбаланс ліпогенезу та ліполізу (активація синтезу ВЖК та холестеролу *de novo* при надлишку ацетил-КоА та вуглеводів; пригнічення β -окиснення ВЖК у мітохондріях); зниження експорту ТГ та ВЖД (порушення синтезу ЛПДНЩ, дефекти аполіпопротеїну В, мутації гену АРОВ, дефіцит ліпотропних факторів) [226, 289].

Слід відзначити, що практично всі події у гепатоцитах у тій, чи іншій мірі асоціюються з порушенням інсулінового сигналіngu та феноменом інсулінорезистентності. Підвищення рівня ВЖК в системному кровотоці пригнічує поглинання та утилізацію глюкози скелетними м'язами за механізмом «глюкозо-жирнокислотного» цикла Рендла, що зумовлює підвищення рівнів глюкози та інсуліну в крові [77]. Надалі відбувається активація ліполізу (в першу чергу у вісцеральних адипоцитах) з вивільненням ВЖК у портальний кровотік та поглинанням їх гепатоцитами. В гепатоцитах створюється надлишок інтермедіатів ВЖК - довголанцюгових ацил-КоА та діацилгліцеролів, які пригнічують проксимальні рівні інсулінового сигналіngu через активацію протеїнкінази $S\epsilon$, фосфорилювання тирозинових та серинових залишків інсулінових рецепторів та їх субстратів) [226, 289]. В нормі інсулін пригнічує глюконеогенез у гепатоцитах, посилює ліпогенез та пригнічує синтез ЛПДНЩ, але в умовах печінкової інсулінорезистентності інтенсивність глюконеогенезу зростає, посилюється гіперглікемія та гіперінсулінемія, підвищується синтез ЛПДНЩ та зростає рівень ТГ в крові. В результаті «першого удару» ТГ та естерифікований холестерол акумулюються у вигляді ліпідних крапель в цитозолі гепатоцитів [257, 299] і на початкових етапах, коли кількість жиру не перевищує фізіологічно допустимі 5 %, стеатоз є зворотнім [299]. Однак, якщо дія стеатогенних чинників триває, подальше накопичення жиру в гепатоцитах викликає руйнацію клітинних мембран,

позаклітинне утворення жирових кіст та некрозапальну реакцію із трансформацією стеатозу у НАСГ. Це забезпечують чинники «другого удару».

«Другий удар» включає: 1) оксидативний стрес, зумовлений інтенсифікацією окиснення жирних кислот у мітохондріях та пероксисомах, пероксидацією кардіоліпіну та інших мітохондріальних фосфоліпідів, формуванням активних форм кисню та розвитком мітохондріальної дисфункції; 2) підвищення вмісту прозапальних цитокінів ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 та ін.) та профібrogenних медіаторів ($\text{TGF}\beta$ та ін.); 3) стрес ендоплазматичного ретикулума (ЕПР-стрес); 4) бактеріальну ендотоксинемію [167, 226, 240, 289].

Інтенсивне β -окиснення ЖК у мітохондріях підвищує трафік електронів по дихальному ланцюгу на O_2 , що супроводжується посиленою генерацією супероксид-аніону (O_2^-), гідроген пероксиду (H_2O_2), гідроксильного радикалу ($\bullet\text{OH}$). Активні форми кисню вступають у взаємодію з поліненасиченими жирними кислотами (ПНЖК) мембранних фосфоліпідів та ініціюють каскад пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) з утворенням реакційно-здатних та токсичних ліпідних дериватів (гідропероксидів, альдегідів, кетонів, малонового діальдедіду, 4-гідроксиноненалу) [273]. Активні форми кисню та реакційно-здатні інтермедіати ПОЛ блокують транспорт електронів по дихальному ланцюгу та порушують енергетичний гомеостаз, взаємодіють з нітроген монооксидом з утворенням пероксинітриду (ONOO^-), викликають модифікацію чисельних протеїнів, нуклеїнових кислот та інших біомолекул. Також довголанцюгові ВЖК окиснюються мікросомальною системою (за участі цитохромів P4502E1 та P4504A) та у пероксисомах, що супряжено з генерацією активних форм кисню [273].

Функціональний стан мітохондрій є визначальним у патофізіології НАЖХП, оскільки синтез мультиензимів, які забезпечують окиснення жирних кислот та окисне фосфорилювання, контролюється не лише геномною, а й мітохондріальною ДНК (mtDNA). Встановлено, що високожирова дієта викликає достовірне підвищення вмісту печінкової mtDNA, підвищення експресії мРНК цитохромоксидази (субодиниці COX4I1, яка безпосередньо

переносить електрони на O_2), а також експресії апоптоз-зв'язаних (Bax, Bcl2, каспази 3) та фіброз-зв'язаних генів (Colla1 - ген $\alpha 1$ ланцюгів колагену I типу), що корелює з підвищенням вмісту ТГ в гепатоцитах щурів [171]. В досліджах *in vivo* було показано, що поліморфізм генів mtDNA детермінує формування мітохондріальної дисфункції, зниження синтезу АТФ та посилення генерації активних форм кисню в гепатоцитах, що викликає прогресування стеатозу [225]. В умовах оксидативного стресу змінюється функціональний стан чисельних редокс-залежних протеїнів, які контролюють стеатогенез: ядерних рецепторів (SREBP, PPAR), АМР-залежних протеїнкіназ, субстратів інсулінових рецепторів (IRSs), ензимів метаболізму ліпідів (синтази жирних кислот, ГМГ-КоА-редуктази, гліцерол-3-фосфат-ацитрансферази та ін.) [273].

За умов інсулінорезистентності в гепатоцитах відбувається інтенсивний біосинтез та акумуляція вільного (неестерифікованого) холестеролу, що виснажує пул відновленого глутатіону (GSH) та підвищує чутливість клітин до дії $TNF\alpha$ та Fas-залежного апоптозу [224]. З іншого боку, зниження відношення GSH/GSSG викликає інгібування ГМГ-КоА-редуктази та обмежує синтез холестеролу *de novo* [273].

Здатність насичених ЖК та ліпідних інтермедіатів виступати активаторами прозапального цитокінового каскаду та індукторами апоптозу позначається як «ліпотоксичність». В ряді досліджень *in vitro* було доведено, що насичені ЖК (пальмітат та стеарат) викликають активацію каспаз, підвищують продукцію церамідів *de novo*, викликають фрагментацію ДНК та апоптоз в гепатоцитах [167, 261, 262]. Цей ефект суттєво зменшується в присутності ненасичених ЖК (олеїнату, лінолеату) [261]. Накопичення синтезованих *de novo* насичених ЖК в гепатоцитах частково може обмежуватись за допомогою стеароїл-КоА-десатурази 1 (1 (SCD1), яка забезпечує синтез олеїл-КоА [173]. Однак, в умовах високожирової дієти активність даного ензиму пригнічується, що спрямовує насичені ЖК у шлях β -окиснення і посилює ліпотоксичність.

Насичені ЖК здатні викликати стрес ендоплазматичного ретикулула (ЕПР), але молекулярні механізми остаточно не з'ясовані [167]. Припускається, що посилення трафіку пальмітату та стеарату в мембранні структури ЕПР, в яких в нормі переважають ненасичені ЖК, може суттєво порушувати його гомеостаз [261]. Так само, як і акумуляція високої кількості холестеролу в мікросомальних мембранах спричиняє порушення функціонального стану ЕПР [115]. Нещодавно була показана здатність пальмітату підвищувати експресію транскрипційного фактору СНОР (специфічного маркера ЕПР-стресу), який пригнічує експресію важливих регуляторів ліпідного та вуглеводного гомеостазу - лептину та інсуліноподібного фактору росту-1 (IGF-1) [238]. Стрес ЕПР супроводжується порушенням посттрансляційної модифікації та фолдінгу чисельних протеїнів, що викликає загибель гепатоцитів.

Прозапальну стимуляцію в гепатоцитах викликає ентерогенна ендотоксинемія, пов'язана з надмірною проліферацією мікрофлори та підвищенням проникності кишкової стінки [298]. Доведено, що насичені ВЖК викликають в ентероцитах оксидативний стрес та ЕПР-стрес, пошкоджують мукоциліарний бар'єр тонкої кишки [172]. Високожирова дієта може підвищувати рівень ліпополісахариду в плазмі крові в 2-3 рази [218]. Крім того, насичені ВЖК активують тол-подібні рецептори (переважно TLR4), які експресуються в різних типах клітин (гепатоцитах, моноцитах, клітинах Купфера, зірчастих клітинах) і забезпечують трансдукцію прозапального сигналу за участі нуклеарного фактору каппа В (NF- κ B) [170]. Лігандами TLR4 виступають бактеріальні ендотоксини та насичені ВЖК, що пояснює зв'язок мікробіоти з пошкодженням гепатоцитів та розвитком НАСГ [170].

Бактеріальні ліпополісахариди є потужними активаторами клітин Купфера (резидентних макрофагів) та зірчастих клітин, які стають джерелом прозапальних цитокінів (TNF α , інтелейкіну-1 β , інтерлейкіну-6 та ін.) та ростових факторів (фактору росту фібробластів, трансформуючого фактору росту β) [203, 289]. Клітини Купфера також виконують метаболічні функції,

регулюють окиснення ВЖК, підвищують відкладання ліпідів у гепатоцитах, підвищують інсулінорезистентність [299]. Прозапальні цитокіни та бактеріальні ліпополісахариди стимулюють трафік лейкоцитарних клітин (нейтрофілів, натуральних кілерів, Т-лімфоцитів) у печінку; індукують в гепатоцитах синтез гострофазових протеїнів, особливо С-реактивного протеїну, який інгібує інсуліновий сигналінг та блокує здатність інсуліну пригнічувати печінкову продукцію глюкози [123]. Активовані зірчасті клітини, що в нормі депонують ретиноїди, трансформуються у міофібробласти і розпочинають продукцію колагену та інших компонентів екстрацелюлярного матриксу. Тривала прозапальна стимуляція викликає некроз гепатоцитів, печінковий фіброгенез та прогресування НАСГ. Додатковими чинниками, що можуть поглиблювати інсулінорезистентність, посилювати відкладання жиру в гепатоцитах, підвищувати інтестинальний дисбіоз, індукувати оксидативний стрес та промотувати розвиток НАЖХП є аліментарне перевантаження фруктозою [300] та дефіцит холіну [117, 298].

НАЖХП може виникати не лише у осіб з ожирінням, а й у осіб з нормальною і навіть недостатньою масою тіла (біля 29 %) [226, 243]. Простий стеатоз не завжди трансформується в НАСГ, а останній трансформується у цироз печінки приблизно у 20-26 % випадків [299]. Схильність до прогресування НАЖХП розглядається з точки зору дії чинників «**третього удару**», які детермінують накопичення жиру в гепатоцитах та порушення репаративного потенціалу печінки на рівні генетичного та епігенетичного контролю. Сьогодні це питання залишається найбільш дискутабельним. Зокрема, генетично-детерміновану схильність до стеатозу печінки пов'язують з поліморфізмом гену *PNPLA3* (patatine-like phospholipase 3) rs738409, який залучений до регуляції гідролізу ТГ в адипоцитах та контролю енергетичного гомеостазу [226]. Такий зв'язок був засвідчений в ряді популяційних досліджень [164, 166], але в дослідженні GWAS (Genome-Wide Association Study) він не знайшов підтвердження [165]. Серед потенційних генетичних чинників прогресування НАЖХП розглядають поліморфізм генів колагену

(*COL13A1* rs1227756) [165], мікросомального тригліцеридного трансферного протеїну, фосфатидилетаноламінтрансферази, супероксиддисмутази 2, ендотоксинового рецептору CD14, фактору некрозу пухлини-альфа (TNF α), трансформуючого фактору росту-бета (TGF- β), протеїнів ренін-ангіотензинової системи [5, 78, 163, 299]. Поліморфізм генів лептину, адипонектину та їх рецепторів, які детермінують розвиток дисадипокінемії (гіпоадипонектинемії, гіперлептинемії, лептинової резистентності) також інтегровані в патогенез НАЖХП [113, 271, 163, 298, 299]. Адипонектин виступає інсуліновим сенситайзером, стимулює утилізацію глюкози та ЖК, проявляє протизапальні властивості [94, 308]. Лептину в нормі притаманний ліпостатичний ефект, однак ожиріння та прозапальна стимуляція викликають розвиток лептинової резистентності і підвищення рівня лептину в крові корелює з важкістю НАЖХП [228, 270].

Контроль за процесами ліпогенезу та фіброгенезу може порушуватись на рівні транскрипційних факторів та їх коактиваторів (SREBP-1, ChREBP, LXR, FXR, PPAR), які контролюють гліколітичні та ліпогенні гени, регулюють аптейк, трафік та відкладання ліпідів у гепатоцитах [257]. При зростанні рівня ВЖК в крові, гіперінсулінемії, зниженні відношення фосфатидилхолін / фосфатидилетаноламін в гепатоцитах підвищується експресія та активність SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein), який активує експресію генів ліпогенезу, гіпертрофію адипоцитів та вивільнення ВЖК [17, 84, 205]. Інгібітори SREBP-1 пригнічують акумуляцію жиру, підвищують експресію ензимів ліполізу, зменшують ознаки стеатозу [151].

Гіперглікемія стимулює активацію ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein), що підвищує активність піруваткінази гепатоцитів, посилює утворення субстратів для синтезу ВЖК та ТГ з вуглеводів (ацетил-КоА та фосфотріоз) [17, 95, 257]. Підвищення експресії ChREBP в гепатоцитах викликає формування стеатозу печінки навіть за відсутності інсулінорезистентності [296].

Ядерні рецептори LXR (Liver X receptor) та FXR (Farnesoid X receptor) в комплексі з ретиноїдними рецепторами (RXR) регулюють метаболізм холестеролу, ЖК та глюкози. LXR регулюють експорт холестеролу з клітин, виступають ко-активаторами експресії ChREBP та SREBP-1 і стимулюють підвищення рівня ТГ у плазмі крові та печінці. Активаторами LXR/RXR виступають деривати холестеролу (22(R)-гідроксихолестерол та інші окистероли) [153, 257]. FXR активуються жовчними кислотами і за механізмом негативного зворотного зв'язку пригнічують біосинтез останніх [153, 257]. FXR інгібують ChREBP і пригнічують гліколіз та ліпогенез [198].

PPAR (α , β/δ , γ) - рецептори, що активують проліферацію пероксисом, ядерні транскрипційні фактори, експресуються у печінці і регулюють метаболізм ліпідів, вуглеводів та жовчних кислот, контролюють запальний процес та регенерацію гепатоцитів [68, 257]. Зокрема, PPAR α активують гени ензимів мітохондріального окиснення ЖК та інгібують їх транспорт у гепатоцити. Біологічними лігандами PPAR є ПНЖК (олеїнова, лінолева, ліноленова кислоти), ейкозаноїди та меншою мірою насичені ЖК. Порушення активності PPAR асоціюється із активацією стеатогенезу, фіброгенезу, запалення та гіперпластичними змінами у печінці.

Контроль за накопиченням жиру в гепатоцитах також реалізується через аутофагію - шлях лізосомальної утилізації пошкоджених органел, протеїнів, надлишку внутрішньоклітинних ліпідів (ліпофагія), спрямований на підтримку енергетичного гомеостазу та виживання клітини в умовах стресу. Дисрегуляцію аутофагії розглядають як один із механізмів прогресування стеатозу та НАСГ [99, 108]. В досліджах *in vivo* показано, що пригнічення аутофагії посилює акумуляцію ліпідів в гепатоцитах, індукує апоптоз та прогресування НАСГ [256]. Нещодавно встановлено, що до регуляції аутофагії залучений гідроген сульфід (H_2S) – біологічно-активний метаболіт сірковмісних амінокислот, що активно синтезується у гепатоцитах [184]. H_2S стимулює аутофагію та знижує вміст ТГ в печінці через активацію сигнального шляху AMPK-mTOR [152, 184]. В нещодавно оприлюднених

оглядових роботах [181, 185] узагальнена сучасна інформація щодо причетності H_2S до механізмів регуляції фіброгенезу в різних органах і тканинах (печінці, нирках, легенях, серці) [55, 255].

До ключових регуляторів, які визначають репараційний потенціал печінки і, очевидно, протидіють «множинному удару» при НАЖХП, відноситься родина інсуліноподібного фактору росту-1 (IGF-1). IGF-1 є поліпептидом з 70 амінокислот, який секретується гепатоцитами (до 75 % циркулюючого в крові IGF-1) у відповідь на стимуляцію гормоном росту та інсуліном, проявляє ендокринну, паракринну та аутокринну дію [192, 195, 208]. IGF-1 може зв'язуватись з власними рецепторами (IGF-1R) та інсуліновими рецепторами під контролем IGFBPs - родини протеїнів, що зв'язують IGF-1 [192, 195, 208]. IGF-1 залучений до регуляції багатьох фізіологічних процесів таких як тканинний ріст, диференціація та проліферація клітин, ліпідний метаболізм, проявляє протизапальний, антиоксидантний, гепато- та нейропротективний ефекти, запобігає мітохондріальній дисфункції та підвищує продукцію АТФ [192].

В окремих експериментальних дослідженнях засвідчена здатність IGF-1 стимулювати репаративну регенерацію гепатоцитів у різних вікових групах тварин з хронічним алкогольним ураженням печінки, впливати на фази клітинного циклу, активувати перехід ядер гепатоцитів із фази спокою до мітозу, забезпечувати проліферацію клітин печінки [70]. Зниження біохімічних та морфологічних ознак алкогольного ураження печінки під впливом гепатопротекторів (L-аргініну L-глутамату, кверцетину) супроводжувалось збільшенням вмісту IGF-1 в сироватці крові щурів [69]. В досліджах *in vitro* показано, що формування стеатозу, індукованого введенням олеїнової кислоти в культуру гепатоцитів людини, асоціюється зі зниженням експресії IGF-1 [154]. Індукція аутофагії через сигнальну систему TLR-7 спричиняє вивільнення IGF-1 з гепатоцитів та попереджає прогресію НАЖХП [306].

У пацієнтів з НАЖХП зниження вмісту IGF-1 в плазмі крові корелює з клініко-морфологічним ступенем стеатозу печінки та НАСГ, маркерами

інсулінорезистентності, дисліпідемії та фіброзу (вмістом гіалуронової кислоти в сироватці крові) [105, 189, 212, 234, 251, 254]. У дітей та підлітків з ожирінням зниження рівня IGF-1 в крові корелює зі зниженням вмісту ЛПВЩ [211]. Зниження вмісту IGF-1 виявилось предиктором балонування гепатоцитів та підвищення ступеня важкості НАЖХП (за результатами біопсії) у дітей з ожирінням [193]. Значне зниження вмісту IGF-1 в сироватці крові відмічалось у пацієнтів з НАЖХП з гістологічно підтвердженим середнім та важким ступенем фіброзу печінки [265]. Однак, питання щодо ролі IGF-1 в молекулярних механізмах НАЖХП остаточно не з'ясовано.

Підсумовуючи вищенаведену інформацію, патогенез НАЖХП згідно теорії «множинних ударів» можна представити у вигляді схеми (рис. 1.1).



Рис. 1.1 Схема патогенезу НАЖХП за теорією «множинного удару» (узагальнено та доповнено за [226, 289, 305]).

1.2 Роль гіпергомоцистеїнемії в механізмах ушкодження печінки

Печінка відіграє ключову роль в метаболізмі сірковмісних амінокислот – метіоніну та цистеїну, які використовуються в чисельних біохімічних та фізіологічних процесах. Метаболізм метіоніну майже в усіх клітинах супряжений з утворенням проміжного інтермедіату – сульфгідрильної амінокислоти гомоцистеїну, що має високу реакційну здатність (табл. 1.2). Спочатку метіонін за участі метіонінаденозилтрансферази та АТФ перетворюється в активну форму - S-аденозилметіонін [219, 250], який в гепатоцитах найбільш інтенсивно споживається у трьох метилтрансферазних реакціях - для синтезу фосфатидилхоліну за участі фосфатидилетаноламін-N-метилтрансферази, креатину за участі гуанідинацетат-N-метилтрансферази, саркозину за участі гліцин-N-метилтрансферази [220, 297]. При цьому S-аденозилметіонін конвертується у S-аденозилгомоцистеїн, який за участі S-аденозилгомоцистеїнгідролази (КФ 3.3.1.1) розщеплюється до аденозину та гомоцистеїну. В гепатоцитах гомоцистеїн трансформується у метіонін шляхом реметилування (біля 2 %) або у цистеїн шляхом транссульфурування (80 %), частково експортується у плазму крові (5-10 %) і виділяється з сечею (до 0,1%) [11, 34, 58, 72, 73, 297].

Реметилування гомоцистеїну у метіонін відбувається у двох реакціях: 1) за участі кобаламін-залежної метіонінсинтетази та донору метильної групи - 5-метилтетрагідрофолату (метил-ТГФК); 2) за участі бетаїнгомоцистеїн-S-метилтрансферази та донору метильної групи бетаїну (триметилгліцину). Шлях реметилування поповнює пул метіоніну та S-аденозилметіоніну, але здатний утилізувати невеликі «фізіологічні» кількості гомоцистеїну, утворення яких пов'язано з метилтрансферазними реакціям. Реметилування гомоцистеїну супряжено з роботою фолатного циклу та метилентетрагідрофолатредуктази – флавінового ензиму, який поповнює в гепатоцитах пул метил-ТГФК шляхом відновлення 5,10-метилен-ТГФК. Остання утворюється при перенесенні одновуглецевого фрагменту з серину на ТГФК за участі ПАЛФ та гліцин-

гідроксиметилтрансферази. Шлях транссульфування забезпечує перетворення гомоцистеїну у цистеїн: спочатку за участі ПАЛФ-залежної цистатіонін- β -синтази гомоцистеїн конденсується з серином (або цистеїном) з утворенням цистатіоніну, який за участі ПАЛФ-залежної цистатіонін- γ -ліази розщеплюється до цистеїну, аміаку та 2-оксибутирату. Цей шлях активно функціонує за високих концентрацій гомоцистеїну в гепатоцитах, поповнює пул цистеїну та слугує джерелом малої сигнальної молекули H_2S [186, 297].

Таблиця 1.2

Схеми реакцій утворення та утилізації гомоцистеїну в гепатоцитах

Схема реакції	Ензим, кофактор
Утворення гомоцистеїну	
Метіонін + АТФ \rightarrow S-Аденозилметіонін + $\Phi\Phi_n + \Phi_n$	Метіонінаденозилтрансфераза (КФ 2.5.1.6)
S-Аденозилметіонін + субстрати \rightarrow S-Аденозилгомоцистеїн + метильовані продукти	Метилтрансферази (КФ 2.1.1.17; КФ 2.1.1.2; КФ 2.1.1.20 та інші)
S-Аденозилгомоцистеїн + $H_2O \rightarrow$ Гомоцистеїн + Аденозин	S-аденозилгомоцистеїн- гідролаза (КФ 3.3.1.1)
Утилізація гомоцистеїну шляхом реметилування	
Гомоцистеїн + Метил-ТГФК \rightarrow Метіонін + ТГФК	Метіонінсинтетаза (КФ 2.1.1.13), метилкобаламін
Гомоцистеїн + Бетаїн \rightarrow Метіонін + Диметилгліцин	Бетаїнгомоцистеїн-S-метил- трансфераза (КФ 2.1.1.5)
Утилізація гомоцистеїну шляхом транссульфування	
Гомоцистеїн + Серин \rightarrow Цистатіонін + H_2O	Цистатіонін- β -синтаза (КФ 4.2.1.22), ПАЛФ
Гомоцистеїн + Цистеїн \rightarrow Цистатіонін + H_2S	
Цистатіонін + $H_2O \rightarrow$ Цистеїн + Аміак + 2-оксибутират	Цистатіонін- γ -ліаза (КФ 4.4.1.1), ПАЛФ
Цистеїн + $H_2O \rightarrow$ Піруват + $NH_3 + H_2S$	
Конверсія гомоцистеїну у тіолактон гомоцистеїну	
Гомоцистеїн \rightarrow Тіолактон гомоцистеїну	Метіоніл-ТРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.10), АТФ
Тіолактон гомоцистеїну \rightarrow Гомоцистеїн	Параоксоназа 1 (КФ 3.1.8.1)

Примітка. Узагальнено згідно [11, 34, 58, 72, 73, 186, 219, 220, 250, 297].

Розподіл гомоцистеїну між шляхами утилізації регулюється концентрацією S-аденозилметіоніну, який є алостеричним активатором ключового ензиму шляху транссульфурування - цистатіонін- β -синтази та інгібітором ензимів шляху реметилювання - метилентетрагідрофолатредуктази та бетаїногмоцистеїн-S-метилтрансферази [11, 34, 73, 207, 297].

Гомоцистеїн може перетворюватись у високотоксичний тіолактон, що відбувається при помилковому з'єднанні метіоніл-tРНК-синтетази з гомоцистеїном та запобігає його включенню у поліпептидний ланцюг під час трансляції [34, 196, 239]. Тіолактон гомоцистеїну конвертується у гомоцистеїн за допомогою мітохондріальної параоксонази 1 яка активно синтезується у гепатоцитах і входить до складу ЛПВЩ [34, 196, 239, 297].

Порушення утилізації гомоцистеїну в гепатоцитах зумовлює збільшення його експорту в кров та розвиток гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ). Основними причинами ГГЦ вважають порушення структури та активності ензимів шляхів метилювання, транссульфурування та фолатного циклу, дефіцит вітамінів (кобаламіну, фолату, піридоксину, рибофлавіну) та їх коферментних форм, аліментарний надлишок метіоніну [11, 34, 58, 72, 73, 297]. До накопичення гомоцистеїну в клітинах також веде дефіцит параоксонази 1 [239].

Гомоцистеїн та його тіолактон за високих концентрацій проявляють цитотоксичний ефект, який реалізується через три основних молекулярних механізми: 1) індукцію оксидативного стресу (внаслідок здатності гомоцистеїну до аутооксидації в присутності іонів перехідних металів); 2) ковалентну модифікацію протеїнів шляхом S- та N-гомоцистеїнування; 3) гіпометилювання (внаслідок накопичення потужного інгібітору метилтрансфераз S-аденозилгомоцистеїну) [11, 34, 297]. У такий спосіб ГГЦ може модифікувати перебіг чисельних біохімічних процесів в гепатоцитах на різних рівнях: 1) на рівні регуляції експресії генів (через вплив на ДНК, фактори транскрипції, ядерні рецептори); 2) на рівні протеому (порушення хімічної структури протеїнів, протеїн-протеїнових взаємодій, редокс-

регуляції); 3) на рівні метаболу (зниження пулу S-аденозилметіоніну, креатину, холіну, саркозину, малих сигнальних молекул – H_2S , NO та ін.).

В ряді експериментальних досліджень засвідчено, що ГГЦ є незалежним чинником, який порушує морфофункціональний стан печінки. Так, тривале введення тіолактону гомоцистеїну ініціювало печінковий фіброгенез у здорових щурів, а також прискорювало формування фіброзу та цирозу печінки у щурів, яким вводили гепатотоксикант CCl_4 [24, 60, 124, 216]. Введення щурам 1 % розчину метіоніну протягом 3-х тижнів викликало розвиток ГГЦ, інтенсифікацію енергетичного обміну (підвищення активності лактатдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази, H^+ -АТФази) та зростання рівня карбонільованих протеїнів у мітохондріях гепатоцитів [216]. У щурів з дефектом цистатіон- β -синтази (КФ 4.2.1.22), що супроводжується ГГЦ, виявили дисрегуляцію генів, залучених в обмін ліпідів, стеатоз та фіброз печінки [124]. За фолат-дефіцитної ГГЦ порушується спектр ЖК, які входять до складу ДНК-зв'язних ліпідів, що асоціюється зі зниженням стабільності геномної ДНК [24].

З іншого боку, стеатоз печінки може викликати розвиток ГГЦ, хоча молекулярні механізми неповністю з'ясовані. Існує думка, що пусковим механізмом розвитку ГГЦ при НАЖХП є зниження пулу S-аденозилметіоніну [22, 23]. Рівень гомоцистеїну та S-аденозилгомоцистеїну в гепатоцитах може зростати як в умовах аліментарного дефіциту метіоніну, так і при його надлишку [140]. Слід відзначити, що контроль відношення S-аденозилметіонін / S-аденозилгомоцистеїн є важливим механізмом регуляції багатьох біохімічних процесів. Тому зниження вмісту S-аденозилметіоніну в гепатоцитах викликає широкий спектр біохімічних порушень: зниження вмісту фосфоліпідів, активності Na^+K^+ -АТФази, погіршення плинності мембран, інгібування синтезу сірковмісних антиоксидантів та субстратів реакції кон'югації (глутатіону, таурину, сульфатів), зниження репаративного потенціалу [21, 36]. Донори метильних груп (бетаїн, S-аденозилметіонін) виявляють антистеатогенний та антифіброзний ефект, який асоціюється зі

зниженням рівня гомоцистеїну в крові, відновленням активності ензимів метилювання та транссульфування в печінці у щурів з CCl₄-індукованим цирозом [61]. Введення донору метильних груп мишам, що перебували на високожировій дієті, викликало активацію АМРК-сигналіngu, підвищення утилізації ліпідів, зниження рівня ВЖК та ацилкарнітину в гепатоцитах [221].

У мишей з НАЖХП, індукованою високожировою та гіперхолестериною дієтою, були виявлені різноспрямовані метаболічні розлади у печінці: зниження вмісту метіоніну; підвищення відношення S-аденозилметіонін / метіонін, підвищення вмісту S-аденозилгомоцистеїну та S-аденозилгомоцистеїнгідролази; підвищення вмісту цистатіоніну та зниження вмісту серину (субстрату реакцій метилювання та транссульфування); підвищення вмісту цистеїну, зниження вмісту глутатіону; зростання відношення фосфатидилхолін/ фосфатидилетаноламін; зниження рівня гліцин-N-метилтрансферази; підвищення рівня аргінінметилтрансферази 1 та зниження вмісту асиметричного диметиларгініну; гіперметилювання гену ГМГ-КоА-редуктази; однак суттєвих змін експресії ключових ензимів обміну сірковмісних амінокислот (метіонінаденозилтрансферази, метіонінсинтетази, цистатіонін-β-синтази, бетаїнгомоцистеїн-S-метилтрансферази, γ-глутаміл-цистеїнсинтетази) при цьому не спостерігалось [136]. За іншими даними, 6-тижнева високожирова дієта та введення CCl₄ спричиняли розвиток важкого стеатозу та фіброзу печінки у щурів, що супроводжувалось збільшенням рівня гомоцистеїну в крові, зниженням активності ензимів шляхів метилювання (S-аденозилгомоцистеїнгідролази, бетаїнгомоцистеїн-S-метилтрансферази) та транссульфування (цистатіонін-β-синтази), розвитком оксидативного стресу [61]. Мітохондріальна дисфункція при НАЖХП також може спричиняти ГГЦ: навантаження щурів тетрадецилтіопропіоною кислотою (інгібітором мітохондріального окиснення ЖК) викликало дозозалежне пригнічення ліполізу, накопичення ТГ в печінці та підвищення рівня гомоцистеїну [290].

Тісний зв'язок між патологією печінки та ГГЦ підтверджують клінічні дослідження. Так, прогресування фіброзу та цирозу печінки у хворих з

хронічними гепатитами вірусної та алкогольної етіології супроводжується значним підвищенням рівня гомоцистеїну в сироватці крові [63]. За даними мета-аналізу 8 клінічних досліджень, у пацієнтів з НАЖХП (верифікованою за даними біопсії) підвищується ризик розвитку ГГЦ (OR=5,09; 95 % CI 1,69; 15,3) [106]. У пацієнтів з простим стеатозом печінки рівень гомоцистеїну є вищим на 0,45 (95 % CI: 0,09; 0,82) мкмоль/л, а у пацієнтів з НАСГ – на 1,02 (95 % CI: 0,28; 1,76) мкмоль/л, ніж у практично здорових осіб того ж віку та статі [106]. У дітей із НАЖХП підвищення важкості гістологічних змін у печінці поєднувалось з підвищенням рівнів гомоцистеїну та цистеїну в плазмі крові [241]. Виявлений прямий зв'язок між рівнем гомоцистеїну та рівнем ТГ, індексом інсулінорезистентності НОМА, і обернений зв'язок - з рівнем ЛПВЩ у пацієнтів з НАЖХП [120]. У хворих на НАЖХП рівень гомоцистеїну прямо корелює з окружністю талії, індексом маси тіла, рівнем ТГ, ЛПНЩ, малонового діальдегіду, активністю амінотрансфераз і обернено корелює з рівнем глутатіону, активністю супероксиддисмутази (СОД) [9, 269]. У хворих на ЦД-2 з НАСГ підвищення рівня гомоцистеїну асоціювалось зі зниженням в крові рівня L-карнітину, який транспортує ВЖК у мітохондрії [12, 13, 21].

Підвищення рівня гомоцистеїну у хворих на НАЖХП пов'язують з поліморфізмом гену метилентетрагідрофолатредуктази *MTHFR C677T* (генотип 677ТТ) та *A1298C* (генотип 1298СС) [227, 242], хоча в інших роботах цей зв'язок не підтвердився [222]. Незважаючи на доведену роль дефіциту вітамінів групи В у розвитку ГГЦ [7, 65], суттєвих відмінностей між пацієнтами з НАЖХП та здоровими особами за рівнем фолату, кобаламіну та піридоксину не зареєстровано [106, 227, 269]. В роботі Polyzos та ін. (2012) взагалі було показано, що зниження сироваткового рівня гомоцистеїну є предиктором трансформації стеатозу у НАСГ і корелює із морфологічними змінами печінки [268]. Won та ін. (2016) показали, що зв'язок між НАЖХП та ГГЦ виявляється лише у чоловіків, але не у жінок [274].

На сьогодні бракує інформації щодо ролі ГГЦ в механізмах НАЖХП з точки зору теорії «множинного удару», не досліджений зв'язок рівня

гомоцистеїну з IGF-1 та іншими чинниками, які можуть визначати репараційний потенціал гепатоцитів і це питання потребує окремого вивчення.

1.3 Сучасні підходи до лікування неалкогольної жирової хвороби печінки

Згідно директив AASLD, ACG, AGA (2012) та вітчизняних нормативних документів (наказ МОЗ України від 06.11.2014 р. №826), ожиріння, ЦД-2, метаболічний синдром, інсулінорезистентність, дисліпідемія є основними патологічними станами, які асоціюються з розвитком НАЖХП, мають спільні ланки патогенезу та взаємообтяжуючий перебіг [1, 80, 235, 291].

Пацієнти з НАЖХП за відсутності НАСГ мають сприятливий прогноз перебігу і зазвичай не потребують фармакологічної корекції. Тому на етапі простого стеатозу всі заходи спрямовані на немедикаментозне усунення інсулінорезистентності як тригерного чинника НАЖХП. З цією метою хворим на НАЖХП рекомендують модифікувати спосіб життя - дотримуватись принципів раціонального харчування (гіпокалорійна дієта зі обмеженим вмістом простих вуглеводів та насичених жирних кислот, відмова від алкоголю); підвищити фізичну активність та нормалізувати масу тіла [1, 80, 291]. Зниження маси тіла щонайменше на 3-5 % у пацієнтів з ожирінням супроводжується вірогідним зниженням вмісту ліпідів в печінці [138, 191, 303]. В мультицентровому дослідженні Look AHEAD (Action for Health in Diabetes) було доведено, що у пацієнтів з НАЖХП та фоні ЦД-2 та ожиріння 12-місячна модифікація стилю життя забезпечила достовірне зниження маси тіла та регрес стеатозу печінки [137].

В окремих випадках пацієнтам з морбідним ожирінням для зниження маси тіла призначають орлістат - інгібітор кишкової ліпази, що пригнічує абсорбцію ліпідів у тонкій кишці і сприяє зниженню маси тіла, зменшенню рівня трансаміназ та дисліпідемії [236]. У хворих з ожирінням для зниження маси тіла також були спроби застосовувати сибутрамін - інгібітор реаптейку

серотоніну та норадреналіну, який пригнічує апетит та стимулює термогенез [104], або римонабант - селективний СВ-1-інгібітор, який блокує ендоканабіноїдні рецептори та підвищує рівень адипонектину [129, 253]. Прийом цих засобів викликав зниження маси тіла, зменшення рівня трансаміназ та дисліпідемії, але супроводжувався рядом серйозних побічних ефектів [200]. Засвідчений кардіотоксичний, тератогенний, профіброгенний ефекти сибутраміну [85, 200] та серйозні психологічні розлади (депресія, суїцидальні спроби) при прийомі римонабанту [118], тому ці засоби були заборонені в США, країнах ЄС та в Україні.

Оскільки специфічних антистеатогенних та антифіброзних препаратів поки не існує, сучасна медикаментозна стратегія при НАЖХП переважно базується на корекції інсулінорезистентності, дисліпідемії, оксидативного стресу та інших метаболічних розладів, пов'язаних з ЦД-2, ожирінням та коморбідними станами (ішемічною хворобою серця, гіпотиреозом, гіпопітуїтаризмом, гіпогонадізмом) [1, 80, 291].

В табл. 1.3 узагальнена інформація щодо лікарських засобів, які рекомендовані для лікування НАЖХП згідно AASLD, ACG, AGA (Guideline 2012), УКПМД «Неалкогольний стеатогепатит» (2014) та АКН «Неалкогольна жирова хвороба печінки» (2014) та наведені перспективні напрямки корекції НАСГ [1, 13, 18, 21, 80, 235, 291]. Слід відзначити, що на сучасному етапі єдиним засобом з гістологічно підтвердженим антистеатогенним ефектом та належним рівнем доказовості є токоферол (вітамін Е) (сила рекомендацій - 1, доказовість В). Довготривале застосування вітаміну Е забезпечує зниження рівня трансаміназ та зменшення гістологічних ознак стеатозу печінки [100, 146]. На жаль, тривалий прийом вітаміну Е (400 МО/день) збільшує частоту раку простати у чоловіків (на 1,6 випадка на 1000 людино-років) [301].

Інсулінові сенситайзери (метформін, піоглітазон) застосовуються при поєднанні НАЖХП з ЦД-2 в якості антидіабетичних засобів, а ω3-ПНЖК та статини – для корекції гіпертриацилгліцеролемії або гіперхолестеролемія при поєднанні НАЖХП з ішемічною хворобою серця (ІХС) або атеросклерозом

периферичних судин. Гіполіпідемічна ефективність вказаних засобів та їх вплив на НАЖХП в умовах ГГЦ залишається дискусійною [130].

Таблиця 1.3

Засоби фармакологічної корекції НАЖХП

Лікарський засіб	Механізм, ефект	Покази при НАЖХП	Літ.
1	2	3	4
Токоферол (Вітамін Е)	Антиоксидант, скаведжер активних форм кисню, зменшує ПОЛ. Покращує гістологічну картину печінки: викликає поліпшення стеатозу, запалення, балонної дистрофії і стеатогепатиту. Не впливає на фіброзування печінки	НАСГ, відсутність ЦД	[80, 235, 291]
Метформін	Інсуліновий сенситайзер. Зменшує печінкову та периферичну інсулінорезистентність, інгібує глікогеногенез, ліпогенез, знижує експресію SREBP, TNF α . Не має суттєвого впливу на гістологію печінки	ЦД-2 (+ НАЖХП)	[80, 235, 291]
Піоглітазон	Агоніст PPAR (α , γ); інсуліновий сенситайзер; зменшує балонування гепатоцитів; лобулярне запалення та стеатоз.	ЦД-2 (+ НАЖХП)	[80, 235, 291]
ω 3-ПНЖК	Активация окиснення ЖК; зниження ліпогенезу; скавенджер активних форм кисню; антиліпотоксична дія, зменшення інсулінорезистентності	Гіпертриа-цилгліцеро-лемія	[80, 235, 291]
Статини	Гіполіпідемічна дія. Інгібітори ГМК-КоА-редуктази (блокують синтез холестерину <i>de novo</i>), зниження рівня холестерину та ЛПНЩ. Можливість підвищення рівня трансаміназ за відсутності серйозного пошкодження печінки	Гіперхолестеринемія, дисліпідемія, атеросклероз судин, ІХС	[80, 235, 291]
УДХК	Спростована здатність впливати на печінковий стеатогенез	Не рекомендована	[80, 291]
L-карнітин	Активує транспорт ЖК в мітохондрії, нормалізує вміст ліпідів, зменшує мітохондріальну дисфункцію, знижує рівня гомоцистеїну (в комплексі з фолатом).	НАЖХП * + ЦД-2 ? + ГГЦ ?	[12, 13, 21]
S-аденозил-метіонін	Зниження рівня гомоцистеїну, дисліпідемії, активності трансаміназ	НАЖХП * + ГГЦ?	[22]

Продовження табл. 1.3

1	2	3	4
Мельдоніум	Інгібітор γ -бутиробетаїнгідроксилази, знижує синтез карнітину, зменшує вміст ацил-КоА та ацилкарнітину, зменшує рівень трансаміназ, білірубину, сонографічні ознаки стеатозу печінки, антиоксидант	НАСГ*	[81]
Вітаміни В ₆ , В ₁₂ , фолієва кислота	Зниження рівня гомоцистеїну, трансаміназ, дисліпідемії	НАЖХП * + ЦД-2? + ГГЦ?	[57]
Есенціальні фосфоліпіди	Мембранстабілізуюча, протизапальна, гіполіпідемична, цитопротекторна дія	НАЖХП *	[4]
Сартани (лозартан)	Інгібітор рецепторів ангіотензину II; зниження проліферації зірчастих клітин, антифіброзна активність	НАЖХП * + Артеріальна гіпертензія	[209, 210]
Телмісартан	Інгібітор рецепторів ангіотензину II; Інсуліновий сенситайзер, зниження рівня ВЖК, активація PPAR γ	НАЖХП * + Артеріальна гіпертензія	[144]
Ексенатид	Інкретинний міметик, аналог глюкагонподібного пептиду; антистеатогенна дія при застосуванні разом з піоглітазоном	НАСГ*	[235]
Обетіхолева кислота	Селективний агоніст FXR, інсуліновий сенситайзер, антифібротичний ефект, підвищує рівень холестерину	НАЖХП * + ЦД 2; + ГГЦ?	[156]
Емрікасан	Необоротний інгібітор каспаз. Знижує рівень стеатозу, апоптозу, фіброзу печінки <i>in vivo</i> . Знижує рівень трансаміназ, не впливає на масу тіла, рівень ліпідів в крові	НАЖХП * + ЦД2?	[88, 235]
Ліраглутид	Агоніст рецепторів глюкагон-подібного пептиду 1. Знижує АЛТ, стеатоз, фіброз, зменшує рівень ВЖК, інсуліну в крові, гальмує ліполіз в адипоцитах	НАЖХП * + ЦД2?	[260]
Арамхол	Інгібує активність стеароїл-КоА-десатурази в гепатоцитах, знижує рівень ТГ в печінці	НАЖХП * + ЦД2?	[259]

Примітка. * - кількість спостережень обмежена.

До потенційно перспективних метаболічних коректорів НАЖХП при коморбідності з ЦД-2 відносять S-аденозилметіонін, L-карнітин, вітаміни В₆, В₁₂ та фолієву кислоту, які коригують рівень гомоцистеїну в плазмі крові [12, 13, 21, 22, 57], відмічена ефективність мельдоніума (інгібітора синтезу L-

карнітину) та есенціальних фосфоліпідів у хворих з НАЖХП [4, 81]. Однак, вказані дослідження проведені з обмеженою кількістю спостережень і рекомендації щодо застосування даних коректорів при НАЖХП поки не мають належного рівня доказовості. В окремих експериментальних та клінічних дослідженнях показана антифіброзна та гіполіпідемічна дія сартанів (лозартану, телмісартану) [144, 210, 209]. Випробовування проходять засоби патогенетичної корекції НАЖХП – ексенатид (інкретиновий міметик), обетіхолева кислота (селективний агоніст FXR), емрікасан (необоротний інгібітор каспаз), ліраглутид (агоніст рецепторів глюкагон-подібного пептиду тривалої дії), арамхол (кон'югат холієвої та арахінової кислот, інгібітор стеароїл-КоА-десатурази 1), що з часом розширить можливості лікування НАСГ у пацієнтів з ожирінням, ЦД-2 та іншими патологічними станами.

Резюме. НАЖХП представляє важливу медико-соціальну та наукову проблему, що пояснюється стрімким зростанням її поширеності, складністю механізмів розвитку та обмеженими можливостями фармакологічної корекції, особливо на етапі НАСГ. До чинників, які можуть погіршувати перебіг НАЖХП та модифікувати ефективність її лікування, слід віднести ГГЦ. Поширеність НАЖХП в Україні не визначена, але частота ГГЦ в українській популяції у практично здорових дорослих осіб становить біля 7%, а серед хворих на ІХС сягає 53 % [3]. За результатами вітчизняних дослідників, ГГЦ виявлялась майже у всіх хворих на ЦД-2 з НАСГ, а рівень гомоцистеїну у таких осіб перевищував показники групи контролю в 4,5 рази [13]. Вплив лікарських засобів, які можуть застосовуватись при НАЖХП, на обмін гомоцистеїну та асоційованих з ним процесів потребує уточнення. Тому, подальші дослідження патогенетичних та фармакотерапевтичних аспектів НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, є актуальним завданням медичної біохімії і його вирішення дозволить оптимізувати підходи до корекції вказаної патології у перспективі.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [31, 32, 33, 41, 52].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ, МОДЕЛІ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика тварин, дієт та моделей

Експериментальне дослідження проведено на 156 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях (*Rattus norvegicus*) із початковою масою 210-280 г, отриманих з науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова. Всі досліді виконані згідно загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (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 Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова (протокол № 6 від 14.05.2017).

Згідно мети та завдань дослідження всі тварини були розподілені за двома напрямками експериментальних досліджень (табл. 2.1). Дослідні групи формували шляхом випадкової вибірки з урахуванням початкової маси тіла тварини. Під час експериментів тварини перебували в стандартних умовах віварію, з 12-годинним світловим режимом день/ніч, при температурі $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ та відносній вологості повітря $50\pm 5\%$, воду і корм отримували *ad libitum* згідно нормативів [30]. Всі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9^{00} до 11^{00} , тварин виводили з досліді через 24 години після останнього введення речовин. Стан тварин, кількість вжитого корму та води контролювали щоденно. Через визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали методом швидкої декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію 100 мг/кг в/оч).

Розподіл щурів за напрямками експериментального дослідження

№№ серій	Напрямки експериментального дослідження	Кількість тварин
1	<p>Вивчення впливу тіолактону гомоцистеїну на формування НАЖХП, індукованої високожировою дієтою (ВЖД), у щурів</p> <p>Вивчення впливу 60-добової ВЖД та введення тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг) на масо-ростові показники (індекс маси тіла, індекс ожиріння, відносну масу печінки, індекс печінка/ селезінка); біохімічні показники функціонального стану печінки (рівень амінотрансфераз, білірубину, альбуміну, сечовини, ліпідів в крові), маркери оксидативного стресу, біохімічні показники стеатозу та фіброзу печінки, вміст гомоцистеїну та IGF-1 в сироватці крові, вміст H₂S в печінці; морфологічний стан печінки.</p>	56
2	<p>Вивчення впливу засобів з гіполіпідемічною дією на біохімічні показники функціонального стану печінки, маркери стеатозу та фіброзу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ</p> <p>Вивчення впливу стандартної дієти, симвастатину та препарату ω-3 ПНЖК на показники функціонального стану печінки (рівень АЛТ, ГГТ, білірубину, альбуміну, сечовини, ліпідів в крові), маркери оксидативного стресу, біохімічні показники стеатозу та фіброзу печінки, вміст гомоцистеїну та IGF-1 в сироватці крові, вміст H₂S в печінці</p> <p>Порівняльна оцінка впливу стандартної дієти, симвастатину та препарату ω-3 ПНЖК на морфологічний стан печінки щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ</p>	100
	Всього тварин	156

Характеристика дієт. До початку експериментів тварин витримували на карантині у відокремлених приміщеннях віварію протягом 10 діб. У цей період щурів із раціону віварію переводили на стандартну напівсинтетичну крохмально-казеїнову дієту, збалансовану по всім макро- та мікронутрієнтам, яка дозволяє більш суворо контролювати харчовий статус піддослідних тварин. Склад та методика її приготування наведені в офіційних документах та довідникових посібниках [25, 30].

Стандартна дієта (СД) включала наступні компоненти: казеїн - 180 г; кукурудзяний крохмаль - 660 г; жири - 100 г (свинячого лядру - 50 г, соняшnikової олії - 50 г); суміш вітамінів - 5 г (на глюкозі); суміш мінеральних солей - 35 г, целюлоза - 20 г (на 1000 г сухого корму). До складу СД у відповідності до фізіологічних потреб входили наступні вітаміни: піридоксин - 1,0; фолієва кислота - 0,2; кобаламін - 0,03; тіамін - 4,0; рибофлавін - 5,0; пантотенат - 15,0; нікотинат - 15,0; біотин - 0,2; холін - 50,0; токоферол - 150,0; вітамін К (філохінон) - 2,0; ретинол - 1,0; кальціферол - 0,03 (мг на 1 кг сухого корму). До складу сольової суміші входили: NaCl - 58,5 г; K_2HPO_4 - 163,3 г; MgSO_4 - 24,1 г; CaCO_3 - 160,2 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 11,1 г; KI - 0,322 г; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1,87 г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,23 г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 г; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 г; NaF - 0,21 г; K_2SO_4 $\text{Al}_2[\text{SO}_4]_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ - 0,047 г; $\text{KCr} [\text{SO}_4]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 0,55 г; Na_2Se - 0,01 г. Отже, СД постачає 17 % ккал за рахунок протеїнів, 62 % ккал за рахунок вуглеводів та 21 % ккал за рахунок жирів.

Високожирову дієту (ВЖД) створювали на основі СД за принципом збільшення квоти жирів за рахунок зменшення квоти вуглеводів, з дотриманням ізокалорійності за квотою протеїнів [61, 288]. ВЖД містила казеїну - 230 г, крохмалю - 390 г, жиру - 320 г (лядру - 160 г, соняшnikової олії - 160 г), суміші вітамінів - 5 г, сольової суміші - 35 г, целюлози - 20 г (на 1000 г сухого корму). ВЖД постачає 17 % ккал за рахунок протеїнів, 29 % ккал за рахунок вуглеводів та 54 % ккал за рахунок жирів.

Сухий корм заливали окропом (відношення 1 до 2,5), ретельно перемішували до отримання густої однорідної маси і вносили в надлишковій

кількості в годівниці із розрахунку, що 1 щур масою 200-250 г споживає біля 18-20 г сухої дієти. Залишки корму щоденно зважували.

Моделювання НАЖХП. Відомі два основних принципи моделювання НАЖХП: створення генетично-детермінованої схильності до стеатозу та фіброзу печінки (SREBP-1с трансгенні миші, PPAR α -нокаутовані миші, ob/ob-миші, db/db-миші та ін.) та застосування спеціальних стеатогенних дієт - ВЖД, метіонін- та холін-дефіцитної дієти, атерогенної дієти з надлишком холестеролу та холату, дієти «Кафетерій» з включенням снекових продуктів та фастфуду, дієта з навантаженням фруктозою [6, 112, 287, 288]. Найбільш доступним та ефективним шляхом відтворення НАЖХП є застосування ВЖД, в якій біля 50-60 % калоражу забезпечують жири [6, 287, 288]. Застосування такої дієти упродовж 3-9 тижнів викликає майже у 100 % експериментальних щурів розвиток гістологічної картини стеатозу печінки (з трансформацією у стеатогепатит), інсулінорезистентності, ожиріння та дисліпідемії, що максимально наближає дану модель до НАЖХП у людини [6, 287, 288].

Для вирішення завдань дисертаційного дослідження була обрана модель НАЖХП у щурів, індукованої застосуванням ВЖД (склад описаний вище) упродовж 60 діб [61, 288]. Для створення моделі НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, тваринам паралельно із застосуванням ВЖД проводили навантаження тіолактоном гомоцистеїну. Модель тіолактонової ГГЦ дозволяє підвищити рівень гомоцистеїну в плазмі крові в 2-6 рази і на відміну від інших моделей ГГЦ не супроводжується гіперметіонінемією, гіперцистеїнемією, не вимагає створення дефіциту вітамінів групи В [15, 19, 55, 60, 177].

D,L-тіолактон гомоцистеїну гідрохлорид (Acros Organics, Італія) вводили щоденно в/шл в дозі 100 мг/кг маси тіла на 1 % крохмальному гелі за допомогою зонду з оливою. Щурам контрольних груп вводили еквівалентні об'єми 1 % крохмального гелю (1 мл/кг маси тіла).

В табл. 2.2 наведений розподіл щурів на групи при моделюванні НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

Розподіл щурів на групи при моделюванні НАЖХП, асоційованої з ГГЦ

№	Група	n	Дієта	Речовини, які вводили тваринам
1	Контроль	14	СД	1 % крохмальний гель (1 мл на 100 г маси тіла) 1 раз на добу в/шл
2	ГГЦ	14	СД	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл на 1 % крохмальному гелі 1 раз на добу
3	ВЖД	14	ВЖД	1 % крохмальний гель (1 мл на 100 г маси тіла) 1 раз на добу в/шл
4	ВЖД + ГГЦ	14	ВЖД	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл на 1 % крохмальному гелі 1 раз на добу
Всього – 56 щурів. Тривалість дослідження – 60 діб				

Вивчення впливу засобів з гіполіпідемічною дією на маркери стеатозу та фіброзу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ. Для корекції метаболічних порушень були обрані симвастатин та препарат ω -3 ПНЖК. Симвастатин є інгібітором ГМГ-КоА-редуктази, гіполіпідемічним засобом з політропними властивостями, який забезпечує зниження рівня загального холестерину, ЛПНЩ та ЛПДНЩ; інгібує запальну реакцію в судинах, покращує ендотеліальну функцію, зменшує оксидативний стрес [14, 27, 110, 230]. Препарати ω -3 ПНЖК, головними складовими яких є докозогексаєнова та ейкозопентаєнова есенціальні ЖК, також відносяться до гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями і застосовуються в першу чергу для корекції гіпертриацилгліцеролемії [197]. В окремих дослідженнях засвідчено, що прийом симвастатину [74, 143, 313] та ω -3 ПНЖК [142, 295] може супроводжуватись зниженням сироваткового рівня гомоцистеїну.

Модель НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, створювали за допомогою ВЖД та введення тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг в/шл) упродовж 60 діб як описано раніше. З 61-ої доби частину щурів з «НАЖХП + ГГЦ» переводили на СД, якої дотримувались до завершення дослідження. Для лікування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, були застосовані фармакопейні препарати симвастатину (Вазиліп, KRKA) та ω -3 ПНЖК (Епадол-Нео, АТ «Київський вітамінний завод»). Капсула епадолу-нео містить 1000 мг етилових ефірів ω -3 ПНЖК: 300

мг ейкозапентаєнової кислоти, 200 мг докозагексаєнової кислоти, 498 мг інших ЖК, d- α -токоферол (вітамін E) - 2 мг [27]. На фоні СД тваринам з «НАЖХП+ГГЦ» упродовж 14 та 28 діб вводились гіполіпідемічні засоби в/шл 1 раз на добу: симвастатин - в дозі 20 мг/кг маси тіла (на 1 % крохмальному гелі); препарат ω -3 ПНЖК – в дозі 150 мг/кг маси тіла (1500 мг або 1,5 мл епадолу змішували з 8,5 мл рафінованої соняшникової олії і вводили із розрахунку 0,1 мл на 100 г маси щура). Дози препаратів та термін їх застосування узгоджувались з наведеними в літературі і не викликали загибелі тварин [66, 127]. В табл. 2.3 наведений розподіл щурів на дослідні групи.

Таблиця 2.3

Розподіл щурів на дослідні групи при вивченні лікувального ефекту засобів з гіполіпідемічною дією за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ

№	Група	n	Моделювання патології		Лікування
1	Контроль (3 підгрупи)	30	СД	1 % крохмальний гель 1 мл на 100 г маси 1 раз на добу в/шл (60 діб; 60+14 та 60+28 діб)	
2	НАЖХП + ГГЦ	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз на добу	
3	НАЖХП + ГГЦ + СД	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз / добу	СД - 14 діб
4	НАЖХП + ГГЦ + СД	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз/ добу	СД - 28 діб
Лікування симвастатином					
5	НАЖХП + ГГЦ + Симвастатин	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз/ добу	Симвастатин 20 мг/кг в/шл та СД - 14 діб
6	НАЖХП + ГГЦ + Симвастатин	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз/ добу	Симвастатин 20 мг/кг в/шл та СД - 28 діб
Лікування препаратом ω-3 ПНЖК					
7	НАЖХП + ГГЦ + ω -3 ПНЖК	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз/ добу	ω -3 ПНЖК 150 мг /кг та СД - 14 діб
8	НАЖХП + ГГЦ + ω -3 ПНЖК	10	ВЖД 60 діб	Тіолактон гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл 1 раз/ добу	ω -3 ПНЖК 150 мг /кг та СД - 28 діб
Всього – 100 щурів. Загальна тривалість дослідження - 88 діб.					

2.2 Біохімічні методи дослідження

Біохімічні дослідження виконані на базі кафедри біологічної та загальної хімії та науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М.І. Пирогова, сертифікованої МОЗ України (свідоцтво про переатестацію №049/15 від 02.03.2015). Частина біохімічних показників сироватки крові, які характеризують функціональний стан печінки, досліджувалась в лабораторії «Меділабс» (ліцензія МОЗ України АЕ № 197826 від 17.06.2013).

Сироватку крові отримували центрифугуванням цільної крові при 1500 g 15 хв при 18-22°C. Аліквоти сироватки відбирали в мікропробірки Eppendorf і зберігали при -20°C до проведення дослідження.

Показники функціонального стану печінки. 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) визначали з використанням стандартних наборів реактивів на аналізаторі Beckman Coulter AU 480 OLYMPUS.

Білоксинтезуючу функцію печінки оцінювали за рівнем альбуміну в сироватці крові, який визначали за реакцією з бромкрезоловим зеленим за стандартним набором «Альбумин Агат (Біоконт)». Вміст сечовини в сироватці крові визначали за реакцією діацетилмонооксимом за стандартним набором «Мочевина Агат (Біоконт)». Вміст білірубіну визначали за реакцією з діазотованою сульфаніловою кислотою в присутності кофеїнового реактиву (метод Ендрашика) за набором «Білірубін» (Філісіт-Діагностика, Україна).

У хворих з НАЖХП чутливим неінвазивним маркером некрозапальних змін та предиктором фіброзу печінки, що корелює з результатами біопсії, є високий рівень γ -глутамілтрансферази (ГГТ) в сироватці крові [201, 266, 272]. Активність ГГТ (КФ 2.3.2.2) в сироватці крові визначали за швидкістю вивільнення 4-нітроаніліну з γ -глутамілнітроаніліду уніфікованим методом за

набором «ГТТ» (Філісіт-Діагностика, Україна). Вміст модуляторів печінкового стеато- та фіброгенезу – гомоцистеїну, TNF α та IGF-1 в сироватці крові визначали імуноферментним методом ELISA за наборами «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія); «Rat TNF- α ELISA Kit» (InvitroGen™); «m/r IGF-1-ELISA (IGFBP-blocked)» (Mediagnost, Німеччина); відповідно до інструкції виробника на аналізаторі STAT FAX 303/PLUS (Awareness Technologies, США).

Біохімічні дослідження печінки. Для біохімічних досліджень печінку гомогенізували протягом 1-2 хв. в охолодженному середовищі 1,15 % KCl у відношенні маса/об'єм - 1:4 при 3000 об/хв (тефлон-скло). Центрифугували 30 хв при 600 g, відбирали аліквоти пост'ядерного 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 [59].

В якості маркера фіброзу в гомогенаті печінки визначали вміст вільного гідроксипроліну за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом [276]. До 0,5 мл гомогенату печінки додавали 3 мл 96 % етанолу, центрифугували при 3000 об/хв упродовж 10 хв., відбирали супернатант, випарювали, сухий залишок розчиняли в 0,5 мл дистильованої води. До 50 мкл екстракту додавали 900 мкл 56 мМ хлораміну Т, інкубували 25 хв. при 20-22°C, додавали 1,0 мл 1 М пара-диметиламінобензальдегіду, інкубували 20 хв. Фотометрували при 550 нм.

Для оцінки оксидативного стресу в гомогенатах печінки визначали активність NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1) за поглинанням NADPH при 340 нм [237], тіоредоксинредуктази (КФ 1.8.1.9) - за швидкістю NADPH-залежного відновлення 5,5'-дітіобіс(2-нітробензоату) - DTNB [132], супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) – за інгібуванням окиснення кверцетину [28]. Вміст ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою за набором «ТБК-Агат (Біоконт)» [8]. Вміст карбонільованих протеїнів визначали за утворенням фенілгідрозонів при взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразинном

[76]. До 0,1 мл гомогенату печінки додавали 0,5 мл 0,5 М НСІ, 0,2 мл 0,2 % розчину 2,4-динітрофенілгідразину у 0,8 М НСІ. Суміш інкубували 10 хвилин при 20⁰С, осаджували протеїни 0,3 мл 10 % розчину ССІ₃СООН, центрифугували 10 хвилин при 3000 об/хв. Осад двічі промивали 1,0 мл 5 % розчину ССІ₃СООН, центрифугували 10 хв. при 3000 об/хв. До осаду протеїнів додавали 1 мл 0,9 % розчину NaCl та 1 мл 5 % розчину NaOH. Інкубували 20 хв. при 20-22⁰С. Фотометрували при 490 нм. Вміст протеїну в гомогенатах печінки визначали мікробіуретовим методом [29].

Вміст Н₂S в печінці визначали як описано [114]. Печінку перфузували холодним 1,15 % розчином KCl, наважку тканини гомогенізували 1-2 хв. в середовищі 0,01 М NaOH у співвідношенні 1:5 (маса/об'єм) при 3000 об/хв (тефлон-скло). Далі всі маніпуляції проводили в щільно закритих пластикових пробірках (для попередження втрат Н₂S). До 1 мл гомогенату додавали 250 мкл 50 % ССІ₃СООН, центрифугували при 3000 об/хв 15 хв., відбирали супернатант. До 750 мл супернатанту додавали 150 мкл 20 мМ розчину N,N-диметил-пара-фенілендіаміну сульфату в 7,2 М НСІ, 150 мкл 30 мМ розчину FeCl₃ в 1,2 М НСІ, інкубували 20 хв. при 20-22⁰С. Фотометрували при 670 нм.

Дослідження масо-ростових параметрів тварин. Масу тіла тварин (г) та назально-анальну довжину тіла (см) вимірювали 1 раз на тиждень. Індекс маси тіла (ІМТ) розраховували за відомою формулою в кінці експерименту [190]: $ІМТ (г/см^2) = \text{Маса тіла, г} / (\text{Довжина тіла, см})^2$.

Забір біологічного матеріалу здійснювали одразу після евтаназії тварин. Органи (печінку, селезінку) зважували на аналітичних вагах. Відносну масу органів розраховували за формулою: $(\text{Маса органа, г} / \text{Маса тіла, г}) * 100 \%$. Визначали відношення маси печінки (г) до маси селезінки (г) на 100 г маси тіла (П/С). Індекс ожиріння визначали як описано [190]. Вилучали вісцеральну, епідідимальну та ретроперітонеальну жирову тканину, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували. Індекс ожиріння розраховували як відношення з сумарної маси вісцерального, епідідимального та ретроперітонеального жиру (г) до маси тіла (г) * 100 %.

2.3 Морфологічні дослідження

Морфологічні дослідження виконані за допомогою к.мед.н., 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.). Автор висловлює глибоку вдячність співробітникам за допомогу в проведенні морфологічних досліджень.

Гістологічне дослідження печінки щурів проводили загальноновизнаними методами [71]. Після евтаназії відбирали невеликі фрагменти центральної частини правої долі печінки, фіксували 10 % розчином нейтрального формаліну, проводили через батарею спиртів зростаючої міцності і заливали в парафінові блоки. За допомогою санного мікротома Мікромед МС-2М готували напівтонкі зрізи (5-7 мкм), які забарвлювали гематоксилін-еозином, по Ван Гізону та суданом III (для виявлення крапель жиру), вивчали за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі «Olimpus BX-41».

Морфометричні дослідження проводили в полі зору світлового мікроскопу «Olimpus BX-41» при збільшенні в 400 разів (об'єктив x 40; окуляр x 10). У кожній групі тварин на 5 зрізах у 8 полях зору проводили підрахунок некротизованих гепатоцитів на 100 гепатоцитів, гепатоцитів з жировою дистрофією цитоплазми на 100 гепатоцитів. Ступінь стеатозу у щурів визначали за шкалою: 0 балів – відсутній (< 5% гепатоцитів з включеннями жиру), 1 балів – локальний стеатоз (5-33 % гепатоцитів з включеннями жиру), 2 бали – розповсюджений стеатоз (34-66 % гепатоцитів з включеннями жиру), 3 бали – виражений стеатоз (> 67 % гепатоцитів з включеннями жиру) [249].

Кваліфікація використаних в роботі реактивів та препаратів: D,L-тіолактон гомоцистеїну гідрохлорид (Acros Organics, Італія), $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, США), реактив Елмана (DTNB), L-глутатіон відновлений, NADPH (Sigma, США), N,N-диметил-пара-фенілендіамін сульфат (Fluka, Німеччина), набори «Альбумин Агат (Біоконт)», «ТБК-Агат (Біоконт)» «Мочевина Агат

(Біоконт)» (ВАТ Агат-Мед, РФ); «Білірубін», «ГГТ», «Холестерин-Ф», «Тригліцериди-Ф» (Філісіт-Діагностика, Україна); «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія; чутливість < 1 мкмоль/л); «m/r IGF-1-ELISA (IGFBP-blocked)» (Mediagnost, Німеччина; чутливість < 0,029 нг/мл IGF-1); «Rat TNF α ELISA Kit» (InvitroGen™; чутливість < 4 пг/мл TNF α). Інші реактиви були вітчизняного виробництва категорії х.ч. В роботі використані фармакопейні препарати - тіопентал натрію (Київмедпрепарат, Україна), Вазиліп (KRKA), Епадол-Нео (АТ Київський вітамінний завод).

2.4 Методи статистичної обробки цифрового матеріалу

Обробку первинного матеріалу проводили за допомогою універсальних статистичних програм MS Excel, SPSS22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № АХХR910A374605FA). Визначали середнє значення, стандартні помилки. Для оцінки відмінностей 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 $M \pm m$.

Використані моделі та методи дослідження дозволяють об'єктивно та комплексно вивчити біохімічні особливості НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та оцінити антистеатогенну та антифіброзну ефективність засобів з гіполіпідемічною дією.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [26, 39, 50, 51].

РОЗДІЛ 3

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ ПРОГРЕСУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЇ З
ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

Розвиток НАЖХП асоціюється з підвищенням рівня гомоцистеїну, з іншого боку ГГЦ може бути незалежним чинником стеатозу та фіброзу печінки, що засвідчено в експериментальних та клінічних дослідженнях [12, 21, 61, 106, 124]. Механізми гепатотоксичної дії ГГЦ пов'язують з індукцією оксидативного стресу, гіпометилуванням, порушенням продукції вазоактивних медіаторів, мітохондріальною дисфункцією [60, 61, 216, 297]. Між тим питання щодо механізмів стеатогенної дії ГГЦ з точки зору теорії «множинного удару» потребують подальшого вивчення. Зокрема, важливу роль в регуляції функціонального стану печінки відіграє IGF-1, який контролює тканинний ріст, диференціацію та проліферацію гепатоцитів, ліпідний метаболізм, проявляє антиоксидантну та цитопротекторну дію, запобігає мітохондріальній дисфункції [192, 195, 208]. Також в процесі обміну гомоцистеїну в печінці синтезується газотрансміттер H_2S , який також проявляє властивості антиоксиданта, цитопротектора, вазодилататора, бере участь в регуляції аутофагії [184]. Роль вказаних чинників, які можуть визначати репараційний потенціал гепатоцитів, в патогенезі НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, залишається не визначеною. Завданнями цього розділу було: 1) вивчити вплив 60-добової ВЖД та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ на масо-ростові параметри, функціональний стан печінки, маркери печінкового стеатозу та фіброзу, рівень IGF-1 в сироватці крові та вміст H_2S в печінці; 2) оцінити зв'язок IGF-1 та H_2S з рівнем гомоцистеїну, маркерами стеатозу та фіброзу печінки у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ.

3.1 Рівень гомоцистеїну, масо-ростові параметри та біохімічні маркери функціонального стану печінки у щурів за умов високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією

Для вирішення завдань дисертаційного дослідження була застосована модель експериментальної НАЖХП, індукованої ВЖД [61], яка поєднувалась з моделлю тіолактонової ГГЦ [177]. Дослідження проведено на 56 щурах-самцях із початковою масою 210-280 г, розподілених на 4 групи (n=14): група 1 та група 2 отримували СД, що постачала 21 % ккал за рахунок жирів та 62 % ккал за рахунок вуглеводів, група 3 та група 4 отримували ВЖД, що постачала 54 % ккал за рахунок жирів та 29 % ккал за рахунок вуглеводів (частка протеїнів забезпечувала 17 % ккал в обох дієтах). Щурам груп 2 та 4 щоденно вводили тіолактон гомоцистеїну (100 мг/кг в/шл на 1 % крохмальному гелі), щурі груп порівняння отримували еквівалентну кількість розчинника. Тривалість досліду становила 60 діб.

Встановлено, що 60-добове введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД, як і 60-добове ізольоване застосування ВЖД викликало розвиток ГГЦ (рис. 3.1). Так, рівень гомоцистеїну в сироватці крові щурів групи 1 (контроль) коливався від 4,53 до 6,17 мкмоль/л (95 % СІ), а в групі 2 (ГГЦ) – в межах 7,93-11,29 (95 % СІ) мкмоль/л і за середніми величинами був достовірно вищим на 88,1 % (критерій Мана-Уїтні $U=196,0$, $p<0,001$). Вміст гомоцистеїну у щурів групи 3 (ВЖД) становив 5,93-9,25 (95 % СІ) мкмоль/л і був достовірно вищим на 38,2 %, ніж у щурів в групі 1 (критерій Мана-Уїтні $U=188,0$, $p<0,001$), але на 26,5 % нижчим, ніж у щурів групи 2 (критерій Мана-Уїтні $U=12,00$, $p<0,001$). Отже, введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД забезпечувало формування середньо-важкої ГГЦ, в той час як ізольоване застосування ВЖД індукувало розвиток легкої ГГЦ. Введення тіолактону гомоцистеїну у поєднанні з ВЖД забезпечувало розвиток виразної ГГЦ: у щурів групи 4 вміст гомоцистеїну становив 10,30-13,01 (95 % СІ) мкмоль/л і був достовірно вищим на 114,2 %, ніж у щурів групи 1 (критерій Мана-Уїтні

$U=196,0$, $p<0,001$). Крім того, рівень гомоцистеїну у щурів групи 4 був достовірно вищим на 13,9 %, ніж у щурів групи 2, та на 55,0 % вищим, ніж у щурів групи 3.

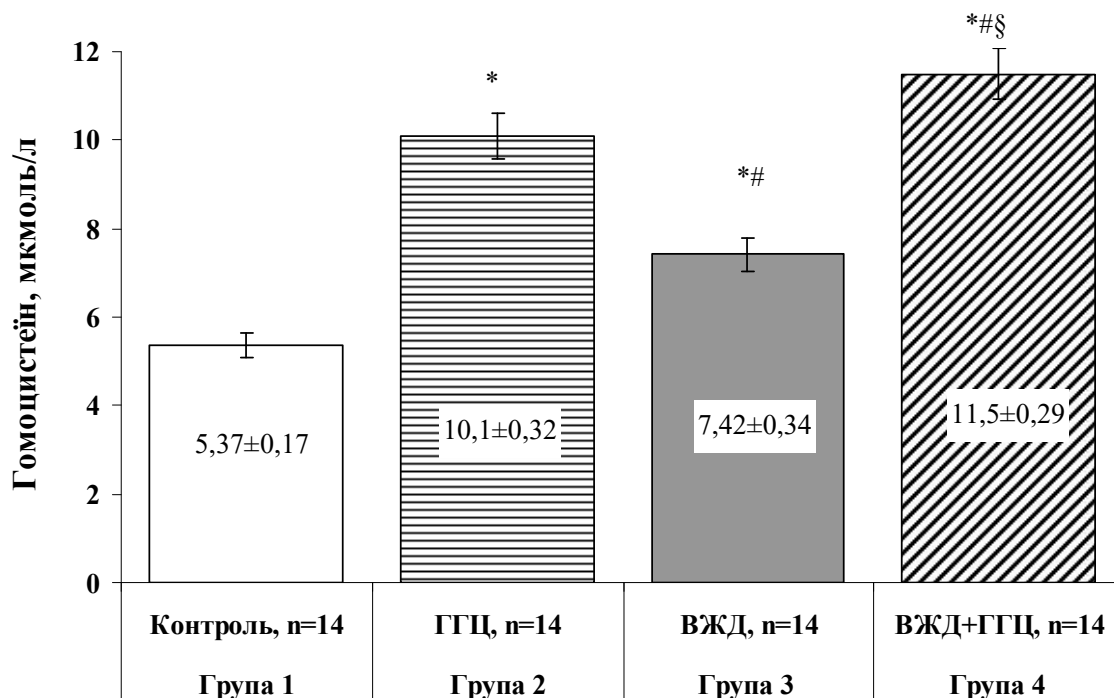


Рис. 3.1 Рівень гомоцистеїну в сироватці крові у щурів за умов ВЖД та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (* - $p<0,05$ відносно групи 1; # - $p<0,05$ відносно групи 2; § - $p<0,05$ відносно групи 3).

Аналіз масо-ростових показників в групах щурів, які за початковою масою тіла були репрезентативними, на 60 добу досліду виявив вірогідні відмінності залежно від режиму харчування (табл. 3.1). Так, у щурів групи 1 реєструвався фізіологічний середньо-добовий приріст маси тіла – від 1,03 до 1,76 г/добу (95 % CI), а ІМТ становив 0,62-0,74 г/см² (95 % CI). Введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД не викликало вірогідних змін середньодобового приросту маси тіла, тому за кінцевою масою тіла та ІМТ щурів групи 2 практично не відрізнялись від щурів групи 1. В той же час, застосування ВЖД викликало вірогідне підвищення (на 50,3 %) середньодобового приросту маси тіла порівняно із фізіологічним приростом, тому у щурів групи 3

реєструвалась достовірно більш висока кінцева маса тіла (на 12,2 та 7,1 %) та ІМТ (на 17,9 та 14,5 %), ніж у щурів груп 1 та 2, відповідно. Застосування тіолактону гомоцистеїну достовірно потенціювало зростання середньодобового приросту маси тіла за умов ВЖД: в групі 4 цей показник був достовірно вищим на 89,5; 38,7 та 26,0 % порівняно з групами 1, 2 та 3. Також, у щурів групи 4 кінцева маса тіла та ІМТ були вірогідно вищими на 21,3 та 28,4 %, ніж у щурів групи 1, на 15,7 та 24,6 % - ніж у щурів групи 2 та на 8,1 та 8,9 % - ніж у щурів групи 3. Такі зміни масо-ростових параметрів у щурів групи 4 можуть свідчити про посилення стеатогенного ефекту ВЖД в умовах тіолактонової ГГЦ.

Таблиця 3.1

Масо-ростові показники у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (M±m)

Групи щурів		Початкова маса тіла, г	Кінцева маса тіла, г (60 доба)	Приріст маси тіла, г/добу	ІМТ, г/см ² (60 доба)
1	Контроль, n=14	255,6±4,67	341,1±6,85	1,43±0,07	0,67±0,01
2	ГГЦ, n=14	264,2±4,09	357,5±6,18	1,55±0,09	0,69±0,01
3	ВЖД, n=14	253,9±5,98	382,8±8,98 ^{*#}	2,15±0,12 ^{*#}	0,79±0,02 ^{*#}
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	251,0±4,71	413,9±11,2 ^{*#§}	2,71±0,14 ^{*#§}	0,86±0,02 ^{*#§}

Примітки:

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

Аналіз маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння у щурів підтвердив акселерацію стеатогенезу при поєднанні ВЖД та ГГЦ (табл. 3.2). Зокрема, у щурів групи 1 сумарна маса ретроперітонеального, епідідимального та вісцерального жиру становила 7,82-9,70 г (95 % СІ), а індекс ожиріння – 2,34-2,83 ум. од., що узгоджується з даними літератури щодо практично здорових

тварин відповідного віку [119, 190]. У щурів групи 2, які отримували тіолактон гомоцистеїну на тлі СД, спостерігалось невірогідне підвищення (на 9,0 %, $p=0,1$) маси внутрішнього жиру до 7,90 - 12,01 г, але індекс ожиріння суттєво не змінювався і становив 2,34-3,18 ум.од. (95 % СІ).

Застосування ВЖД викликало достовірне зростання маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння: за станом на 60 добу у щурів групи 3 вказані показники були на 36,6 % та 21,3 % вищими, ніж у щурів групи 1, та на 25,4 та 17,1 % вищими, ніж у щурів групи 2, відповідно. Виявилось, що поєднання ВЖД та тіолактонової ГГЦ викликали найбільший приріст жирової маси: у щурів групи 4 сумарна маса ретроперитонеального, епідідимального та вісцерального жиру перевищувала таку в групах 1 та 3 на 74,8 та 28,0 %, а індекс ожиріння – на 43,7 та 18,5 %, відповідно. Як відомо, підвищення вмісту вісцерального жиру тісно пов'язано з розвитком інсулінорезистентності [158]. Очевидно, введення тіолактону гомоцистеїну на тлі перевантаження організму тварин екзогенними жирами може порушувати інсуліновий сигналінг та посилювати прояви інсулінорезистентності.

Таблиця 3.2

Показники маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ ($M \pm m$)

Групи щурів		Сумарна маса ретроперитонеального, епідідимального та вісцерального жиру, г	Індекс ожиріння, ум. од. (г жиру / 100 г маси тіла)
1	Контроль, n=14	8,64±0,17	2,54±0,05
2	ГГЦ, n=14	9,41±0,35	2,63±0,07
3	ВЖД, n=14	11,8±0,44 ^{*#}	3,08±0,05 ^{*#}
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	15,1±0,54 ^{*#§}	3,65±0,26 ^{*#§}

Примітки:

- ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
- [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$).

Аналіз показників абсолютної та відносної маси печінки та селезінки у щурів засвідчив достовірні міжгрупові відмінності (табл. 3.3). Встановлено, що введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД викликало достовірне підвищення абсолютної та відносної маси печінки на 17,8 та 11,9 %, але не спричиняло суттєвих змін абсолютної та відносної маси селезінки та відношення П/С у щурів групи 2 порівняно з групою 1. Ізольоване застосування ВЖД також спричинило достовірне підвищення абсолютної та відносної маси печінки на 26,3 та 13,0 % порівняно з групою 1, при цьому суттєвих відмінностей між групою 3 та групою 2 вказаними показниками не реєструвалось. Натомість, при поєднанні ГГЦ з ВЖД спостерігалось більш суттєвий приріст маси органів: у щурів групи 4 абсолютна маса печінки була вищою на 47,6; 25,2 та 16,8 %, відносна маса печінки – вищою на 20,9; 8,06 та 7,03 %, ніж у щурів групи 1, 2 та 3, відповідно. Також, у щурів групи 4 реєструвалась більш висока абсолютна та відносна маса селезінки, тому відношення П/С було вірогідно нижчим (на 11,6; 13,3 та 14,1 %), ніж в групах порівняння, відповідно.

Таблиця 3.3

Показники абсолютної та відносної маси печінки та селезінки у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ ($M \pm m$)

Групи щурів		Маса печінки, г	Відносна маса печінки, %	Маса селезінки, г	Відносна маса селезінки, %	П/С
1	Контроль, n=14	9,42±0,20	2,77±0,05	0,91±0,03	0,27±0,01	3,02±0,07
2	ГГЦ, n=14	11,1±0,30 [*]	3,10±0,08 [*]	1,02±0,04	0,29±0,01	3,08±0,08
3	ВЖД, n=14	11,9±0,39 [*]	3,13±0,10 [*]	1,03±0,05	0,26±0,01	3,11±0,47
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	13,9±0,49 ^{*#§}	3,35±0,06 ^{*#§}	1,27±0,05 ^{*#§}	0,31±0,01 ^{*§}	2,67±0,09 ^{*#§}

Примітки:

- ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
- [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$).

Аналіз рутинних біохімічних показників сироватки крові засвідчив, що ізольоване введення тіолактону гомоцистеїну, як і ізольоване застосування ВЖД викликало помірне погіршення функціонального стану печінки, однак при поєднанні цих чинників гепатотоксичний ефект посилювався (табл. 3.4). Так, у щурів групи 2 активність АЛТ та ГГТ в сироватці крові була вищою на 17,5 % на 49,3 % порівняно з групою 1. Ізольоване застосування ВЖД також спричиняло помірне підвищення активності АЛТ (на 22,2 %) та ГГТ (на 63,0 %) у щурів групи 3 порівняно з групою 1.

Таблиця 3.4

Біохімічні показники сироватки крові у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоною ГГЦ (M±m)

Групи щурів	АЛТ, Од/л	ГГТ, мккат/л	Альбумін, г/л	Сечовина ммоль/л	Білірубін, мкмоль/л	
					Загальн.	Прямий
1 Контроль, n=14	51,4±2,67	1,38±0,11	41,4±0,75	5,09±0,21	8,34±0,32	2,78±0,11
2 ГГЦ, n=14	60,4±3,39 *	2,06±0,10 *	39,8±0,69	5,16±0,19	9,01±0,14	2,96±0,06
3 ВЖД, n=14	62,8±3,40 *	2,25±0,11 *	40,1±0,69	5,12±0,20	8,98±0,25	3,02±0,09
4 ВЖД + ГГЦ, n=14	92,5± 8,52 *#§	3,06±0,11 *#§	37,3±0,45 *#§	5,24±0,19	9,02±0,37	3,11±0,15

Примітки:

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

В той же час, при поєднанні ВЖД з навантаженням тіолактоном гомоцистеїну функціональний стан печінки погіршувався більш істотно: у щурів групи 4 активність АЛТ а сироватці крові була достовірно вищою на 80,0; 53,1 та 47,3 %, активність ГГТ – вищою на 121,7; 48,5 та 36,0 %, а вміст альбуміну – нижчим на 9,90; 6,28 та 6,98 %, ніж у щурів груп 1, 2 та 3. Слід відзначити, що за вмістом сечовини та білірубіну суттєвих відмінностей між групами 1, 2, 3 та 4 не спостерігалось. Отже, НАЖХП, поєднана з

тіолактоною ГГЦ, характеризується більшою виразністю цитолізу та пригніченням білоксинтезуючої функції печінки порівняно з ізольованою НАЖХП або ізольованою ГГЦ.

Дослідження ліпідного спектру сироватки крові засвідчило, що ізольоване застосування тіолактону гомоцистеїну, як і ізольоване застосування ВЖД викликає формування дисліпідемії, що мають характерні особливості (табл. 3.5). Так, у щурів групи 2 реєструвався більш високий рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ (на 25,8 та 125,8 %) порівняно з щурами групи 1, в той час як інші ліпідні фракції суттєво не змінювались. У щурів групи 3 реєструвалось помірне підвищення рівня ЗХС (на 12,5 %) та більш суттєве підвищення рівня ТГ та ХС ЛПДНЩ (на 37,3 та 37,0 %) порівняно з контролем. В той же час, у щурів групи 4 (ВЖД+ГГЦ) спостерігалось не лише більш значне зростання рівня ЗХС (на 53,9 %), ТГ (на 81,4 %), ХС ЛПНЩ (на 196,8 %), ХС ЛПДНЩ (на 77,8 %), а ще й вірогідне зниження рівня ХС ЛПВЩ (на 20,0 %) відносно групи контролю.

Таблиця 3.5

Вміст ліпідів в сироватці крові у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоною ГГЦ (M±m)

Групи щурів		ЗХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ХС ЛПВЩ, ммоль/л	ХС ЛПНЩ, ммоль/л	ХС ЛПДНЩ, ммоль/л
1	Контроль, n=14	1,28±0,06	0,59±0,07	0,70±0,03	0,31±0,06	0,27±0,03
2	ГГЦ, n=14	1,61±0,05 [*]	0,62±0,04	0,63±0,04	0,70±0,07 [*]	0,28±0,02
3	ВЖД, n=14	1,44±0,04 ^{*#}	0,81±0,07 ^{*#}	0,69±0,05	0,39±0,05 [#]	0,37±0,03 ^{*#}
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	1,97±0,09 ^{*#§}	1,07±0,07 ^{*#§}	0,56±0,04 [*]	0,92±0,11 ^{*§}	0,48±0,03 ^{*#§}

Примітки:

1. ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
2. [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

Зауважимо, що гіперхолестеролемія та гіпертриацилгліцеролемія у щурів групи 4 була достовірно вищими, ніж у щурів групи 2 (на 22,4 та 72,5 %) та групи 3 (на 36,8 та 32,1 %), відповідно.

За ГГЦ та ВЖД спостерігалось підвищення індексу атерогенності (рис. 3.2). При цьому, у щурів групи 2 індекс атерогенності був достовірно вищим (на 97,7 %), а у щурів групи 3 зростав на рівні тенденції ($p=0,1$) відносно групи 1. Проте, при поєднанні ВЖД та ГГЦ індекс атерогенності зростав найбільш суттєво: у щурів групи 4 цей показник достовірно перевищував такий (на 215,1; 59,4 та 123,4 %) у щурів в групах 1, 2 та 3.

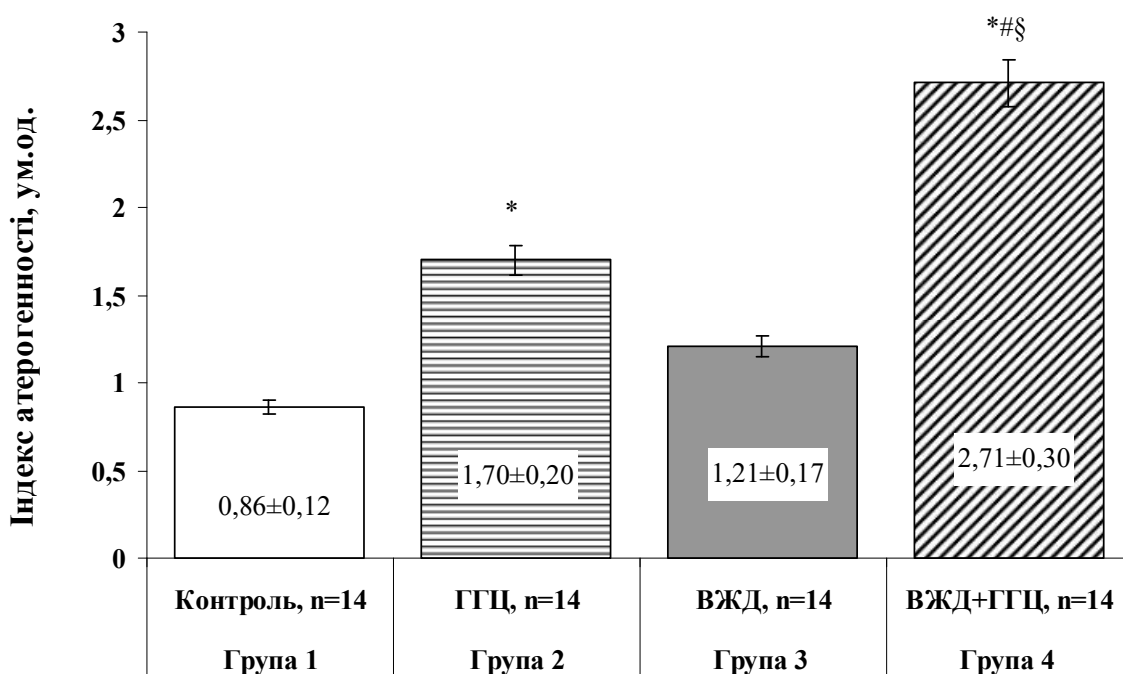


Рис. 3.2 Індекс атерогенності у щурів за умов НАЖХП та її поєднання з ГГЦ (* - $p<0,05$ відносно групи 1; # - $p<0,05$ відносно групи 2; § - $p<0,05$ відносно групи 3); $M\pm m$.

Таким чином, ізольована ГГЦ індукує гіперхолестеролемією із значним зростанням рівня атерогенних ЛПНЩ, в той час як ізольована НАЖХП характеризується гіпертриацилгліцеролемією та помірною гіперхолестеролемією. При поєднанні НАЖХП з ГГЦ проатерогенна

дисліпідемія, крім гіперхолестеролемії (зі зростанням ЛПНЩ), гіпертриацилгліцеролемії (зі зростанням ЛПДНЩ), характеризується зниженням рівня антиатерогенних ЛПВЩ. Зміни ліпідного профілю сироватки крові в цілому узгоджуються зі змінами масо-ростових показників та індексу ожиріння у щурів із ізольованою ГГЦ, ізольованою НАЖХП та при їх поєднанні.

На наступному етапі була проведена оцінка біохімічних маркерів стеатозу та фіброзу печінки у щурів за умов ізольованої ГГЦ, ізольованої НАЖХП та їх поєднання.

3.2 Біохімічні маркери стеатозу та фіброзу печінки у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою гіпергомоцистеїнемією

Дослідження вмісту фракцій ліпідів в печінці засвідчило, що застосування ВЖД забезпечує розвиток стеатозу печінки, ізольоване введення тіолактону гомоцистеїну також справляє помірну ліпогенну дію, однак при поєднанні вказаних чинників стеатогенний ефект істотно потенціюється (табл. 3.6). Так, введення тіолактону гомоцистеїну упродовж 60 діб викликало у щурів групи 2 достовірне підвищення вмісту ТГ (на 47,4 %) та ЗХС (на 29,1 %) та зниження вмісту фосфоліпідів (на 19,1 %) в печінці порівняно з групою контролю. Застосування ВЖД протягом 60-діб спричиняло у щурів групи 3 більш суттєве підвищення вмісту ТГ (на 74,5 %) та помірне підвищення вмісту ЗХС (на 23,6 %), однак не викликало вірогідних змін вмісту фосфоліпідів в печінці порівняно з групою 1. Слід відзначити, що у щурів групи 3 вміст ТГ у печінці був достовірно вищим (на 18,4 %), ніж у щурів групи 2, в той час як за рівнем ЗХС та фосфоліпідів вірогідних відмінностей не виявлено.

Поєднане застосування ВЖД та тіолактону гомоцистеїну спричинило у щурів групи 4 підвищення вмісту ТГ на 195,3 %, ЗХС – на 50,7 % та зниження вмісту фосфоліпідів на 26,2 % відносно групи 1. Крім того, у щурів групи 4

вміст ТГ та ЗХС був достовірно вищим на 69,3 та 12,2 %, а вміст фосфоліпідів – достовірно нижчим на 20,6 %, ніж у щурів групи 3.

Таблиця 3.6

Вміст ліпідів в печінці щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (M±m)

Групи щурів		Вміст ліпідів, мкмоль /г тканини		
		ТГ	ЗХС	Фосфоліпіди
1	Контроль, n=14	19,2±0,96	6,90±0,20	25,6±1,06
2	ГГЦ, n=14	28,3±1,54 [*]	8,91±0,30 [*]	20,7±1,37 [*]
3	ВЖД, n=14	33,5±1,70 ^{*#}	8,53±0,29 [*]	23,8±1,12
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	56,7±2,25 ^{*#§}	10,4±0,35 ^{*#§}	18,9±0,88 ^{*§}

Примітки:

1. ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
2. [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

Результати наших досліджень засвідчили, що при поєднанні ВЖД з введенням тіолактону гомоцистеїну посилення стеатогенного ефекту асоціюється із посиленням профіброгенного ефекту. Дослідження вмісту гідроксипроліну – маркера катаболізму колагенових протеїнів в печінці щурів засвідчило достовірні міжгрупові відмінності (рис. 3.3). Так, у щурів групи контролю вміст гідроксипроліну коливався від 2,46 до 3,43 мкмоль/г печінки (95 % СІ), що відповідає 323-449,7 мкг/г вологої тканини, і в середньому становив 2,85 мкмоль/г (373,5 мкг/г). У щурів групи 2 вміст гідроксипроліну коливався від 3,24 до 4,53 мкмоль/г печінки (424,3-593,8 мкг/г) і в середньому становив 3,74 мкмоль/г (490,1 мкг/г). У щурів групи 3 вміст гідроксипроліну коливався від 3,08 до 3,99 мкмоль/г тканини (403,6-523,4 мкг/г) і середньому відповідав 3,50 мкмоль/г (458,4 мкг/г) тканини. За середніми величинами вміст гідроксипроліну у щурів груп 2 та 3 був достовірно вищим на 31,2 та 22,8 %, ніж у щурів групи 1. В той же час, вміст гідроксипроліну в печінці щурів

групи 4 був найвищим – від 3,88 до 5,34 мкмоль/г (509-700,6 мкг/г) і в середньому становив 4,56 мкмоль/г (597,9 мкг/г) тканини. Отже, вміст гідроксипроліну у щурів групи 4 достовірно перевищував такий у щурів груп 1, 2 та 3 на 60,0; 21,9 та 30,3 %, відповідно, що може свідчити про активацію фіброгенезу за умов поєднання ВЖД та тіолактонової ГГЦ.

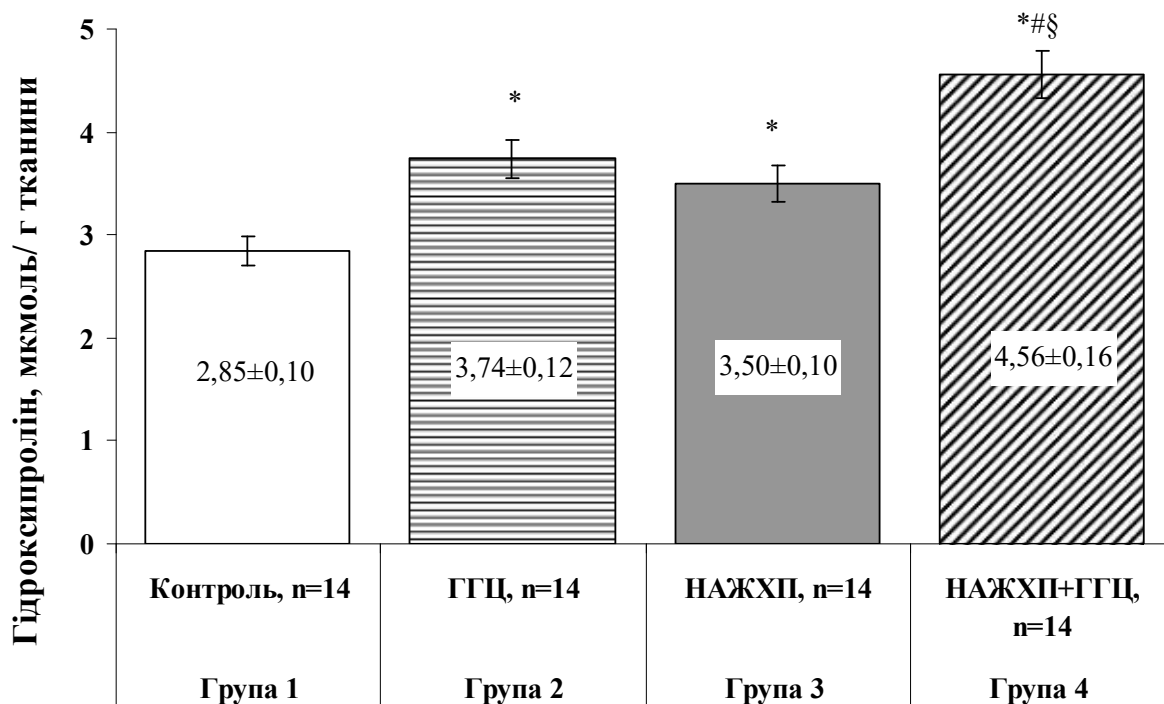


Рис. 3.3 Вміст гідроксипроліну в печінці щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (* - $p < 0,05$ відносно групи 1; # - $p < 0,05$ відносно групи 2; § - $p < 0,05$ відносно групи 3); $M \pm m$.

Виникає питання щодо патогенетичних механізмів, які можуть прискорювати трансформацію простого стеатозу у стеатогепатит за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Як відомо, провідним чинником «другого удару» при НАЖХП є оксидативний стрес, тому далі ми оцінили показники про- та антиоксидантної систем в печінці щурів.

Встановлено, що ізольоване застосування тіолактону гомоцистеїну ініціювало оксидативний стрес та пригнічувало активність антиоксидантної

системи в гепатоцитах: у щурів групи 2 активність ключового продуцента супероксид-аніону NADPH-оксидази була достовірно вищою на 57,7 %, натомість активність СОД та тіоредоксинредуктази – нижчою на 30,4 та 14,9 %, ніж у щурів групи 1 (табл. 3.7). ВЖД також спричиняла оксидативний стрес: у щурів групи 3 активність NADPH-оксидази також була вищою – на 53,7 %, а активність СОД та тіоредоксинредуктази – нижчою на 15,7 та 12,9 %, ніж у щурів групи 1. Зауважимо, що в умовах ізольованої ГГЦ спостерігалось більш суттєве порушення антиоксидантної активності, ніж в умовах ізольованої ВЖД.

Таблиця 3.7

Активність ензимів прооксидантної та антиоксидантної систем в печінці щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоною ГГЦ (M±m)

Групи щурів		NADPH-оксидаза, нмоль / хв·мг протеїну	СОД, ум.од. / мг протеїну	Тіоредоксинредуктаза, нмоль DTNB / хв·мг протеїну
1	Контроль, n=14	1,23±0,04	3,69±0,11	5,83±0,14
2	ГГЦ, n=14	1,94±0,03 [*]	2,57±0,18 [*]	4,96±0,22 [*]
3	ВЖД, n=14	1,89±0,04 [*]	3,11±0,16 ^{*#}	5,08±0,17 [*]
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	2,57±0,10 ^{*#§}	1,98±0,14 ^{*#§}	4,07±0,16 ^{*#§}

Примітки:

- ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
- [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
- [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

В той же час, при поєднанні ВЖД з введенням тіолактону гомоцистеїну прооксидатний ефект в гепатоцитах істотно посилювався: у щурів групи 4 активність NADPH-оксидази була достовірно вищою на 108,9; 32,5 та 36,0 %, активність СОД – достовірно нижчою на 46,3; 23,0 та 36,3 %, а активність тіоредоксинредуктази – достовірно нижчою на 30,2; 17,9 та 19,9 %, ніж у щурів груп 1, 2 та 3.

За умов ізолюваного застосування тіолактону гомоцистеїну та ВЖД, а особливо їхнього поєднання, в гепатоцитах спостерігалось накопичення продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів (табл. 3.8). У щурів групи 2 (ГГЦ) вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) та карбонільних груп протеїнів в печінці був достовірно вищим на 44,7 та 45,0 %, ніж у щурів групи 1. Аналогічні, хоча і менш виразні, порушення в печінці виникали на тлі ВЖД: у щурів групи 3 вміст ТБК-АП та карбонільних груп протеїнів був достовірно вищим на 29,5 та 17,2 %, ніж у щурів групи 1, але вірогідно нижчим (на 10,6 та 19,1 %), ніж у щурів групи 2. При поєднанні ВЖД з ГГЦ оксидативні порушення були найбільш виразними: у щурів групи 4 вміст ТБК-АП був вищим на 104,6; 41,3 та 58,0 %, а вміст карбонільних груп протеїнів – вищим на 66,5; 14,9 та 42,0 %, ніж у щурів груп 1, 2 та 3.

Таким чином, ГГЦ залучена до патогенетичних механізмів «другого удару» пошкодження гепатоцитів при НАЖХП.

Таблиця 3.8

Вміст ТБК-активних продуктів та карбонільованих протеїнів в печінці щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (M±m)

Групи щурів		ТБК-АП, мкмоль / мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну
1	Контроль, n=14	4,38±0,23	2,09±0,08
2	ГГЦ, n=14	6,34±0,14 [*]	3,03±0,14 [*]
3	ВЖД, n=14	5,67±0,19 [#]	2,45±0,10 [#]
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	8,96±0,33 ^{*#§}	3,48±0,12 ^{*#§}

Примітки:

1. ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
2. [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

Одним із найбільш вагомих патогенетичних механізмів трансформації простого стеатозу у НАСГ є імунозапальна та профіброгенна стимуляція за

участі прозапальних цитокінів [203, 289]. Результати наших досліджень засвідчили, що при поєднанні ВЖД з введенням тіолактону гомоцистеїну суттєво підвищується сироватковий вміст TNF α , що може бути наслідком посилення продукції цього цитокіну клітинами Купфера. Так, у щурів групи контролю рівень TNF α в сироватці крові коливався від 5,60 до 10,6 пг/мл (95 % CI) і в середньому становив 7,26 пг/мл (табл. 3.9). У щурів групи 2 рівень TNF α в сироватці крові коливався від 20,6 до 39,7 пг/мл і в середньому склав 28,5 пг/мл. У щурів групи 3 рівень TNF α в сироватці крові становив 14,6-22,7 пг/мл (95 % CI) і в середньому відповідав 18,9 пг/мл. За середніми величинами сироватковий рівень TNF α у щурів груп 2 та 3 був достовірно вищим на 292,6 та 160,3 %, ніж у щурів групи 1.

Слід відзначити, що рівень TNF α в сироватці крові щурів групи 4 був найвищим – від 21,1 до 47,4 пг/мл (95 % CI) і в середньому становив 32,1 пг/мл. Отже, сироватковий рівень TNF α у щурів групи 4 достовірно перевищував такий у щурів груп 1, 2 та 3 на 342,1; 12,6 та 69,8 %, відповідно, що свідчить про адитивний ефект поєднання ВЖД та тіолактонової ГГЦ на продукцію прозапальних медіаторів.

Таблиця 3.9

Вміст TNF α в сироватці крові щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (M \pm m)

Групи щурів		TNF α , пг/мл
1	Контроль, n=14	7,26 \pm 0,52
2	ГГЦ, n=14	28,5 \pm 2,09 [*]
3	ВЖД, n=14	18,9 \pm 0,84 ^{*#}
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	32,1 \pm 2,48 ^{*§}

Примітки:

1. ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
2. [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05);
3. [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 (p<0,05).

3.3 Рівень гідроген сульфїду в печїнцї та їнсуїноподїбного фактору росту-1 в сироватцї кровї щурїв за високожирової дїєти та її поєднання з тїолактоновою гїпергомоцистеїнемією: зв'язок з рївнем гомоцистеїну, маркерами стеатозу та фїброзу печїнки

В процесї метаболїзму сїрковмісних аїноокислот в гепатоцитах активно синтезується газотрансміттер H_2S , який здатний взаємодїяти з активними формами кисню, реакцїйно-здатними лїпїдними дериватами, регулювати активнїсть багатьох редокс-чутливих протеїнів [186]. Нещодавно було вїдмїчено, що H_2S залучений до регуляцїї аутофагїї [184] і, очевидно, може бути причетний до контролю акумуляцїї жиру в гепатоцитах. Тому на наступному етапї ми дослїдили вплив 60-добового застосування ВЖД та тїолактону гомоцистеїну на вміст H_2S в печїнцї щурїв.

Встановлено, що 60-добове введення тїолактону гомоцистеїну на тлї СД, як і 60-добове їзольоване застосування ВЖД спричиняло зниження вмісту H_2S в печїнцї (рис. 3.4). Так, вміст H_2S в печїнцї щурїв групи 1 (контроль) коливався вїд 4,33 до 6,29 мкг/г тканини (95 % СІ), а в групї 2 (ГГЦ) – в межах 2,78-5,05 (95 % СІ) мкг/г тканини і за середнїми величинами був достовїрно нижчим на 26,3 % (критерїй Мана-Уїтнї, $p=0,000$). Вміст H_2S в печїнцї у щурїв групи 3 (ВЖД) становив 3,49-4,74 мкг/г тканини (95 % СІ) і був достовїрно нижчим на 21,0 %, нїж у щурїв групи 1 (критерїй Мана-Уїтнї, $p=0,000$). Отже, їзольоване застосування тїолактону гомоцистеїну та ВЖД забезпечувало формування помїрного дефїциту H_2S в печїнцї. В той же час, застосування тїолактону гомоцистеїну у поєднаннї з ВЖД забезпечувало розвиток виразного дефїциту H_2S в печїнцї: у щурїв групи 4 вміст H_2S становив 2,45-4,07 (95 % СІ) мкг/г тканини і був достовїрно нижчим на 38,9 %, нїж у щурїв групи 1 (критерїй Мана-Уїтнї, $p=0,000$). Крім того, вміст H_2S в печїнцї у щурїв групи 4 був достовїрно нижчим на 17,1 %, нїж у щурїв групи 2, та на 22,6 % нижчим, нїж у щурїв групи 3 (критерїй Краскела-Уоллїса, $p=0,000$).

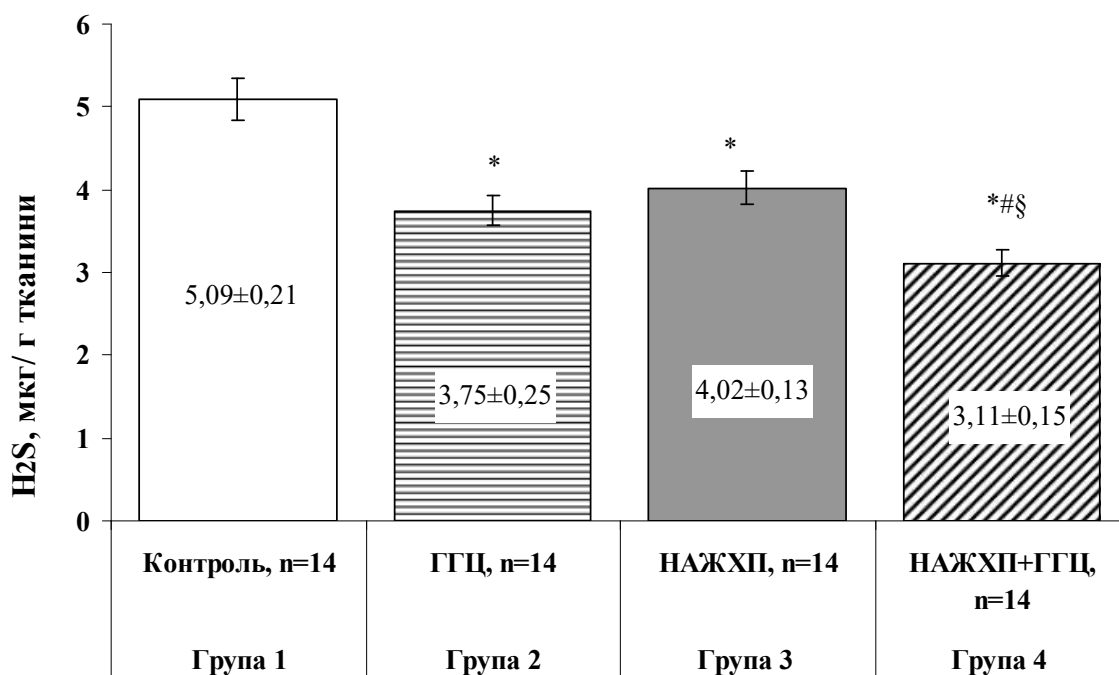


Рис. 3.4 Вміст H₂S в печінці щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (* - p<0,05 відносно групи 1; # - p<0,05 відносно групи 2; § - p<0,05 відносно групи 3); M±m.

Отже, за ізольованої тіолактонової ГГЦ, як і за ізольованої ВЖД, відмічається вірогідне зменшення вмісту H₂S в печінці, однак найбільш суттєвий дефіцит цієї біологічно активної молекули формується саме за умов поєднаної дії вказаних стеатогенних чинників. Зниження вмісту H₂S в гепатоцитах може бути вагомим чинником трансформації простого стеатозу у НАСГ та прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

До чинників, що мають антифіброзну дію та детермінують репараційний потенціал печінки, належить IGF-1 [192, 195, 208]. IGF-1 залучений до регуляції метаболізму вуглеводів та ліпідів, посилює чутливість клітин до інсуліну, запобігає мітохондріальній дисфункції та підвищує продукцію АТФ, контролює диференціацію та проліферацію гепатоцитів та інших клітин [70, 192]. На сьогодні бракує інформації щодо ролі IGF-1 в патогенетичних механізмах НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Тому на наступному етапі ми

вивчили вміст цього фактору росту в сироватці крові щурів за умов ВЖД, ГГЦ та їхнього поєднання.

Результати наших досліджень засвідчили, що за умов застосування тіолактону гомоцистеїну та ВЖД суттєво знижується сироватковий вміст IGF-1. Так, у щурів групи контролю рівень IGF-1 в сироватці крові коливався від 266,0 до 352,4 нг/мл (95 % CI) і в середньому становив 303,4 нг/мл. У щурів групи 2 рівень IGF-1 в сироватці крові коливався від 166,0 до 281,3 нг/мл і в середньому склав 208,2 нг/мл. У щурів групи 3 рівень IGF-1 в сироватці крові становив 201,2-310 нг/мл (95 % CI) і в середньому відповідав 255,9 нг/мл. За середніми величинами сироватковий рівень IGF-1 у щурів груп 2 та 3 був достовірно нижчим на 31,4 та 15,7 %, ніж у щурів групи 1 (критерій Манна-Уїтні, $p=0,000$ та $p=0,021$).

Слід відзначити, що рівень IGF-1 в сироватці крові щурів групи 4 був найнижчим – від 141,2 до 203,1 нг/мл (95 % CI) і в середньому становив 173,6 нг/мл. Отже, сироватковий рівень IGF-1 у щурів групи 4 виявився достовірно нижчим за такий у щурів груп 1, 2 та 3 на 42,8; 16,6 та 32,2 %, відповідно (критерій Краскела-Уолліса, $p < 0,001$).

Таблиця 3.10

Вміст IGF-1 в сироватці крові щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (M±m)

Групи щурів		IGF-1, нг/мл
1	Контроль, n=14	303,4±7,91
2	ГГЦ, n=14	208,2±11,5 [*]
3	ВЖД, n=14	255,9±9,87 ^{*#}
4	ВЖД + ГГЦ, n=14	173,6±5,48 ^{*#§}

Примітки:

1. ^{*} - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
2. [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$);
3. [§] - достовірність відмінностей відносно групи 3 ($p < 0,05$).

Додаткові докази щодо ролі ГГЦ у формуванні стеатогенного та профіброгенного патерну були отримані на підставі кореляційного аналізу. У першу чергу ми проаналізували наявність асоціативних зв'язків між сироватковим рівнем гомоцистеїну та сироватковим рівнем IGF-1, вмістом H_2S та гідроксипроліну в печінці щурів з ГГЦ та НАЖХП (рис. 3.5).

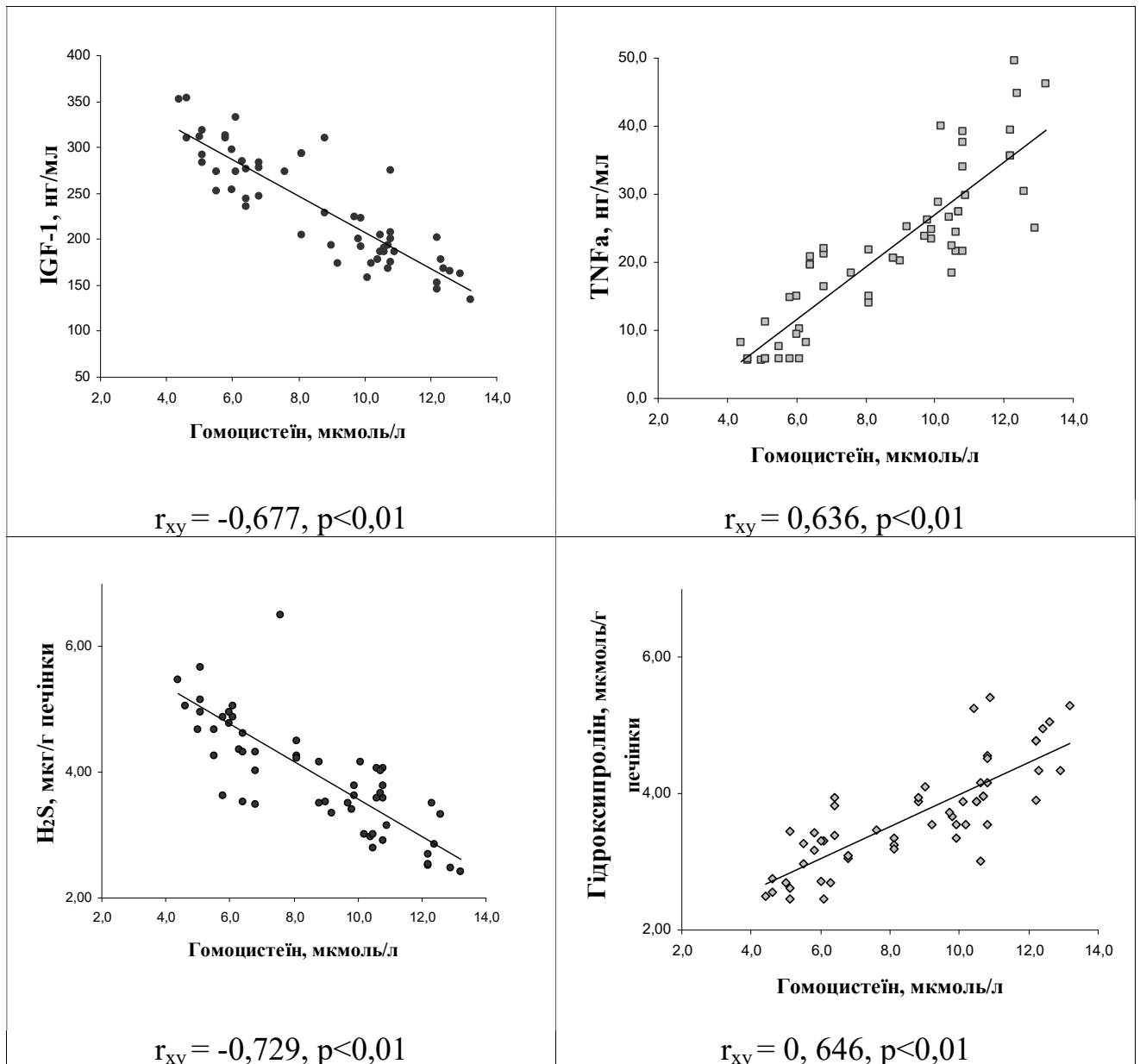


Рис. 3.5 Зв'язок рівня гомоцистеїну з рівнем IGF-1 та TNFα в сироватці крові, рівнем H_2S та гідроксипроліну в печінці у щурів з НАЖХП та ГГЦ (n=28).

Результати наших досліджень показали, що між рівнем гомоцистеїну в сироватці та рівнем профіброгенного медіатора $\text{TNF}\alpha$ виявлявся достовірний значний зв'язок (коефіцієнт кореляції Пірсона $r_{xy} = 0,64$). Натомість, між рівнем гомоцистеїну та рівнем антифіброгенного модулятора IGF-1 реєструвався достовірний обернений зв'язок ($r_{xy} = -0,68$). Також рівень гомоцистеїну прямо корелював з вмістом гідроксипроліну ($r_{xy} = 0,65$) і обернено з вмістом H_2S ($r_{xy} = -0,73$) в печінці.

Оскільки окремі біохімічні параметри відхилялись від параметричного розподілу, виявлені закономірності були перевірені за допомогою кореляційного аналізу за Спірманом (табл. 3.11). Було підтверджено, що серед модуляторів стеатогенезу та фіброгенезу рівень гомоцистеїну найбільш тісно прямо корелював з рівнем $\text{TNF}\alpha$ в сироватці крові ($r_{sp} = 0,62$), в той час як з рівнем IGF-1 в сироватці крові та рівнем H_2S виявлялись значимі обернені зв'язки ($r_{sp} = -0,51$ та $-0,59$, відповідно). Рівень гомоцистеїну достовірно корелював з маркерами дисліпідемії: прямий зв'язок виявлявся з рівнем ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ ($r_{sp} = 0,55; 0,48; 0,51$) і обернений – з рівнем ХС ЛПВЩ ($r_{sp} = -0,50$) в сироватці крові. Однак, більш тісний прямий зв'язок зареєстрований рівнем гомоцистеїну та вмістом ЗХС та ТГ у печінці ($r_{sp} = 0,61; 0,63$), а обернений зв'язок – з печінковим вмістом фосфоліпідів ($r_{sp} = -0,46$).

Також достовірний прямий зв'язок виявлявся між рівнем гомоцистеїну та маркерами цитолізу та некрозапальних змін в гепатоцитах – активністю АЛТ та ГГТ в сироватці крові ($r_{sp} = 0,55; 0,68$), а також з маркером ремоделювання сполучної тканини – рівнем гідроксипроліну ($r_{sp} = 0,74$).

Вміст гомоцистеїну тісно корелював з маркерами оксидативного стресу в печінці: прямо - з активністю NADPH-оксидази, рівнем ТБК-АП та карбонільних груп протеїнів ($r_{sp} \geq 0,58$), обернено – з активністю СОД та тіоредоксинредуктази ($r_{sp} = -0,64$ та $-0,61$). Таким чином, високий рівень гомоцистеїну в сироватці крові виявився вагомою детермінантою продукції модуляторів «множинного удару» - $\text{TNF}\alpha$, H_2S та IGF-1 за умов НАЖХП.

**Коефіцієнти кореляції Спирмана між модуляторами та маркерами
печінкового стеатогенезу та фіброгенезу у щурів з НАЖХП та ГГЦ (n=28)**

Показники	Модулятори стеатогенезу та фіброгенезу			
	Гомоцистеїн	TNF α	H ₂ S	IGF-1
Гомоцистеїн	1,000	0,622**	-0,591**	-0,506**
TNF α	0,622**	1,000	-0,395*	-0,398*
H ₂ S (печінка)	-0,591**	-0,395*	1,000	0,468*
IGF-1	-0,506**	-0,398*	0,468*	1,000
Біохімічні показники сироватки крові				
ЗХС	0,547**	0,457*	-0,542**	-0,457*
ТГ	0,479*	0,345	-0,317	-0,371*
ХС ЛПВЩ	-0,496*	-0,383*	0,361	0,366
ХС ЛПНЩ	0,514**	0,325	-0,502**	-0,341
ХС ЛПДНЩ	0,485*	0,342	-0,330	-0,390*
АЛТ	0,549**	0,343	-0,368	-0,583**
ГГТ	0,681**	0,473*	-0,594**	-0,523**
Альбумін	-0,445*	-0,345	0,233	0,050
Біохімічні показники печінки				
ЗХС	0,613**	0,334	-0,592**	-0,408*
ТГ	0,634**	0,630**	-0,571**	-0,470*
Фосфоліпіди	-0,458	-0,384*	0,529**	0,351
NADPH-оксидаза	0,698**	0,317	-0,564**	-0,335
Тіоредоксинредуктаза	-0,638**	-0,407*	0,604**	0,503**
СОД	-0,614**	-0,306	0,646**	0,323
ТБК-АП	0,699**	0,473*	-0,548**	0,465*
Карбонільні групи	0,582**	0,542**	-0,474*	-0,388*
Гідроксипролін	0,740**	0,479*	-0,603**	-0,544**
Біометричні показники				
ІМТ	0,600**	0,321	-0,501**	-0,450*
Індекс ожиріння	0,599**	0,340	-0,528**	-0,444*
П/С	-0,746**	-0,365	0,411*	0,487*

Примітка. Достовірність коефіцієнта кореляції r_{sp} * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$.

Кореляційний аналіз засвідчив, що зниження рівня IGF-1 в сироватці крові достовірно асоціювалось зі зниженням рівня H_2S в печінці ($r_{Sp} = 0,47$) та підвищенням рівнем $TNF\alpha$ в сироватці крові ($r_{Sp} = -0,40$). За умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, рівень IGF-1 достовірно обернено корелював з активністю АЛТ та ГГТ ($r_{Sp} = -0,58; -0,52$), печінковим вмістом гідроксипроліну ($r_{Sp} = -0,54$), маркерами стеатозу печінки ($r_{Sp} = -0,40-0,47$), а також прямо корелював з активністю тіоредоксинредуктази в печінці ($r_{Sp} = 0,50$).

Вагомою детермінантою трансформації стеатозу у НАСГ може бути зниження вмісту H_2S в печінці. Між вмістом H_2S в печінці та рівнем $TNF\alpha$ в сироватці крові виявлявся достовірний обернений зв'язок ($r_{Sp} = -0,40$). Також вміст H_2S в печінці достовірно обернено корелював з маркерами деструкції гепатоцитів (активністю ГГТ в сироватці крові), маркерами дисліпідемії та печінкового стеатозу (вмістом ЗХС, ТГ в сироватці та печінці), маркерами оксидативного стресу - активністю NADPH-оксидази, вмістом ТБК-АП, карбонільних груп ($r_{Sp} = -0,47-0,59$). Між печінковим вмістом H_2S та маркерами антиоксидантного захисту (активністю тіоредоксинредуктази та СОД), вмістом фосфоліпідів в печінці виявлялись прямі зв'язки ($r_{Sp} = 0,53-0,65$). Крім того, вміст H_2S обернено корелював з рівнем гідроксипроліну у печінці ($r_{Sp} = -0,60$).

Аналіз біометричних показників також підтвердив, що можливим механізмом акселерації стеатогенного ефекту ВЖД в умовах ГГЦ є пригнічення синтезу IGF-1 та формування дефіциту H_2S в гепатоцитах. Так, за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, рівень гомоцистеїну в сироватці крові прямо корелював з ІМТ та індексом ожиріння ($r_{Sp} = 0,59-0,60$) та обернено з відношенням П/С ($r_{Sp} = -0,70$). Натомість, між вказаними біометричними показниками та сироватковим рівнем IGF-1 та печінковим рівнем H_2S виявлялись достовірні кореляційні зв'язки, які мали протилежну спрямованість: обернений зв'язок - з ІМТ та індексом ожиріння ($r_{Sp} = -0,44-0,53$) та прямий зв'язок – з відношенням П/С ($r_{Sp} = 0,41-0,49$).

Резюме. Результатами експериментальних досліджень показано, що ГГЦ є вагомим чинником, який прискорює прогресування НАЖХП та трансформацію простого стеатозу у стеатогепатит. Зауважимо, що розвиток експериментальної НАЖХП супроводжується розвитком легкої ГГЦ (сироватковий рівень гомоцистеїну підвищився на 38,2 %, $p < 0,05$), в той час як патогенетично значущим є поєднання НАЖХП з середньо-важкою або важкою ГГЦ, що була створена введенням тіолактону гомоцистеїну (рівень гомоцистеїну підвищився на 114,2 %, $p < 0,001$). Ізольована ГГЦ не викликала суттєвих змін масо-ростових параметрів у щурів на тлі СД, однак достовірно збільшувала стеатогенний ефект ВЖД і забезпечувала більш значний приріст ІМТ, маси вісцерального жиру та індексу ожиріння (на 8,9; 28,0 та 18,5 %, $p < 0,05$) порівняно із щурами з ізольованою НАЖХП. Також у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, більш суттєво підвищувалась відносна маса печінки, збільшувалась відносна маса селезінки та знижувалось відношення П/С (на 7,03; 19,2 та 14,1 %, $p < 0,05$ відповідно), ніж у щурів з ізольованою НАЖХП. За умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, більш суттєво порушувався функціональний стан печінки (зростала активність ГГТ та АЛТ, знижувався рівень альбуміну), більш суттєво зростав вміст ЗХС та ТГ та знижувався вміст фосфоліпідів в печінці, підвищувався вміст гідроксипроліну в печінці. При поєднанні НАЖХП з ГГЦ формувалась проатерогенна дисліпідемія, яка характеризувалась більш високим рівнем ЗХС та ТГ, ХС ЛПНЩ на тлі зниження рівня ХС ЛПВЩ, в той час як за умов ізольованої НАЖХП здебільшого підвищувався рівень ТГ та ХС ЛПДНЩ в сироватці крові. Механізми прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, можуть реалізуватись через потенціювання оксидативного стресу шляхом підвищення активності NADPH-оксидази і пригнічення активності СОД та тіоредоксинредуктази; а також через порушення репараційного та антифіброзного потенціалу гепатоцитів шляхом зменшення вмісту H_2S в печінці, зниження рівня IGF-1 та підвищення рівня $TNF\alpha$ в сироватці крові.

Питання щодо фармакологічної корекції НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, поки залишається відкритим. Наявність проатерогенних дисліпідемій у хворих на НАЖХП може вимагати застосування гіполіпідемічних засобів, однак їх вплив на біохімічні чинники прогресування стеатозу та фіброзу печінки (зокрема, вміст H_2S в печінці та рівень IGF-1 в сироватці крові) потребує окремого вивчення. Тому наступний розділ роботи був присвячений дослідженню впливу симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на біохімічні показники стеатозу та фіброзу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [40, 42, 47, 48, 53, 54, 232, 233].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ СИМВАСТАТИНУ ТА ОМЕГА-3 ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ
КИСЛОТ НА ЧИННИКИ ПРОГРЕСУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
НЕАЛКОГОЛЬНОЇ ЖИРОВОЇ ХВОРОБИ ПЕЧІНКИ, АСОЦІЙОВАНОЇ З
ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

Лікування НАЖХП на стадії простого стеатозу передбачає модифікацію способу життя та корекцію дієти, але на стадії НАСГ вимагає медикаментозної терапії. Сучасна стратегія фармакологічної корекції НАЖХП спрямована на зменшення оксидативного стресу, дисліпідемії, інсулінорезистентності та інших асоційованих метаболічних розладів [1, 80, 291]. Результати попереднього розділу роботи засвідчили, що НАЖХП, асоційована з ГГЦ, вирізняється більш агресивними біохімічними порушеннями на рівні оксидативного стресу, акумуляції жиру та гідроксипроліну в гепатоцитах, дисліпідемії, продукції прозапального та профіброгенного медіатора TNF α , пригніченням продукції чинників, які детермінують антифіброзний та репараційний потенціал печінки, зокрема IGF-1 та H₂S. Між тим вплив лікарських засобів, які можуть застосовуватись за умов НАЖХП, на вміст гомоцистеїну, IGF-1 та H₂S залишається не визначеним.

Для корекції метаболічних порушень за умов експериментальної НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, були обрані засоби з гіполіпідемічною дією - симвастатин та препарат ω -3 ПНЖК. Симвастатин є інгібітором ГМГ-КоА-редуктази, гіполіпідемічним засобом з політропними властивостями: забезпечує зниження рівня загального холестерину, ЛПНЩ та ЛПДНЩ; інгібує запальну реакцію в судинах, покращує ендотеліальну функцію; зменшує оксидативний стрес [27, 110, 230]. Препарати ω -3 ПНЖК також відносяться до гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями, оскільки поряд зі зниженням гіпертриацилгліцеролемії справляють гіпохолестеролемічну, антиоксидантну, антиагрегантну, цитопротекторну дію

[197]. В окремих роботах було засвідчено, що прийом ω -3 ПНЖК знижував рівень гомоцистеїну у пацієнтів з ЦД2 [295] та гемодіалітичних пацієнтів [142], а прийом симвастатину супроводжувався зниженням рівня гомоцистеїну у пацієнтів з дисліпідемією [74, 143, 313].

Завданням цього розділу дослідження було вивчення впливу симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на біохімічні зміни в печінці та чинники їх прогресування (рівень гомоцистеїну, IGF-1 та H_2S) за умов експериментальної НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

4.1 Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на масо-ростові параметри та показники функціонального стану печінки у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією

Дослідження проведено на 100 щурах-самцях із початковою масою 210-280 г, розподілених на 7 дослідних груп (n=10) та 3 контрольних підгрупи (n=10). У 7 груп тварин моделювали НАЖХП, асоційовану з ГГЦ, упродовж 60 діб як описано у попередніх розділах. Через 60 діб частину щурів з НАЖХП+ГГЦ (група 2) та щурів контрольної підгрупи 1 виводили з дослідження. З 61-ої доби і до завершення дослідження 6 груп щурів з НАЖХП + ГГЦ переводили на СД (із фізіологічним вмістом жирів та інших нутрієнтів), з них тваринам чотирьох груп в/шл 1 раз на добу вводились гіполіпідемічні засоби: симвастатин (20 мг/кг маси тіла) або препарат ω -3 ПНЖК (150 мг/кг маси тіла) упродовж 14 та 28 діб, відповідно. Дози препаратів узгоджувались з наведеними в літературі і не викликали загибелі тварин [66, 127]. Дві групи щурів з НАЖХП+ГГЦ отримували лише СД упродовж 14 або 28 діб, відповідно.

Результати попереднього розділу роботи засвідчили, що при аліментарному перевантаженні щурів жирами стеатогенний ефект істотно посилюється в умовах ГГЦ. Аналіз масо-ростових параметрів підтвердив, що

за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, реєструвались достовірно вищі показники ІМТ, сумарної маси внутрішнього (ретроперітонеального, епідідимального і вісцерального) жиру та індексу ожиріння - на 30,3; 83,3 та 53,9 %, відповідно, ніж в групі контролю (табл. 4.1). Застосування СД упродовж 14 та 28 діб у щурів з НАЖХП+ГГЦ (групи 3 та 4) не викликало вірогідних змін ІМТ, сумарної маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння: ці показники залишились достовірно вищими (на 30-80 %), ніж у щурів відповідних контрольних груп, і практично не відрізнялись від таких у щурів групи 2.

Застосування симвастатину на тлі СД упродовж 14 та 28 діб також не викликало змін масо-ростових параметрів у щурів з НАЖХП + ГГЦ: у тварин груп 5 та 6 залишились достовірно вищими такі показники як ІМТ (на 23,5 та 30,7 %), маса вісцерального жиру (на 79,4 та 78,8 %) та індекс ожиріння (на 51,4 та 41,4 %) порівняно з відповідним контролем, і не відрізнялись від таких у тварин з груп 3 та 4, які отримували лише СД.

Виявилось, що 14-добове застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД також не забезпечувало корекції масо-ростових параметрів у щурів з НАЖХП+ГГЦ (група 7). Однак, через 28 діб у щурів, які отримували препарат ω -3 ПНЖК (група 8) реєструвалась тенденція до зменшення ознак вісцерального ожиріння: ІМТ, сумарна маса внутрішнього жиру та індекс ожиріння були достовірно нижчими (на 10,5; 18,4 та 16,5 %), ніж у нелікованих щурів (група 2), але залишались вірогідно вищими (на 18,5; 51,5 та 26,5 %), ніж у щурів групи контролю.

Таким чином, за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, нормалізація кількості жирів в раціоні тварин упродовж 14 та 28 діб не спричиняла антиліпогенного ефекту, але і не стимулювала подальшого накопичення вісцерального жиру. Застосування симвастатину не впливало на акумуляцію вісцерального жиру у щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни дослідження. Натомість 28-добовий прийом препарату ω -3 ПНЖК сприяв зменшенню ІМТ та зниженню вмісту вісцерального жиру у щурів з НАЖХП+ГГЦ.

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на масо-ростові показники та індекс ожиріння у щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ (M \pm m, n=10)

Групи щурів		ІМТ, г/см ²	Сумарна маса внутрішнього жиру, г	Індекс ожиріння (г жиру / 100 г маси тіла)
1	Контроль-1	0,66 \pm 0,01	8,89 \pm 0,18	2,52 \pm 0,06
	Контроль -2 (14 діб)	0,68 \pm 0,01	9,03 \pm 0,16	2,57 \pm 0,08
	Контроль-3 (28 діб)	0,65 \pm 0,01	8,78 \pm 0,23	2,56 \pm 0,05
2	НАЖХП+ГГЦ	0,86 \pm 0,02*	16,3 \pm 0,75*	3,88 \pm 0,16*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	0,84 \pm 0,01*	15,8 \pm 0,57*	3,77 \pm 0,12*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	0,85 \pm 0,02*	15,9 \pm 0,50*	3,79 \pm 0,13*
	p _{3,4}	>0,05	>0,05	>0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	0,84 \pm 0,02*	16,2 \pm 0,62*	3,89 \pm 0,08*
	p _{5,3}	>0,05	>0,05	>0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	0,83 \pm 0,02*	15,7 \pm 0,81*	3,62 \pm 0,43*
	p _{6,4}	>0,05	>0,05	>0,05
	p _{6,5}	>0,05	>0,05	>0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	0,82 \pm 0,05*	15,0 \pm 0,62*	3,79 \pm 0,21*
	p _{7,3}	>0,05	>0,05	>0,05
	p _{7,5}	>0,05	>0,05	>0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	0,77 \pm 0,03*#	13,3 \pm 0,53*#	3,24 \pm 0,20*#
	p _{8,4}	>0,05	<0,05	<0,05
	p _{8,6}	>0,05	<0,05	>0,05
	p _{8,7}	>0,05	<0,05	>0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно відповідної групи 1 (p<0,05);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05).

У попередньому розділі було встановлено, що поєднання ВЖД з тіолактоною ГГЦ викликає більш суттєвий приріст маси печінки та

селезінки та зниження відношення П/С, ніж ізольоване застосування ВЖД. Аналіз вказаних параметрів підтвердив, що за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, відносна маса печінки та відносна маса селезінки були достовірно вищими на 24,4 % та 36,0 %, а відношення П/С – достовірно нижчим на 23,0 %, ніж в групі контролю (табл. 4.2). Застосування СД упродовж 14 та 28 діб у щурів з НАЖХП+ГГЦ (групи 3 та 4) не викликало вірогідних змін відносної маси печінки, відносної маси селезінки та відношення П/С: ці показники достовірно відрізнялись від таких (на 22-31 %), у щурів відповідних контрольних груп, і були співставними з такими у щурів групи 2.

Застосування симвастатину на тлі СД упродовж 14 та 28 діб не спричиняло змін вказаних показників у щурів з НАЖХП + ГГЦ: у тварин груп 5 та 6 відносна маса печінки та селезінки залишились достовірно вищими (на 20,5 та 23,1 %), а відношення П/С - достовірно нижчим (на 18,6 %) порівняно з відповідним контролем, і не відрізнялись від таких у тварин з груп 3 та 4, які отримували лише СД.

Виявилось, що 14-добове застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД також не забезпечувало суттєвих змін маси печінки та селезінки у щурів з НАЖХП+ГГЦ (група 7). Однак, через 28 діб у щурів, які отримували препарат ω -3 ПНЖК (група 8) реєструвалась тенденція до нормалізації вказаних показників: відносна маса печінки та селезінки не мали достовірних відмінностей від групи контролю і були достовірно нижчими (на 12,0 та 14,7 %), ніж у нелікованих щурів (група 2). Однак, відношення П/С у щурів групи 8 залишилось вірогідно нижчим (на 15,5 %), ніж у щурів групи контролю.

Таким чином, за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, нормалізація дієти упродовж 14 та 28 діб не забезпечувала зниження маси печінки та селезінки. Застосування симвастатину не викликало нормалізації вказаних параметрів у щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни дослідження, однак не спричиняло подальшого прогресування ознак гепато- та спленомегалії. Прийом препарату ω -3 ПНЖК сприяв зниженню відносної маси печінки та селезінки у щурів з

НАЖХП+ГГЦ лише за умов 28-добового застосування (що може бути опосередкованим свідченням регресу ектопічних жирових депо), хоча суттєво не впливав на вказані параметри при 14-добовому прийомі.

Таблиця 4.2

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на відносну масу печінки та селезінки у щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		Відносна маса печінки, %	Відносна маса селезінки, %	П/С
1	Контроль-1	2,75±0,06	0,25±0,01	3,13±0,09
	Контроль -2 (14 діб)	2,78±0,07	0,26±0,02	3,12±0,11
	Контроль-3 (28 діб)	2,81±0,06	0,27±0,01	3,09±0,11
2	НАЖХП+ГГЦ	3,42±0,07*	0,34±0,02*	2,41±0,09*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	3,37±0,20*	0,34±0,01*	2,46±0,29*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	3,26±0,18*	0,31±0,01*	2,57±0,22*
	$p_{3,4}$	>0,05	>0,05	>0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	3,35±0,13*	0,32±0,03*	2,54±0,11*
	$p_{5,3}$	>0,05	>0,05	>0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	3,18±0,16*	0,33±0,01*	2,27±0,19*
	$p_{6,4}$	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{6,5}$	>0,05	>0,05	>0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	3,41±0,20*	0,35±0,02*	2,41±0,17*
	$p_{7,3}$	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{7,5}$	>0,05	>0,05	>0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	3,01±0,17 [#]	0,29±0,02 [#]	2,61±0,12*
	$p_{8,4}$	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{8,6}$	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{8,7}$	>0,05	<0,05	>0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Раніше ми зазначали, що при поєднанні ВЖД та ГГЦ суттєво посилюються біохімічні ознаки порушення функціонального стану печінки. Результати, наведені в табл. 4.3, підтвердили, що за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, виявлялись маркери деструкції гепатоцитів - активність АСТ та ГГТ в сироватці крові була достовірно вищою на 102,4 та 143,3 % порівняно з контролем, а також помірно пригнічувалась білоксинтезуюча функція печінки – сироватковий рівень альбуміну був достовірно нижчим на 7,60 %, відповідно (табл. 4.3). Слід відзначити, що за вмістом сечовини та білірубіну суттєвих відмінностей між вказаними групами не спостерігалось.

Застосування СД упродовж 14 діб у щурів з НАЖХП+ГГЦ (група 3) не викликало вірогідних змін біохімічних показників сироватки крові, але при 28-добовому застосуванні реєструвалась тенденція ($p=0,1$) до зниження активності АЛТ в сироватці крові, в той час як активність ГГТ та вміст альбуміну суттєво не змінились. При застосуванні симвастатину упродовж 14 діб у щурів групи 5 не виявлялось суттєвої динаміки маркерів цитолізу, однак через 28 діб у щурів групи 6 активність АЛТ та ГГТ була достовірно нижчою (на 18,3 та 12,1 %), ніж у щурів групи 2.

Застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД більш ефективно покращувало функціональний стан печінки, ніж застосування симвастатину. Так, у щурів групи 7, які отримували препарат ω -3 ПНЖК упродовж 14 діб, активність АЛТ та ГГТ в сироватці була достовірно нижчою на 38,6 та 29,0 % ніж у щурів групи 2 (неліковані), на 28,6 та 22,4 % нижчою, ніж у щурів групи 3 (НАЖХП + СД 14 діб), а також на 28,7 та 27,2 % нижчою, ніж у щурів групи 5 (НАЖХП + СД + симвастатин 14 діб). Через 28 діб у щурів, які отримували препарат ω -3 ПНЖК (група 8), активність АЛТ та ГГТ наближалась до такої в контролі і була достовірно нижчою на 41,4 та 37,1 %, ніж у щурів групи 6, які отримували симвастатин упродовж 28 діб. Також у щурів групи 8 спостерігалось достовірне підвищення рівня альбуміну в сироватці крові (на 6,63 %) порівняно з групою 2, що свідчить про відновлення білоксинтезуючої

функції печінки. Отже, застосування симвастатину практично не впливало на рівень трансаміназемії, натомість застосування препарату ω -3 ПНЖК суттєво зменшувало біохімічні ознаки пошкодження гепатоцитів за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

Таблиця 4.3

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на біохімічні показники сироватки крові щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		АЛТ, Од/л	ГГТ, мккат/л	Альбумін г/л	Сечовина ммоль/л	Загальний білірубін, мкмоль/л
1	Контроль-1	45,7±3,05	1,36±0,11	40,8±0,72	5,26±0,24	8,84±0,32
	Контроль -2 (14 діб)	48,5±2,31	1,44±0,14	41,6±0,83	5,07±0,19	8,63±0,41
	Контроль-3 (28 діб)	49,4±2,54	1,37±0,13	41,2±0,74	5,33±0,21	8,76±0,28
2	НАЖХП+ГГЦ	92,5±5,94 *	3,31±0,13 *	37,7±0,41 *	5,28±0,24	9,31±0,57
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	81,8±6,52 *	3,03±0,12 *	38,1±0,12 *	5,16±0,24	8,98±0,46
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	79,5±4,42 *	3,17±0,16 *	38,7±0,68 *	4,97±0,27	9,08±0,28
	$p_{3,4}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	79,7±2,97 *	3,23±0,16 *	38,9±0,57	5,04±0,10	9,44±0,55
	$p_{5,3}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	75,6±4,38 *#	2,91±0,44 *#	39,0±1,16	4,75±0,32	9,22±0,34
	$p_{6,4}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{6,5}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	56,8±2,81 *#	2,35±0,16 *#	39,4±0,80	4,89±0,25	8,68±0,40
	$p_{7,3}$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{7,5}$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	44,3±1,98 #	1,83±0,15 *#	40,2±0,80 #	4,93±0,28	9,39±0,28
	$p_{8,4}$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{8,7}$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{8,6}$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Як зазначалось раніше, поєднання ВЖД з ГГЦ викликало найбільш суттєві порушення ліпідного спектру сироватки крові: крім триацилгліцеролемії та підвищення рівня ХС ЛПДНЩ, які спостерігались за умов ізольованого застосування ВЖД, реєструвалось більш значне зростання рівня ЗХС та ХС ЛПНЩ, а також зниження рівня ХС ЛПВЩ. Як свідчать результати, наведені в табл. 4.4, за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП+ГГЦ сироваткові рівні ТГ та ЛПДНЩ були достовірно вищими на 98,2 та 104 %, ЗХС та ХС ЛПНЩ - вищими на 52,8 та 241,7 %, а рівень ХС ЛПВЩ – достовірно нижчим на 22,7 %, ніж у щурів групи контролю.

Нормалізація кількості жирів в раціоні тварин не забезпечувала належної корекції вмісту ліпідних фракцій в сироватці крові щурів з НАЖХП+ГГЦ: за станом на 14 та 28 добу досліду у щурів груп 3 та 4 залишалась гіперхолестеролемія, гіпертриацилгліцеролемія, підвищення рівнів ХС ЛПНЩ (на 220,8 та 121,4 %), ХС ЛПДНЩ (на 79,1 та 88,0 %), зниження рівня ХС ЛПВЩ (на 15,4 та 11,3 %) порівняно з відповідним контролем.

Застосування симвастатину ефективно зменшувало ознаки проатерогенної дисліпідемії за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, у різні терміни досліду. Зокрема, у щурів групи 5, що отримували симвастатин 14 діб на тлі СД, рівні ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ та ЛПДНЩ були достовірно нижчими на 28,5; 15,9; 55,8 та 25,6 %, ніж у щурів групи 3 (СД 14 діб). Також у щурів групи 6, що отримували симвастатин 28 діб, відмічалось ще більш суттєве зменшення дисліпідемії: рівні ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ та ЛПДНЩ були на 31,4; 44,8; 59,7 та 44,7 % нижчими, ніж у щурів групи 4 (СД 28 діб). За умов НАЖХП+ГГЦ застосування симвастатину упродовж 14 та 28 діб викликало тенденцію до підвищення рівня ХС ЛПВЩ, але не забезпечувало його повної нормалізації.

Застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД також ефективно коригувало показники ліпідного обміну за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Так, у щурів групи 7, що отримували препарат ω -3 ПНЖК упродовж 14 діб,

рівні ЗХС, ТГ та ЛПДНЩ були достовірно нижчими на 17,2; 32,6 та 32,5 %, ніж у щурів групи 3.

Таблиця 4.4

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на вміст ліпідів в сироватці крові щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		ЗХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ХС ЛПВЩ, ммоль/л	ХС ЛПНЩ, ммоль/л	ХС ЛПДНЩ, ммоль/л
1	Контроль-1	1,25±0,07	0,57±0,06	0,75±0,03	0,24±0,08	0,25±0,03
	Контроль -2 (14 діб)	1,29±0,06	0,53±0,06	0,78±0,03	0,27±0,05	0,24±0,03
	Контроль-3 (28 діб)	1,24±0,05	0,55±0,06	0,71±0,04	0,28±0,05	0,25±0,02
2	НАЖХП+ГГЦ	1,91±0,10 *	1,13±0,09 *	0,58±0,05 *	0,82±0,11 *	0,51±0,04 *
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	1,86±0,10 *	0,95±0,08 *	0,66±0,06 *	0,77±0,15 *	0,43±0,04 *
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	1,72±0,09 *	1,05±0,08 *	0,63±0,04 *	0,62±0,12 *	0,47±0,04 *
	$p_{3,4}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	1,33±0,08 #	0,72±0,06 *#	0,67±0,05	0,34±0,08 #	0,32±0,03 *#
	$p_{5,3}$	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	1,18±0,06 #	0,58±0,06 #	0,67±0,04	0,25±0,04 #	0,26±0,03 #
	$p_{6,4}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	$p_{6,5}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	1,54±0,08 *#	0,64±0,06 #	0,74±0,06 #	0,51±0,10 *#	0,29±0,03 *#
	$p_{7,3}$	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	<0,05
	$p_{7,5}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	1,32±0,06 #	0,51±0,05 #	0,76±0,04 #	0,33±0,04 #	0,23±0,02 #
	$p_{8,4}$	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
	$p_{8,7}$	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	$p_{8,6}$	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Також у щурів групи 8, що отримували препарат ω -3 ПНЖК 28 діб, реєструвалось ще більш значне зменшення дисліпідемії: рівні ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ та ЛПДНЩ були на 23,3; 48,6; 46,8 та 51,1 % нижчими, ніж у щурів групи 4. Крім того, за умов НАЖХП+ГГЦ застосування препарату ω -3 ПНЖК упродовж 14 та 28 діб викликало суттєве підвищення рівня ХС ЛПВЩ: у щурів груп 7 та 8 цей показник був достовірно вищим на 27,5 та 31,0 %, ніж у щурів групи 2, та на 12,1 та 20,6 % вищим, ніж у щурів групи 3 або 4, відповідно.

Слід відзначити, що за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, застосування симвастатину за гіпохолестеролемічним ефектом достовірно перевершувало застосування препарату ω -3 ПНЖК, але поступалось йому за здатністю коригувати рівень антиатерогенних ЛПВЩ у різні терміни дослідження.

У попередньому розділі було зазначено, що при поєднанні ВЖД та ГГЦ спостерігається більш суттєве зростання індексу атерогенності порівняно із ізольованим застосуванням ВЖД. Зауважимо, що у щурів з НАЖХП+ГГЦ індекс атерогенності вірогідно перевищував такий в контролі на 253,5 % (табл. 4.5). У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 діб отримували СД, не виявлялось статистично значущих змін індексу атерогенності, який залишався на 221,5 та 139,0 % вищим, ніж у щурів відповідної контрольної групи.

Застосування симвастатину ефективно коригувало індекс атерогенності за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, у різні терміни дослідження. Зокрема, у щурів групи 5, що отримували симвастатин 14 діб, індекс атерогенності був достовірно нижчим 48,3 %, ніж у щурів групи 3. У щурів групи 6, що отримували симвастатин 28 діб, відмічалось ще більш суттєве зменшення індексу атерогенності: показник був на 56,5 % нижчим, ніж у щурів групи 4.

Застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД також ефективно зменшувало індекс атерогенності за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 7 цей показник був достовірно нижчим на 40,7 %, ніж у щурів групи 3, а у щурів групи 8 – нижчим на 58,7 %, ніж у щурів групи 4. Слід відзначити, що суттєвих відмінностей за індексом атерогенності у щурів,

лікованих симвастатином або препаратом ω -3 ПНЖК, у різні терміни експерименту не спостерігалось.

Таблиця 4.5

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на індекс атерогенності у щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		Індекс атерогенності
1	Контроль-1	0,71 \pm 0,15
	Контроль -2 (14 діб)	0,65 \pm 0,08
	Контроль-3 (28 діб)	0,77 \pm 0,07
2	НАЖХП+ГГЦ	2,51 \pm 0,35*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	2,09 \pm 0,39*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб) p _{3,4}	1,84 \pm 0,24* >0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб) p _{5,3}	1,08 \pm 0,17# <0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб) p _{6,4} p _{6,5}	0,80 \pm 0,09# <0,05 >0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб) p _{7,3} p _{7,5}	1,24 \pm 0,25*# >0,05 >0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб) p _{8,4} p _{8,7} p _{8,6}	0,76 \pm 0,07# <0,05 >0,05 >0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Таким чином, при НАЖХП, асоційованій з ГГЦ, застосування і симвастатину, і препарату ω -3 ПНЖК забезпечує зменшення проатерогенного патерну із певними особливостями. Симвастатин більш ефективно коригує рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ, а препарат ω -3 ПНЖК – рівень ТГ та ХС ЛПВЩ, що в цілому забезпечує співставне зниження індексу атерогенності у щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни досліджу.

На наступному етапі була проведена оцінка впливу гіполіпідемічної фармакотерапії на біохімічні маркери стеатозу та фіброзу печінки за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

4.2 Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на біохімічні маркери стеатозу та фіброзу печінки у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією

Як зазначено у попередньому розділі, ізольоване застосування ВЖД справляло помірний стеатогенний ефект, який значно посилювався в умовах ГГЦ. Результати, наведені в табл. 4.6, підтвердили, що у щурів з НАЖХП+ГГЦ відмічається достовірне підвищення вмісту ТГ (на 198,9 %) та ЗХС (на 63,7 %) та зниження вмісту фосфоліпідів (на 28,9 %) в печінці порівняно з групою контролю.

Зниження кількості жирів в раціоні тварин не забезпечувало належної корекції вмісту ліпідних фракцій в печінці за умов НАЖХП+ГГЦ: за станом на 14 та 28 добу досліду у щурів груп 3 та 4 виявлялись більш високі рівні ТГ (на 192,7 та 205,6 %) та ЗХС (на 54,3 та 60,1 %), натомість нижчі рівні фосфоліпідів (на 28,0 та 26,1 %), ніж у щурів відповідних контрольних груп.

За умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, застосування симвастатину упродовж 14 та 28 діб практично не виявляло антистеатогенного ефекту: вміст ТГ в печінці у щурів груп 5 та 6 не відрізнявся від такого у нелікованих щурів групи 2 і був достовірно вищим (на 181,7 та 180,2 %), ніж у щурів групи контролю. Однак, застосування симвастатину зменшувало акумуляцію холестеролу в гепатоцитах: у щурів груп 5 та 6 вміст ЗХС в печінці був достовірно меншим на 12,1 та 27 %, ніж у щурів групи 2. Більш ефективно знижувався печінковий вміст ЗХС при 28-добовому застосуванні симвастатину: цей показник у щурів групи 6 був достовірно нижчим (на 17,0 %), ніж у щурів групи 5. Застосування симвастатину упродовж 14 та 28 діб не забезпечувало корекції вмісту фосфоліпідів в печінці, який у щурів груп 5 та 6

залишився вірогідно нижчим (на 26,5 та 19,5 %), ніж в контролі, і практично не відрізнявся від такого у щурів групи 2.

Таблиця 4.6

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на вміст ліпідів в печінці щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		Вміст ліпідів, мкмоль / г тканини		
		ТГ	ЗХС	Фосфоліпіди
1	Контроль-1	18,8±0,91	6,72±0,38	25,6±0,48
	Контроль -2 (14 діб)	19,1±0,83	6,87±0,36	27,5±1,18
	Контроль-3 (28 діб)	17,7±0,87	6,37±0,27	26,1±0,49
2	НАЖХП+ГГЦ	56,2±2,79*	11,0±0,53*	18,2±1,12*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	55,9±2,85*	10,6±0,34*	19,8±1,95*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб) p _{3,4}	54,1±2,68* >0,05	10,2±0,46* >0,05	19,3±1,12* >0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб) p _{5,3}	53,8±2,77* >0,05	9,67±0,41* [#] >0,05	20,2±1,65* >0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб) p _{6,4} p _{6,5}	49,6±3,25* >0,05 >0,05	8,03±0,37* [#] <0,05 <0,05	21,0±1,46* >0,05 >0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб) p _{7,3} p _{7,5}	47,7±2,79* [#] <0,05 <0,05	9,92±0,34* >0,05 >0,05	22,3±0,84* [#] >0,05 >0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб) p _{8,4} p _{8,7} p _{8,6}	32,3±2,12* [#] <0,05 <0,01 <0,01	8,43±0,38* [#] <0,05 <0,05 >0,05	23,0±1,16* [#] <0,05 >0,05 >0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Виявилось, що за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД забезпечувало антистеатогенний ефект у різні

терміни досліджу, однак найбільш виразна динаміка спостерігалась при 28-добовому застосуванні. Так, вміст ТГ в печінці у щурів груп 7 та 8 був достовірно нижчим на 15,1 та 42,5 %, ніж у нелікованих щурів групи 2, та на 14,2 та 40,2 % нижчим, ніж у щурів груп 3 та 4, проте залишився на 169,5 та 82,5 % вищим, ніж в групі контролю. За антистеатогенним ефектом препарат ω -3 ПНЖК достовірно перевершував симвастатин при 14-добовому та 28-добовому застосуванні: вміст ТГ у щурів груп 7 та 8 був достовірно нижчим на 11,3 та 34,9 %, ніж у щурів груп 5 та 6.

За умов НАЖХП+ГГЦ препарат ω -3 ПНЖК також зменшував акумуляцію холестеролу в гепатоцитах, однак зміни були вірогідними лише при 28-добовому застосуванні. Зокрема, у щурів групи 8 вміст ЗХС в печінці був достовірно меншим на 23,4 %, ніж у щурів групи 2. Більш ефективно знижувався печінковий вміст ЗХС при 28-добовому застосуванні препарату ω -3 ПНЖК: цей показник у щурів групи 8 був достовірно нижчим (на 15,0 %), ніж у щурів групи 7. За впливом на вміст ЗХС в печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ препарат ω -3 ПНЖК наближався симвастатину лише при 28-добовому застосуванні. На відміну від симвастатину, застосування препарату ω -3 ПНЖК упродовж 14 та 28 днів спричиняло підвищення вмісту фосфоліпідів в печінці: у щурів груп 7 та 8 цей показник був вірогідно вищим (на 12,6 та 19,2 %), ніж у щурів груп 3 та 4. Таким чином, за здатністю коригувати стеатоз печінки за умов ГГЦ більш ефективним виявився препарат ω -3 ПНЖК, який не лише зменшував акумуляцію нейтральних жирів та холестеролу, а сприяв нормалізації вмісту фосфоліпідів в гепатоцитах, що може свідчити про мембраностабілізуючий ефект.

У попередньому розділі зазначалось, що при поєднанні ВЖД з ГГЦ акселеруються процеси печінкового фіброгенезу, зокрема більш суттєво зростають ознаки ремоделювання колагенових протеїнів в печінці. Так, за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП+ГГЦ вміст гідроксипроліну був достовірно вищим на 67,3 %, ніж у щурів групи контролю (табл. 4.7). У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 днів отримували СД, не виявлялось

статистично значущих змін вмісту гідроксипроліну, який залишався на 68,7 та 67,4 % вищим, ніж у щурів відповідної контрольної групи. Застосування симвастатину також не спричиняло змін вмісту гідроксипроліну у печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ, у різні терміни дослідю. Зокрема, у щурів групи 5 та 6 цей показник залишився на 55,0 та 64,1 % вищим, ніж в контролі, і практично не відрізнявся від такого у нелікованих тварин групи 2.

Таблиця 4.7

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на вміст гідроксипроліну в печінці щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ (M \pm m, n=10)

Групи щурів		Гідроксипролін, мкмоль/ г тканини
1	Контроль-1	2,84 \pm 0,11
	Контроль -2 (14 діб)	2,78 \pm 0,12
	Контроль-3 (28 діб)	2,73 \pm 0,10
2	НАЖХП+ГГЦ	4,75 \pm 0,24*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	4,69 \pm 0,19*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб) p _{3,4}	4,57 \pm 0,18* >0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб) p _{5,3}	4,31 \pm 0,14* >0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб) p _{6,4} p _{6,5}	4,48 \pm 0,16* >0,05 >0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб) p _{7,3} p _{7,5}	3,73 \pm 0,20*# <0,05 <0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб) p _{8,4} p _{8,7} p _{8,6}	3,21 \pm 0,14*# <0,05 <0,05 <0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05).

Натомість застосування препарату ω -3 ПНЖК ефективно зменшувало вміст гідроксипроліну за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 7 цей показник був достовірно нижчим на 40,7 %, ніж у щурів групи 3, а у щурів групи 8 – нижчим на 58,7 %, ніж у щурів групи 4. Слід відзначити, що при 28-добовому застосуванні препарату ω -3 ПНЖК вміст гідроксипроліну зменшувався більш істотно, ніж при 14-добовому застосуванні: цей показник у щурів групи 8 був достовірно нижчим на 13,9 %, ніж у щурів групи 7.

Крім того, за здатністю коригувати печінковий вміст гідроксипроліну препарат ω -3 ПНЖК вірогідно перевершував симвастатин у різні терміни досліду: цей показник в групах 7 та 8 був вірогідно нижчим на 13,5 та 28,3 %, ніж в групах 5 та 6.

Як відомо, провідним патогенетичним механізмом прогресування НАЖХП є оксидативний стрес. У попередньому розділі було засвідчено, що за умов поєднання ВЖД з ГГЦ суттєво потенціюється дія чинників «другого удару» та формується дисбаланс між прооксидантними та антиоксидантними системами в печінці. Результати, наведені в табл. 4.8, підтвердили, що за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП+ГГЦ активність прооксиданту NADPH-оксидази була достовірно вищою на 116,5 %, натомість активність антиоксидантних ензимів СОД та тіоредоксинредуктази була нижчою на 46,7 та 31,2 %, ніж у щурів групи контролю.

Нормалізація аліментарного споживання жирів не впливала на виразність оксидативного стресу в печінці за умов НАЖХП+ГГЦ: за станом на 14 та 28 добу досліду у щурів груп 3 та 4 виявлялись більш висока активність NADPH-оксидази (на 109,9 та 100,8 %), натомість нижча активність СОД (на 43,3 та 45,3 %) та тіоредоксинредуктази (на 29,6 та 24,8 %), ніж у щурів відповідних контрольних груп.

Симвастатин практично не впливав на активність NADPH-оксидази в печінці при 14-добовому застосуванні, але при 28-добовому застосуванні спостерігалось пригнічення активності цього ензиму: у щурів групи 6 цей показник був достовірно нижчим на 20,7 %, ніж у нелікованих щурів групи 2.

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на активність ензимів прооксидантної та антиоксидантної систем в печінці щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		NADPH- оксидаза, нмоль / хв·мг протеїну	СОД, ум.од. /·мг протеїну	Тіоредоксин- редуктаза, нмоль DTNB / хв·мг протеїну
1	Контроль-1	1,27±0,05	3,68±0,15	5,93±0,21
	Контроль -2 (14 діб)	1,31±0,05	3,72±0,15	6,04±0,22
	Контроль-3 (28 діб)	1,29±0,07	3,71±0,16	5,88±0,26
2	НАЖХП+ГГЦ	2,75±0,15*	1,96±0,19*	4,08±0,24*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	2,71±0,14*	2,11±0,16*	4,25±0,20*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб) $p_{3,4}$	2,59±0,13* >0,05	2,03±0,17* >0,05	4,42±0,26* >0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб) $p_{5,3}$	2,46±0,13* >0,05	2,15±0,18* >0,05	4,17±0,23* >0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб) $p_{6,4}$ $p_{6,5}$	2,18±0,11*# <0,05 >0,05	2,31±0,17* >0,05 >0,05	4,68±0,22* >0,05 >0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб) $p_{7,3}$ $p_{7,5}$	2,15±0,14*# <0,05 >0,05	3,08±0,19*# <0,05 <0,05	5,06±0,22*# <0,05 <0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб) $p_{8,4}$ $p_{8,7}$ $p_{8,6}$	1,91±0,15*# <0,05 >0,05 >0,05	3,12±0,21*# <0,05 <0,05 >0,05	5,14±0,20*# <0,05 >0,05 >0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Застосування симвастатину не спричиняло суттєвих змін активності антиоксидантних ензимів в печінці: у щурів груп 5 та 6 активність СОД була вірогідно нижчою на 20,9 та 37,7 %, а активність тіоредоксинредуктази - на 31,0 та 20,4 % порівняно з контролем, і практично не відрізнялась від цих показників у щурів групи 2. Натомість, за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, застосування препарату ω -3 ПНЖК забезпечувало антиоксидантний ефект у різні терміни дослідження, однак найбільш виразна динаміка спостерігалась при 28-добовому застосуванні. Так, активність NADPH-оксидази в печінці у щурів груп 7 та 8 була достовірно нижчою на 21,8 та 30,5 %, ніж у щурів групи 2, та на 20,7 та 12,4 % нижчою, ніж у щурів груп 3 та 4. Застосування препарату ω -3 ПНЖК викликало підвищення активності антиоксидантних ензимів в печінці: у щурів груп 7 та 8 активність СОД була вірогідно вищою на 46,0 та 53,7 %, а активність тіоредоксинредуктази – вищою на 19,1 та 16,3 % порівняно з такою в групах 3 та 4, відповідно.

За умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, в печінці спостерігалось накопичення продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів (табл. 4.9). У щурів групи 2 вміст ТБК-АП та карбонільних груп протеїнів в печінці був достовірно вищим на 116,9 та 57,3 %, ніж у щурів групи контролю. У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 діб отримували СД, не виявлялось статистично значущих змін вмісту продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів в печінці: у щурів групи 3 та 4 вміст ТБК-АП залишався на 103,4 та 102,5 % вищим, а карбонільних груп – на 52,0 та 42,6 % вищим, ніж у щурів відповідної контрольної групи. 14-добове застосування симвастатину також не спричиняло змін вмісту продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів у печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ, однак при 28-добовому застосуванні спостерігалась тенденція до зниження маркерів оксидативного стресу. Так, у щурів групи 6 вміст ТБК-АП та карбонільованих протеїнів був вірогідно нижчим на 11,5 та 14,9 %, ніж у нелікованих тварин групи 2.

Натомість, застосування препарату ω -3 ПНЖК забезпечувало ефективне зниження вмісту продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів у печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни дослідю.

Таблиця 4.9

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на вміст ТБК-активних продуктів та карбонільованих протеїнів в печінці щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ ($M \pm m$, $n=10$)

Групи щурів		ТБК-АП, мкмоль / мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну
1	Контроль-1	4,33±0,27	2,18±0,12
	Контроль -2 (14 діб)	4,41±0,31	2,21±0,13
	Контроль-3 (28 діб)	4,36±0,22	2,23±0,14
2	НАЖХП+ГГЦ	9,39±0,33*	3,43±0,15*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	8,97±0,31*	3,36±0,15*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	8,83±0,25*	3,18±0,13*
	$p_{3,4}$	>0,05	>0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	8,75±0,30*	3,27±0,17*
	$p_{5,3}$	>0,05	>0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	8,31±0,27 ^{*#}	2,92±0,12 ^{*#}
	$p_{6,4}$	>0,05	>0,05
	$p_{6,5}$	>0,05	>0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	5,83±0,30 ^{*#}	2,63±0,15 ^{*#}
	$p_{7,3}$	<0,05	<0,05
	$p_{7,5}$	<0,05	<0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	4,92±0,29 [#]	2,47±0,12 [#]
	$p_{8,4}$	<0,05	<0,05
	$p_{8,7}$	<0,05	<0,05
	$p_{8,6}$	<0,05	>0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- [#] - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Так, вміст ТБК-АП та карбонільних груп в печінці щурів групи 7 був достовірно нижчим на 35,0 та 29,8 %, ніж у щурів групи 3, а у щурів групи 8 – на 44,3 та 22,3 % нижчим, ніж у щурів групи 4. Крім того, у щурів груп 7 та 8 вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів був достовірно нижчим, ніж у щурів груп 5 та 6: вміст ТБК-АП - на 43,8 та 40,8 %, а карбонільних груп – на 19,6 та 15,4 %, відповідно.

Таким чином, за результатами біохімічних досліджень препарат ω -3 ПНЖК істотно перевершував симвастатин за антистеатозною та антифіброзною дією, впливаючи на чинники першого та другого ударів в умовах НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Виникає питання щодо молекулярних механізмів, які можуть пояснювати відмінності антистеатогенної та антифіброзної ефективності гіполіпідемічних засобів за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

4.3 Вплив симвастатину та омега-3 поліненасичених жирних кислот на рівень гомоцистеїну, інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфід у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією

На наступному етапі роботи була проведена оцінка впливу засобів з гіполіпідемічною дією на такі потужні профіброгенні чинники як рівень гомоцистеїну та TNF α . Слід відзначити, що за станом на 60 добу у щурів з НАЖХП+ГГЦ рівень гомоцистеїну був достовірно вищим на 106 %, ніж у щурів групи контролю (табл. 4.10). У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 діб отримували СД, не виявлялось статистично значущих змін вмісту гомоцистеїну, який залишався на 102,8 та 101,1 % вищим, ніж у щурів відповідної контрольної групи. Застосування симвастатину не викликало вірогідних змін рівня гомоцистеїну в сироватці крові у щурів з НАЖХП+ГГЦ, у різні терміни дослідження. Зокрема, у щурів групи 5 та 6 цей показник залишився

на 97,5 та 95,7 % вищим, ніж в контролі, і практично не відрізнявся від такого у нелікованих тварин групи 2.

Виявилось, що застосування препарату ω -3 ПНЖК сприяло зниженню рівня гомоцистеїну в сироватці крові за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 7 цей показник був достовірно нижчим на 15,6 %, ніж у щурів групи 3, а у щурів групи 8 – нижчим на 29,6 %, ніж у щурів групи 4. Слід відзначити, що при 28-добовому застосуванні препарату ω -3 ПНЖК динаміка ГГЦ була більш суттєвою, ніж при 14-добовому застосуванні: рівень гомоцистеїну у щурів групи 8 виявився достовірно нижчим на 18,0 %, ніж у щурів групи 7. Крім того, за здатністю коригувати ГГЦ препарат ω -3 ПНЖК вірогідно перевершував симвастатин у різні терміни дослідження: рівень гомоцистеїну в групах 7 та 8 був вірогідно нижчим на 13,3 % та 27,6 %, ніж в групах 5 та 6, відповідно.

Результати наших досліджень засвідчили, що на 60 добу у щурів з НАЖХП+ГГЦ спостерігалось підвищення рівня TNF α на 328,4 %, порівняно з контролем, що може свідчити про активацію його продукції клітинами Купфера. У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 діб отримували СД, не виявлялось статистично значущих змін сироваткового рівня TNF α , який на 321,5 та 313,8 % перевищував такий у щурів відповідної контрольної групи.

Виявилось, що застосування симвастатину сприяло зниженню прозапальної стимуляції за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 5 та 6 рівень TNF α , був достовірно нижчим на 37,4 та 43,3 % порівняно з таким у нелікованих тварин групи 2, а також на 35,6 та 32,5 % нижчим порівняно з таким у щурів груп 3 та 4, відповідно.

Застосування препарату ω -3 ПНЖК також сприяло зниженню рівня TNF α в сироватці крові за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 7 цей показник був достовірно нижчим на 45,4 %, ніж у щурів групи 3, а у щурів групи 8 – нижчим на 43,4 %, ніж у щурів групи 4. Слід відзначити, що рівень TNF α у щурів групи 8 виявився достовірно нижчим на 16,0 %, ніж у щурів групи 6. Отже, при 28-добовому застосуванні препарат ω -3 ПНЖК вірогідно

перевершував симвастатин за здатністю коригувати рівень профіброгенного модулятора TNF α в сироватці крові.

Таблиця 4.10

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на рівень гомоцистеїну та TNF α в сироватці крові щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ (M \pm m, n=10)

Групи щурів		Гомоцистеїн, мкмоль/л	TNF α , пг/мл
1	Контроль-1	5,68 \pm 0,49	7,61 \pm 0,52
	Контроль -2 (14 діб)	5,62 \pm 0,48	7,52 \pm 0,54
	Контроль-3 (28 діб)	5,57 \pm 0,51	7,66 \pm 0,58
2	НАЖХП+ГГЦ	11,7 \pm 0,43*	32,6 \pm 3,12*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	11,4 \pm 0,51*	31,7 \pm 2,22*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	11,2 \pm 0,46* p _{3,4} >0,05	27,9 \pm 2,69* >0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	11,1 \pm 0,55* p _{5,3} >0,05	20,4 \pm 1,30** <0,001
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	10,9 \pm 0,49* p _{6,4} p _{6,5} >0,05 >0,05	18,8 \pm 1,00** <0,05 >0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	9,62 \pm 0,44** p _{7,3} p _{7,5} <0,05 <0,05	17,3 \pm 1,15** <0,05 >0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	7,89 \pm 0,67** p _{8,4} p _{8,7} p _{8,6} <0,05 <0,05 <0,05	15,8 \pm 0,94** <0,05 >0,05 <0,05

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,05);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,05).

До чинників, що мають антифіброзну дію та детермінують репараційний потенціал печінки, належать H_2S та IGF-1. Як було зазначено раніше, за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, формується значний дефіцит H_2S в печінці та знижується рівень IGF-1 в сироватці крові.

Результати, наведені в табл. 4.11, підтвердили, що у щурів з НАЖХП+ГГЦ вміст H_2S в печінці був достовірно нижчим на 40,0 %, ніж в контролі. У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 діб отримували СД, не виявлялось статистично значущих змін вмісту H_2S в печінці, який залишався на 37,5 та 41,6 % нижчим, ніж у щурів контрольної групи.

Застосування симвастатину не викликало вірогідних змін вмісту H_2S в печінці у щурів з НАЖХП+ГГЦ: у щурів групи 5 та 6 цей показник залишився на 41,7 та 37,5 % нижчим, ніж в контролі, і суттєво не відрізнявся від такого у щурів групи 2.

В той же час, застосування препарату ω -3 ПНЖК сприяло зменшенню дефіциту H_2S в печінці за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 7 цей показник був достовірно вищим на 20,4 %, ніж у щурів групи 3, а у щурів групи 8 – вищим на 41,2 %, ніж у щурів групи 4. За здатністю коригувати вміст H_2S в печінці препарат ω -3 ПНЖК вірогідно перевершував симвастатин у різні терміни дослідження: цей показник в групах 7 та 8 був вірогідно вищим на 28,9 % та 32,0 %, ніж в групах 5 та 6, відповідно.

Аналіз сироваткового рівня IGF-1 засвідчив найбільш суттєві міжгрупові відмінності. Зауважимо, що на 60 добу у щурів з НАЖХП+ГГЦ спостерігалось вірогідне зниження рівня IGF-1 в сироватці крові на 41,4 %, порівняно з контролем. У щурів з НАЖХП+ГГЦ, які упродовж 14 та 28 діб отримували СД, не виявлялось статистично значущих змін рівня IGF-1, який залишався на 41,0 та 40,7 % нижчим, ніж у щурів відповідної контрольної групи.

Встановлено, що застосування симвастатину спричиняло зниження рівня IGF-1 в сироватці крові за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів групи 5 та 6 рівень IGF-1 був достовірно нижчим на 49,4 та 57,4 % порівняно з

групою контролю, а також на 12,2 та 25,6 % нижчим порівняно з таким нелікованих тварин групи 2, відповідно.

Таблиця 4.11

Вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на рівень IGF-1 в сироватці крові та вміст H_2S в печінці щурів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ (M \pm m, n=10)

Групи щурів		H_2S , мкг/ г тканини	IGF-1, нг/мл
1	Контроль-1	5,12 \pm 0,33	297,2 \pm 12,7
	Контроль -2 (14 діб)	5,09 \pm 0,25	301,1 \pm 8,92
	Контроль-3 (28 діб)	5,15 \pm 0,24	304,3 \pm 13,4
2	НАЖХП+ГГЦ	3,07 \pm 0,24*	174,1 \pm 5,96*
3	НАЖХП+ГГЦ + СД (14 діб)	3,18 \pm 0,18*	177,9 \pm 4,56*
4	НАЖХП+ГГЦ + СД (28 діб)	3,01 \pm 0,24*	180,2 \pm 6,55*
	$p_{3,4}$	>0,05	>0,05
5	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (14 діб)	2,97 \pm 0,25*	152,8 \pm 6,84*#
	$p_{5,3}$	>0,05	<0,05
6	НАЖХП+ГГЦ + СД + симвастатин (28 діб)	3,22 \pm 0,19*	129,6 \pm 7,82*#
	$p_{6,4}$	>0,05	<0,01
	$p_{6,5}$	>0,05	<0,05
7	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (14 діб)	3,83 \pm 0,25*#	195,6 \pm 5,29*#
	$p_{7,3}$	<0,05	<0,05
	$p_{7,5}$	<0,05	<0,05
8	НАЖХП+ГГЦ + СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	4,25 \pm 0,24*#	228,3 \pm 11,5*#
	$p_{8,4}$	<0,05	<0,05
	$p_{8,7}$	>0,05	<0,05
	$p_{8,6}$	<0,05	<0,001

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p < 0,05$);
- # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p < 0,05$).

Натомість, застосування препарату ω -3 ПНЖК сприяло підвищенню рівня IGF-1 в сироватці крові за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ: у щурів

групи 7 цей показник був достовірно вищим на 12,3 та 9,94 %, ніж у щурів груп 2 та 3, а у щурів групи 8 – вищим на 31,1 та 26,7 %, ніж у щурів груп 2 та 4. При цьому, що рівень IGF-1 у щурів груп 7 та 8 виявився достовірно вищим на 28,0 та 76,2 %, ніж у щурів груп 5 та 6. Отже, вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на рівень IGF-1 в сироватці крові виявився абсолютно протилежним, що до певної міри може свідчити про вплив гіполіпідемічних засобів на продукцію цього фактору в печінці.

Резюме. Доведено, що нормалізація кількості жирів в раціоні тварин упродовж 14 та 28 діб не спричиняє антиліпогенного ефекту, не забезпечує корекції масо-ростових параметрів (ІМТ, індексу ожиріння, відношення П/С), суттєво не впливає на функціональний стан печінки, маркери стеатозу та фіброзу у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ. Гіполіпідемічні препарати (симвастатин та препарат ω -3 ПНЖК) також не викликають суттєвих змін масо-ростових параметрів у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, при 14-добовому застосуванні, але 28-добове застосування препарату ω -3 ПНЖК сприяє зниженню ІМТ, індексу ожиріння, регресу гепато- та спленоменгальї, зменшує рівень АЛТ та ГГЦ, на відміну від симвастатину.

Застосування гіполіпідемічних препаратів ефективно зменшувало ознаки дисліпідемії із більш виразним ефектом через 28 діб. Симвастатин більш ефективно коригував рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ, а препарат ω -3 ПНЖК – рівень ТГ та ХС ЛПВЩ, що в цілому забезпечувало достовірне зниження індексу атерогенності у щурів з НАЖХП+ГГЦ.

За результатами біохімічних досліджень препарат ω -3 ПНЖК істотно перевершував симвастатин за антистеатозною та антифіброзною дією, більш суттєво коригуючи чинники першого та другого ударів за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Препарат ω -3 ПНЖК зменшував акумуляцію нейтральних жирів та холестеролу, підвищував вміст фосфоліпідів, зменшував ознаки оксидативного стресу (знижував активність NADPH-оксидази, вміст ТБК-АП та карбонільних груп протеїнів) та підвищував активність антиоксидантних ензимів (тіоредоксинредуктази, СОД), що супроводжувалось

зниженням вмісту гідроксипроліну в гепатоцитах. Натомість, симвастатин більш ефективно зменшував вміст холестеролу, помірно знижував активність NADPH-оксидази в гепатоцитах, але не впливав на інші маркери стеатозу та фіброзу печінки.

Встановлено, що відмінності антистеатогенної та антифіброзної ефективності гіполіпідемічних засобів за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, асоціюються з протилежним впливом на симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на чинники прогресування стеатозу, фіброзу печінки та чинники, що детермінують її репараційний потенціал. Препарат ω -3 ПНЖК більш ефективно, ніж симвастатин, знижував рівень гомоцистеїну (на 13,3 та 27,6%, відповідно) та профіброгенного медіатора TNF α в сироватці крові, а також більш ефективно підвищував вміст H₂S в печінці (на 28,9 та 32,0 %) у різні терміни дослідження (на 14 та 28 добу, відповідно).

Застосування симвастатину спричиняло зниження рівня IGF-1 в сироватці крові на 14 та 28 добу (на 12,2 та 25,6 %) відносно групи нелікованих щурів), натомість застосування препарату ω -3 ПНЖК підвищувало рівень цього фактору росту (на 12,3 та 31,1 %), що може свідчити про відновлення його продукції в печінці за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

Виникає питання, в якій мірі зміни біохімічних маркерів стеатозу та фіброзу узгоджуються з морфологічними змінами печінки за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та за умов застосування засобів з гіполіпідемічною дією, що виявили кардинально протилежний вплив на рівень IGF-1 в сироватці крові. Вивченню цього питання присвячений наступний розділ нашої роботи.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [20, 43, 46, 49, 231].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ СИМВАСТАТИНУ ТА ОМЕГА-3 ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ
КИСЛОТ НА МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ З
НЕАЛКОГОЛЬНОЮ ЖИРОВОЮ ХВОРОБОЮ ПЕЧІНКИ,
АСОЦІЙОВАНОЮ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

В попередніх розділах було показано, що за результатами біохімічних досліджень в умовах ГГЦ посилюється стеатогенний ефект ВЖД у щурів. Засвідчено, що НАЖХП, асоційована із ГГЦ, характеризується більш значними порушенням функціонального стану печінки (зростала активність ГГТ та АЛТ, знижувався вміст альбуміну сироватки крові); розвитком проатерогенної дисліпідемії; підвищенням рівня ТГ, ЗХС та гідроксипроліну в печінці; активацією оксидативного стресу; порушенням репараційного (зниження сироваткового рівня IGF-1 та вмісту вміст H_2S в печінці) та антифіброзного (підвищення рівня $TNF\alpha$ в сироватці крові) потенціалу гепатоцитів. Виявилось, що за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, гіполіпідемічні засоби з політропними властивостями виявляють різну ефективність за результатами біохімічних досліджень. Зокрема, препарат ω -3 ПНЖК істотно перевершував симвастатин за антистеатозною та антифіброзною дією, більш суттєво коригуючи чинники «множинного удару» (рівень IGF-1 та $TNF\alpha$ в сироватці крові, вміст H_2S в печінці, активність про- та антиоксидантних ензимів та інші біохімічні порушення).

В окремих дослідженнях було показано, що ω -3 ПНЖК [133] та симвастатин [283] зменшують прояви стеатозу, фіброзу та запалення в печінці тварин при морфологічному дослідженні. Виникає питання щодо морфологічних змін в печінці щурів при НАЖХП, асоційованої із ГГЦ, при застосуванні симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК, що виявили протилежну дію на рівень IGF-1 в сироватці крові.

Завданням цього розділу було: 1) оцінити вплив 60-добової ВЖД та її поєднання з тіолактоною ГГЦ на морфологічні зміни печінки; 2) вивчити зміни морфологічної будови тканини печінки у щурів із НАЖХП, асоційованою із ГГЦ після фармакологічної корекції симвастатином або препаратом ω -3 ПНЖК.

5.1 Морфологічна характеристика експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією.

Дослідження було проведено на 56 білих лабораторних щурах-самцях з початковою масою тіла 210-280 г. Тварини були розподілені на 4 групи (n=14): група 1 (контроль) та група 2 (ГГЦ) отримували СД; група 3 (ВЖД) та група 4 (ВЖД+ГГЦ) отримували ВЖД. Щурам груп 2 та 4 щоденно інтрагастрально вводили тіолактон гомоцистеїну (100 мг/кг на 1% крохмальному гелі), щурі груп порівняння отримували еквівалентну кількість розчинника. Тривалість досліду становила 60 діб.

При макроскопічному дослідженні у щурів контрольної групи печінка була світло-коричневого кольору, рівномірно забарвлена, консистенція щільна. Чітко виражена часточкова будова органу. Серозна оболонка печінки волога, блискуча. Кровоносні судини помірно наповнені кров'ю. При гістологічному дослідженні печінки щурів даної групи патологічних змін в структурі її стромі та паренхіми виявлено не було. Зокрема, порталні зони мали звичайну гістологічну структуру. В клітинному складі пухкої сполучної тканини порталних зон переважали фібробласти, однак виявляли поодинокі лімфоцити та гістіоцити. Кровоносні судини та міжчасточкові жовчні протоки в порталних зонах мали звивисту структуру. Міжчасточкові вени помірно кровонаповнені. Просвіти міжчасточкових жовчних проток не розширені, вільні. Стінки міжчасточкових жовчних проток не потовщені. Міжчасточкові сполучнотканинні перегородки розвинені слабо. Межі класичних печінкових часточок визначали по розташуванню порталних тріад і центральних вен, та

за розташуванням печінкових пластинок і синусоїдів. Печінкові пластинки та синусоїди в класичних печінкових часточках мали радіальний напрямок. В центрі класичних печінкових часточок розташовані центральні вени. Просвіти центральних вен та синусоїдів також помірно наповнені кров'ю. Просвіти синусоїдів були однорідними. Стінки синусоїдів вистелені ендотеліоцитами, між якими розташовані зірчасті макрофагоцити. Гепатоцити щільно прилягали до синусоїдів. В перисинусоїдних просторах виявляли відростки зірчастих макрофагоцитів та тіла і відростки перисинусоїдних ліпоцитів (рис. 5.1.). На поперечних розрізах печінкові пластинки представлені двома рядами гепатоцитів. Останні мали багатогранну форму, були однорідними за формою та розміром. Їх цитоплазма рівномірно забарвлена.

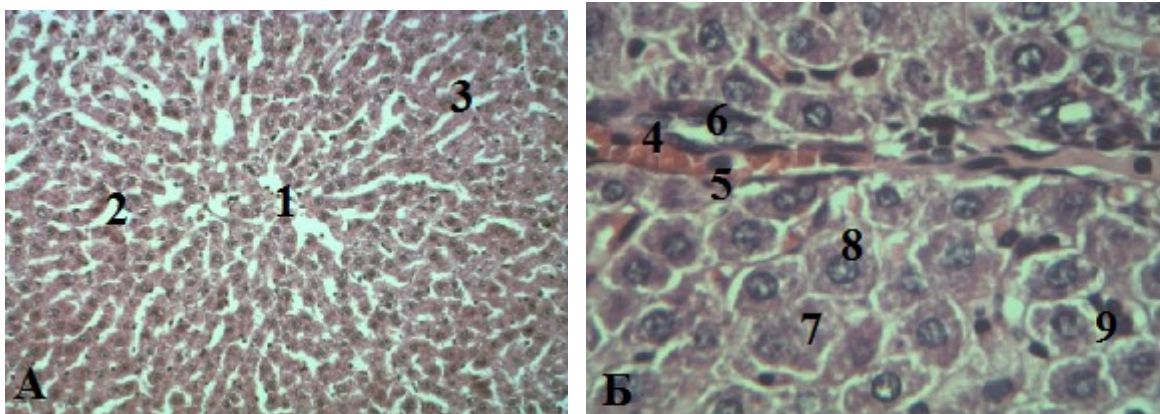


Рис. 5.1 Структура печінки у щурів контрольної групи. Гематоксилін – еозин.
Збільшення: А. Об. х 10. Ок. х 10. Б. Об. х 40. Ок. х 10.

- 1 – центральна вена;
- 2 – синусоїди;
- 3 – печінкові пластинки;
- 4 – портальна зона;
- 5 – просвіт міжчасточкової вени;
- 6 – просвіт між часточкової жовчної протоки;
- 7 – цитоплазма гепатоцита;
- 8 – ядро гепатоцита;
- 9 – зірчасті макрофагоцити.

Ядра в гепатоцитах світлі, розташовані в центрі мали сферичну або овальну форму, містили 1-2 ядерця. Подекуди виявляли гепатоцити, які містили два ядра. В поодиноких гепатоцитах проміжної зони класичних печінкових часточок виявляли жирові включення. Некротично змінені гепатоцити були поодинокими, як правило їх виявляли в центролобулярній зоні класичних печінкових часточок.

При макроскопічному дослідженні печінки у щурів, яких утримували на СД та вводили тіолактон гомоцистеїну (група 2), на 60 добу форма печінки була не зміненою і подібною до такої у щурів контрольної групи. Однак, на відміну від щурів групи контролю, у щурів з ГГЦ виявлено нерівномірне забарвлення печінки - вогнища світло-коричневого кольору межували з червоними смугами, консистенція щільна. Кровоносні судини в воротах печінки повнокровні. У щурів з ГГЦ виявлені зміни в структурі стромі та паренхіми печінки. Портальні зони розширені, а в їх сполучнотканинній стромі наявна гістіолімфоцитарна інфільтрація та набряк інтерстицію. Кровоносні судини портальних триад повнокровні. Просвіти міжчасточкових вен розширені повнокровні. Наявні стаз та крайове стояння лейкоцитів у просвітах міжчасточкових вен. Стінки міжчасточкових артерій потовщені. Просвіти міжчасточкових жовчних проток розширені. У цитоплазмі більшої частини гепатоцитів виявляли вакуолі, особливо навколо центральної вени. В центролобулярних зонах класичних печінкових часточок цитоплазма гепатоцитів бліда, їх мембрани мають не чіткі межі. Виявлені гепатоцити з темною цитоплазмою, ядра в таких клітинах гіперхромні. Частина гепатоцитів містили гіпертрофовані нормохромні ядра з добре вираженими ядерцями. В багатьох полях зору виявляли осередки некрозу декількох гепатоцитів. Навколо таких вогнищ некротично змінених гепатоцитів розташовані гіпертрофовані гепатоцити та лейкоцити. В проміжних зонах класичних печінкових часточок виявили гепатоцити з чисельними великими вакуолями в цитоплазмі. Виявлено гепатоцити з мілко- та крупнокрапельною жировою дистрофією цитоплазми, некротично змінені та 2-х ядерні гепатоцити.

Найменше виражені зміни в гепатоцитах перилобулярних зон класичних печінкових часточок. Їх структура подібна до такої у щурів контрольної групи. Просвіти центральних вен також розширені, повнокровні. Крайове стояння та діapedез лейкоцитів через стінки центральних вен більше виражені, в порівнянні з такими у щурів контрольної групи. Просвіти синусоїдів не однорідні. Виявляли, як розширені повнокровні синусоїди, так і звужені, які не утримували формені елементи крові. Перисинусоїдні простори розширені, в них збільшена чисельність зірчатих макрофагоцитів, перисинусоїдних ліпоцитів та лімфоцитів (рис. 5.2.).

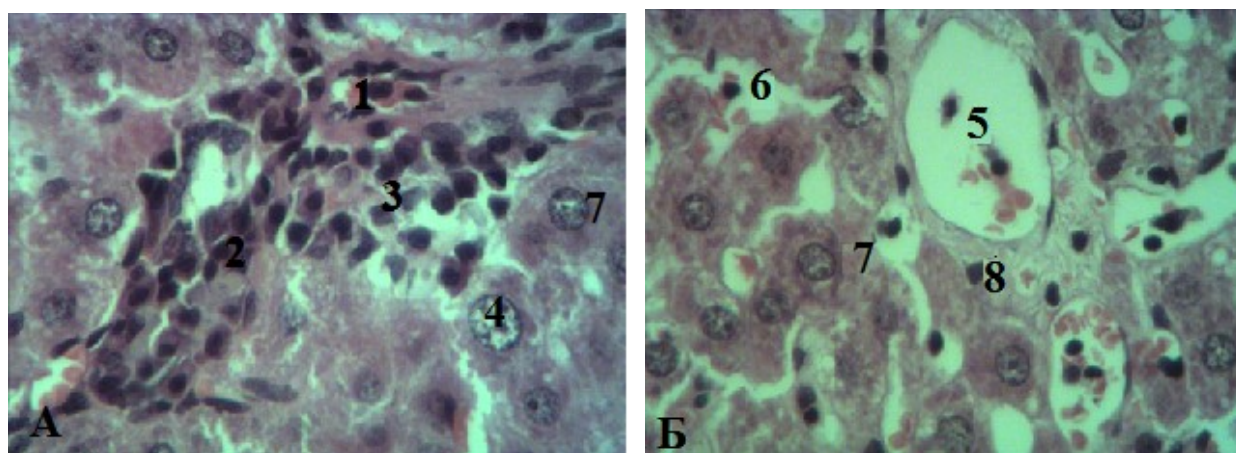


Рис 5.2 Фрагмент печінки щурів із експериментальною ГГЦ на 60 добу. Гематоксилін – еозин. Збільшення: Об. х 40. Ок. х 10.

- 1 – повнокровні просвіти міжчасточкових вен;
- 2 – лейкоцитарна інфільтрація портальних зон;
- 3 – некротично змінені гепатоцити;
- 4 – гіпертрофовані ядра гепатоцитів.
- 5 – просвіт центральної вени;
- 6 – синусоїди;
- 7 – гепатоцити;
- 8 – зірчасті макрофагоцити.

Таким чином у щурів, яким вводили тіолактон гомоцистеїну на тлі СД, наявні осередки дистрофії та некрозу гепатоцитів. Повнокров'я міжчасточкових вен, центральних вен і синусоїдів в класичних печінкових

часточках. Посилений діapedез лейкоцитів крізь стінки вен та виражена лейкоцитарна інфільтрація як в порталних зонах так і в класичних печінкових часточках. У щурів з ГГЦ чисельність гепатоцитів з жировою дистрофією цитоплазми у порівнянні із такими у щурів групи контролю значно більша.

У щурів, яких утримували на ВЖД (група 3), при макроскопічному дослідженні встановлено, що печінка мала неоднорідне забарвлення – вогнища світло-коричневого кольору чергувались з смугами коричневого кольору. Консистенція печінки дрябла, однак структура на розрізі збережена. Кровоносні судини в воротах печінки повнокровні. При аналізі гістологічних препаратів печінки у щурів, яких утримували на ВЖД, на 60 добу від початку експерименту виявили фокальні ділянки некрозу, лімфоцитарну інфільтрацію, мілко- та крупнокрапельну жирову дистрофію цитоплазми гепатоцитів. Структура печінкових пластинок в класичних печінкових часточках порушена, просвіти синусоїдів звужені. Вогнища стеатозу та некрозу гепатоцитів, інфільтровані та оточені лейкоцитами. Клітинний склад інфільтратів представлений переважно лімфоцитами. Частина гепатоцитів з мілко- та крупнокрапельною жировою дистрофією цитоплазми в класичних печінкових часточках складала більше третини від загальної кількості гепатоцитів. Портальні зони розширені за рахунок набряку та лейкоцитарної інфільтрації сполучнотканинної строми. В окремих порталних зонах цілісність стінок кровоносних судин порушена. Також виявляли некробіотичні зміни епітеліоцитів в стінках міжчасточкових жовчних протоків. В центральних зонах класичних печінкових часточок було виявлено некрози гепатоцитів. В класичних печінкових часточках лімфоцити розташовані рівномірно і локалізовані в перисинусоїдальних просторах та просвітах синусоїдів у вигляді «ланцюжків» по 2-3 клітини (рис.5.3).

В централобулярних зонах класичних печінкових часточок виявляли вогнищеві лімфоцитарні інфільтрати. Цитоплазма гепатоцитів містила чисельні вакуолі. Було виявлено гепатоцити, що містили 2 ядра. Східчасті некрози були поодинокими (1-2 східчасті некрози на 10 полів зору) (рис. 5.4.).

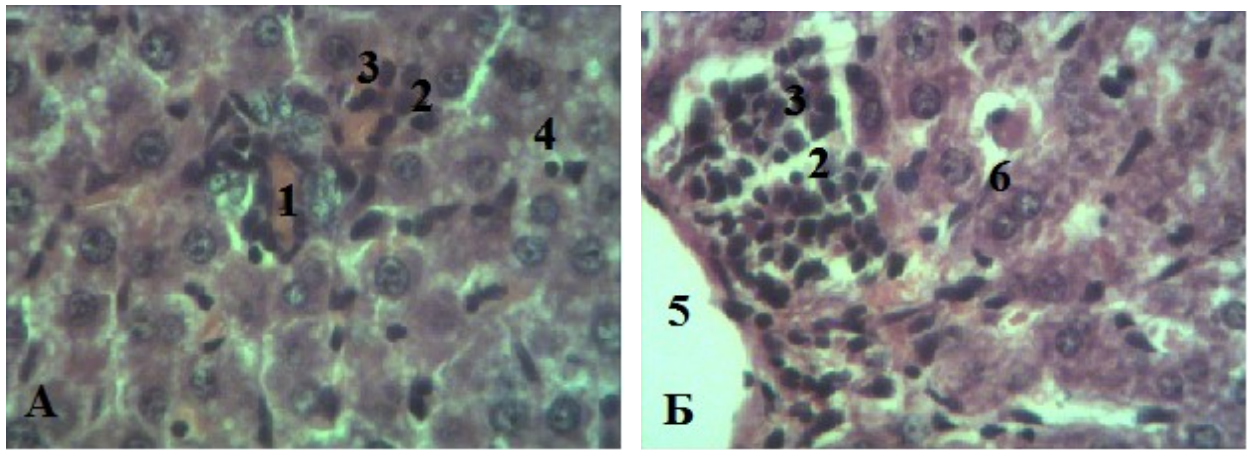


Рис 5.3 Фрагмент печінки щурів за ВЖД на 60 добу. Гематоксилін – еозин.
Збільшення: Об. х 40. Ок. х 10.

- 1 – повнокровні просвіти міжчасточкових вен;
- 2 – некротично змінені гепатоцити;
- 3 – лейкоцитарна інфільтрація;
- 4 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів.
- 5 – просвіт центральної вени;
- 6 – некроз гепатоцитів.

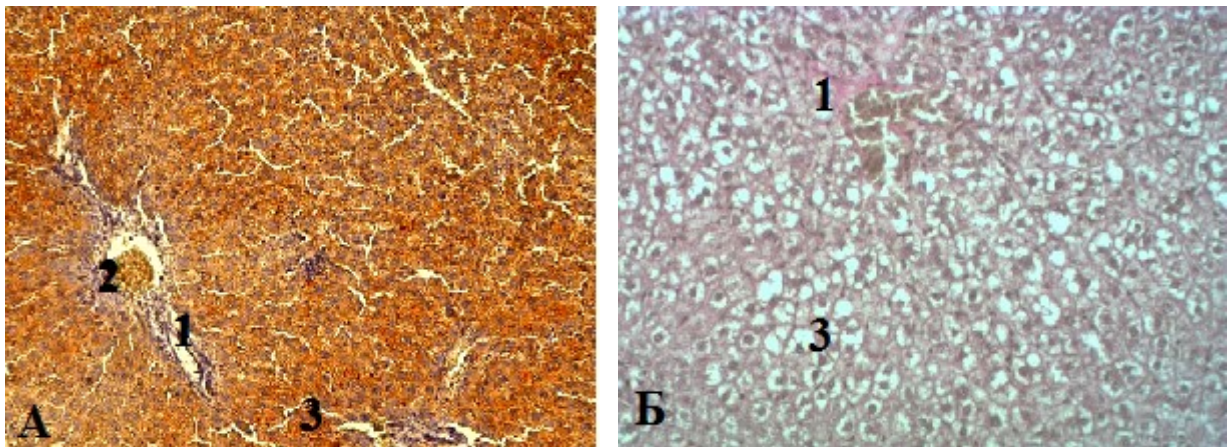


Рис.5.4 Фрагмент печінки щурів за ВЖД на 60 добу. А. Судан – III. Об. х 4. Ок. х 10. Б. Ван Гізон. Об. х 10 Ок. х 10.

- 1 – портальна зона;
- 2 – лейкоцитарна інфільтрація;
- 3 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів.

Таким чином, у щурів, яких утримували на ВЖД, наявні осередки жирової дистрофії та некрозу гепатоцитів, лейкоцитарна інфільтрація. Повнокров'я просвітів міжчасточкових вен, а також центральних вен і синусоїдів в класичних печінкових часточках. У порівнянні із щурами групи контролю чисельність гепатоцитів з жировою дистрофією цитоплазми більша. Значно підвищена кількість гепатоцитів з жировою дистрофією цитоплазми у щурів групи 3 у порівнянні із такою у щурів групи 2, однак площа некротично змінених гепатоцитів була меншою.

При макроскопічному дослідженні у щурів із поєднаним застосуванням ВЖД та тіолактону гомоцистеїну (група 4) печінка червоного кольору, забарвлена не рівномірно, консистенція щільна. Кровоносні судини в воротах печінки різко повнокровні. При гістологічному дослідженні печінки у щурів групи 4 виявлено гепатоцити в стані гідропічної та жирової дистрофії. В класичних печінкових часточках наявна гістіолімфоцитарна інфільтрація, переважно по ходу синусоїдів та навколо некротично змінених гепатоцитів. В портальних зонах сполучна тканина інфільтрована лімфоцитами, гістіоцитами, плазматичними клітинами. Портальні зони різко розширені за рахунок набряку, та лімфоїдної інфільтрації з плазматичними клітинами та невеликою кількістю еозинофілів (рис. 5.5). Гепатоцити в термінальній пластинці некротично змінені. Наявні перипортальні, східчасті некрози, прояви лобулярного гепатиту, місткові некрози. Гістіолімфоцитарні інфільтрати розташовані за межами портальних зон в перилобулярних зонах класичних печінкових часточок (східчастий некроз).

Просвіти синусоїдів в класичних печінкових часточках розширені, повнокровні, в них збільшена чисельність лімфоцитів (рис. 5.6).

Таким чином, у щурів 4 групи суттєво підвищена кількість гепатоцитів із жировою дистрофією цитоплазми та збільшена площа некрозу гепатоцитів у порівнянні із такою у щурів груп 2 та 3.

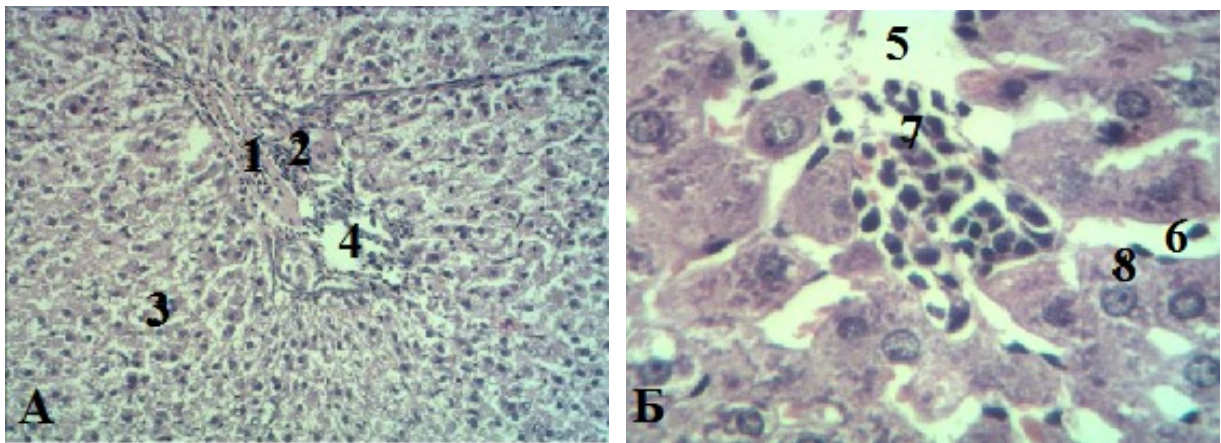


Рис.5.5 Фрагмент печінки щурів при поєднанні ВЖД з ГГЦ на 60 добу.
Гематоксилін – еозин. Збільшення: А. Об. х 10. Ок. х 10. Б. Об. х 40.Ок. х 10.

- 1 – повнокровні просвіти між часточкових вен;
- 2 – лейкоцитарна інфільтрація портальних зон;
- 3 – крупнокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів;
- 4 – розширені просвіти лімфатичних судин.
- 5 – просвіт центральної вени;
- 6 – просвіти синусоїдів;
- 7 – некротично змінені гепатоцити;
- 8 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів.

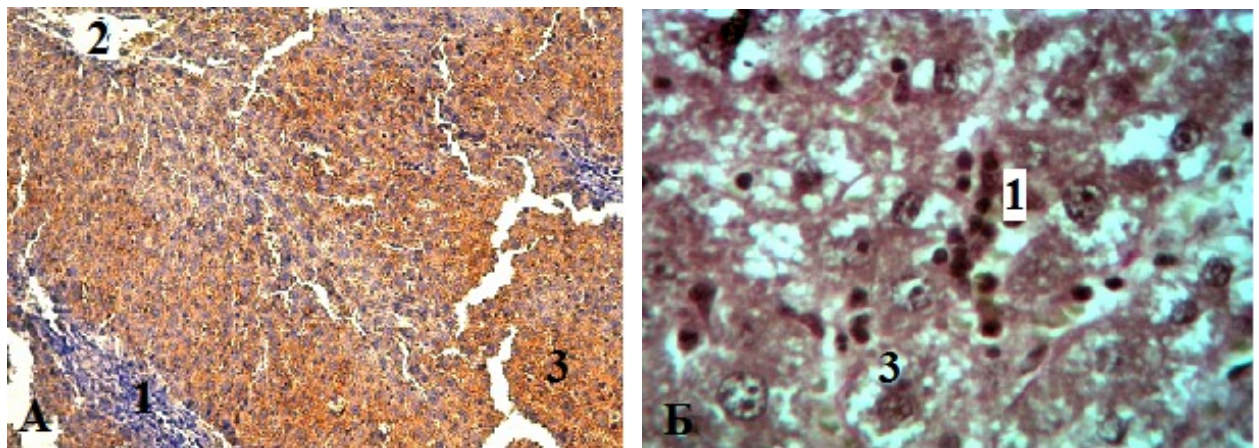


Рис. 5.6 Фрагмент печінки щурів при поєднанні ВЖД з ГГЦ на 60 добу.
А. Судан – III. Об. х 4 Ок. х 10. Б. Ван Гізон. Об. х 10.Ок. х 10.

- 1 – лейкоцитарна інфільтрація портальної зони;
- 2 – центральна вена;
- 3 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів.

Отже, за даними морфологічного дослідження застосування ВЖД упродовж 60 діб забезпечує формування стеатозу печінки. В той же час, при поєднанні ВЖД та з введенням тіолактону гомоцистеїну у піддослідних щурів виявляються морфологічні ознаки стеатогепатиту. Таким чином, при поєднанні НАЖХП з ГГЦ суттєво прискорюється розвиток не лише біохімічних, а й морфологічних ознак стеатозу та фіброзу печінки.

5.2 Вплив симвастатину та препарату омега-3 поліненасичених жирних кислот на морфологічний стан печінки у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією

На наступному етапі було проведено порівняльне дослідження впливу СД та гіполіпідемічних засобів на морфологічний стан печінки щурів з НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. НАЖХП+ГГЦ моделювали у 7 груп щурів (групи 2-8, n=10) як зазначено раніше (шляхом 60-добового застосування ВЖД та тіолактону гомоцистеїну 100 мг/кг в/шл). Щурів групи 2 (модель) виводили з досліду через 60 діб. Решту щурів з 61-ї доби переводили на СД на 14 та 28 діб: щурі груп 3 та 4 не отримували гіполіпідемічних засобів (групи порівняння); щурам груп 5 та 6 упродовж 14 та 28 діб 1 раз на добу в/шл вводили симвастатин в дозі 20 мг/кг маси тіла, а щурам груп 7 та 8 вводили препарат ω -3 ПНЖК в дозі 150 мг/кг маси тіла, відповідно. Групу контролю (група 1) склали інтактні щурі, що протягом усього досліду перебували на СД. Морфологічні особливості печінки щурів з НАЖХП+ГГЦ та інтактних щурів детально описані у попередньому підрозділі.

При макроскопічному дослідженні печінки у щурів, яких утримували на СД упродовж 14 та 28 діб (група 3 та 4) виявлено, що печінка мала м'яку консистенцію та була нерівномірно забарвлена. Вогнища світло-коричневого кольору межували з темно-коричневими. Кровоносні судини в воротах печінки різко повнокровні. Мікроскопічне дослідження структури печінки щурів групи 3 показало, що патологічні зміни стромы та паренхіми печінки подібні до

таких у щурів із НАЖХП, асоційованою із ГГЦ (група 2). У щурів групи 3 в класичних печінкових часточках виявляли гепатоцити в стані жирової дистрофії, наявна балонна дегенерація гепатоцитів, їх некроз та гістіолімфоцитарна інфільтрація в вогнищах некрозу та навколо них. Кровоносні судини в портальних зонах, центральні вени та синусоїди в класичних печінкових часточках повнокровні. Перисинусоїдні простори розширені, в них збільшена чисельність зірчастих макрофагоцитів в порівнянні з такими у інтактних щурів. Проникність стінок судин для плазми та лейкоцитів наближена до такої у щурів групи 2. Лейкоцитарна інфільтрація сполучної тканини в портальних зонах та строми в класичних печінкових часточках менш виражена, ніж у щурів групи 2 (рис. 5.7).

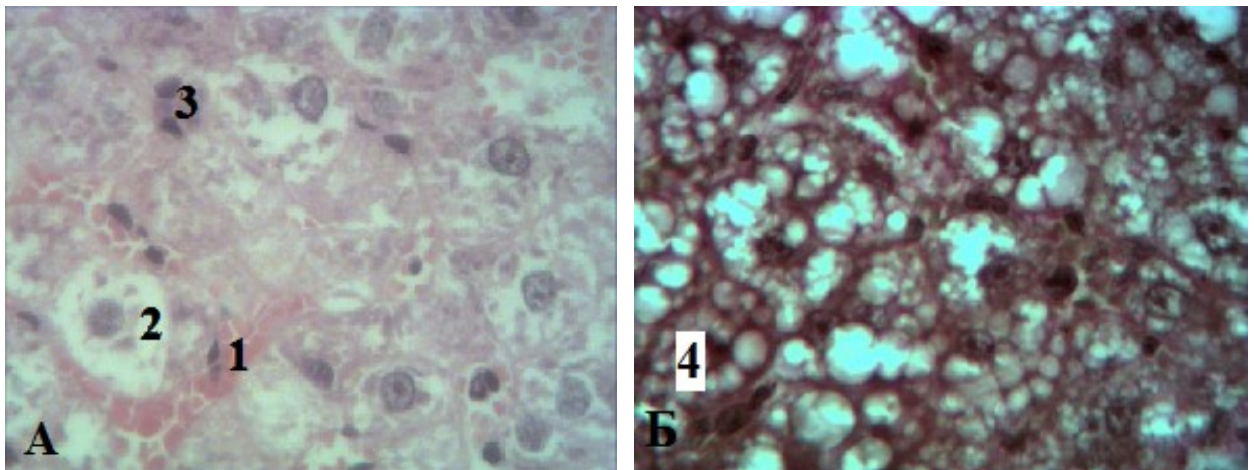


Рис. 5.7 Структура печінки у щурів із НАЖХП + ГГЦ + СД (14 доба).

А. Гематоксилін – еозин. Б. Ван Гізон. Збільшення: Об. х 40.Ок. х 10.

- 1 – повнокровні просвіти синусоїдів;
- 2 – балонна дистрофія цитопазми гепатоцитів;
- 3 – зірчасті макрофагоцити;
- 4 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів.

При гістологічному дослідженні у щурів групи 4 (28-добове застосування СД) виявили зміни структури печінки подібні до таких у щурів груп 2 та 3. Портальні зони різко розширені за рахунок набряку інтерстицію, розростання

строми та лейкоцитарної інфільтрації. Різко виражене балонування гепатоцитів. Гепатоцити в термінальній пластинці некротично змінені. Гістіолімфоцитарні інфільтрати розташовані за межами портальних зон в перилобулярних зонах класичних печінкових часточок. В класичних печінкових часточках наявна гістіолімфоцитарна інфільтрація, гепатоцити в стані жирової дистрофії. Просвіти синусоїдів в класичних печінкових часточках повнокровні, в них збільшена чисельність лімфоцитів. Навколо стінок центральних вен та синусоїдів наявна гіперплазія колагенових волокон (рис. 5.8). Отже, застосування СД упродовж 14 та 28 діб не забезпечувало регресу морфологічних змін в печінці щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, що свідчить про необхідність фармакологічної корекції останніх.

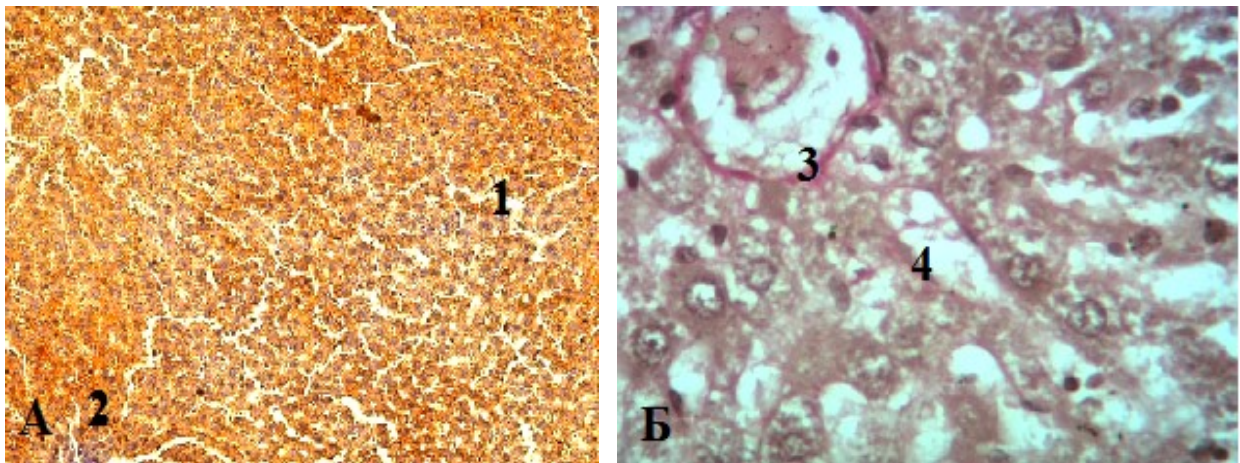


Рис. 5.8 Структура печінки у щурів із НАЖХП + ГГЦ + СД (28 доба).

А. Судан – III. Об. х 4 Ок. х 10. Б. Ван Гізон. Об. х 40. Ок. х 10.

- 1 – синусоїди;
- 2 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів;
- 3 – гіперплазія колагенових волокон навколо центральної вени;
- 4 – гіперплазія колагенових волокон в пересинусоїдальних просторах.

Встановлено, що у щурів із НАЖХП+ГГЦ, яких лікували симвастатином протягом 14 діб (група 5), патологічні зміни у печінці були менше виражені в порівнянні з такими у щурів групи 2 та групи 3. Так, більшість гепатоцитів мала однорідну структуру. Однак, в центролобулярній зоні класичних печінкових часточок виявили гепатоцити з явищами гідропічної дистрофії

цитоплазми, а в проміжній зоні класичних печінкових часточок гепатоцити з крупно- та мілкокрапельною жирковою дистрофією цитоплазми. Центральні вени помірно повнокровні. Просвіти синусоїдів незначно розширені (рис. 5.9).

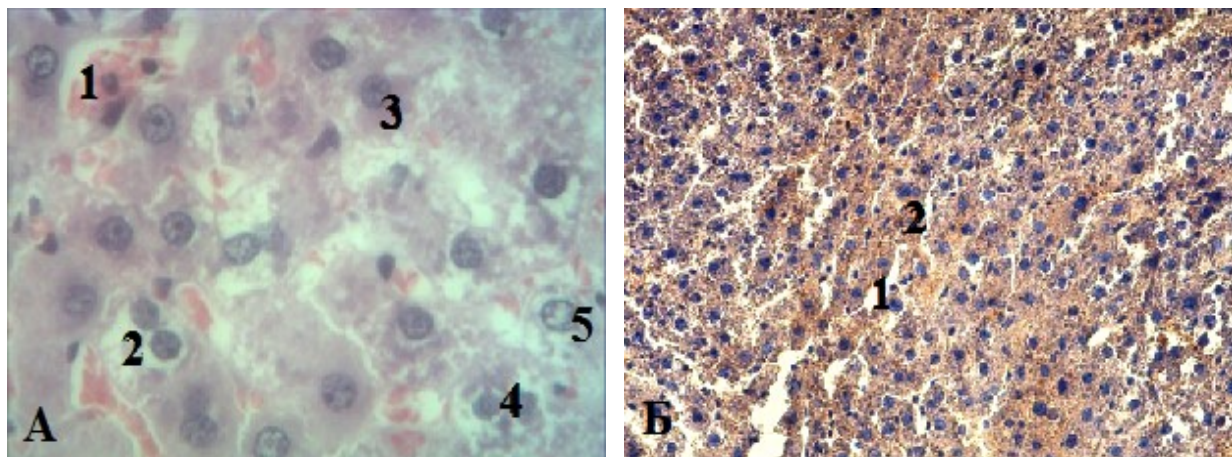


Рис 5.9 Структура печінки у щурів із НАЖХП + ГГЦ + СД, яким вводили симвастатин 14 діб. А. Гематоксилін – еозин. Об. х 40.Ок. х 10. Б. Судан-III. Об. х 10 Ок. х 10.

- 1 – просвіти синусоїдів;
- 2 – крупнокрапельна жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів;
- 3 – темні гепатоцити;
- 4 – двоядерні гепатоцити;
- 5 – балонна дистрофія цитоплазми гепатоцитів.

У щурів з НАЖХП+ГГЦ, яким на тлі СД вводили симвастатин 28 діб (група б), виявлено, що загальна структура печінки збережена, зміни в кровоносних судинах портальних зон та некробіотичні зміни в гепатоцитах, стінках центральних вен та синусоїдів були менше виражені, ніж у щурів групи 5 (рис. 5.10). Центральні вени помірно повнокровні, просвіти синусоїдів незначно розширені. В перилобулярній зоні класичних печінкових часточок менше гепатоцитів з мілко- та крупнокрапельною жирковою дистрофією цитоплазми. 28-добове застосування симвастатину призвело до більш суттєвого зменшення лейкоцитарної інфільтрації сполучної тканини в портальних зонах, ніж при терміні 14 діб. У щурів групи б частіше виявляли двоядерні гепатоцити, ніж у тварин контрольної групи (рис. 5.11).

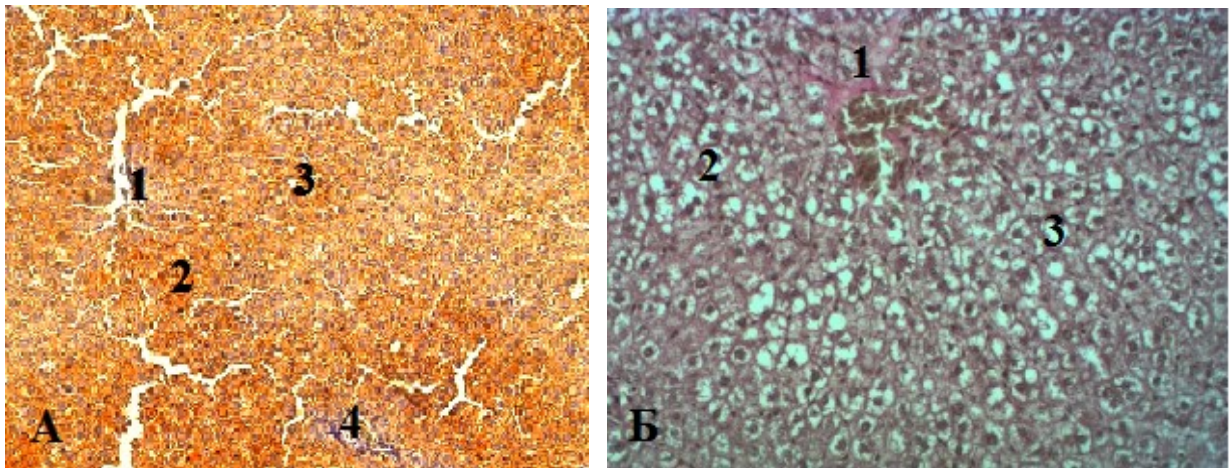


Рис. 5.10 Структура печінки у щурів з НАЖХП+ГГЦ+СД+симвастатин (28 діб). А. Судан – III. Б. Ван Гізон. Збільшення: Об. x 10. Ок. x 10.

- 1 – портальна зона;
- 2 – жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів;
- 3 – синусоїди;
- 4 – лейкоцитарна інфільтрація.

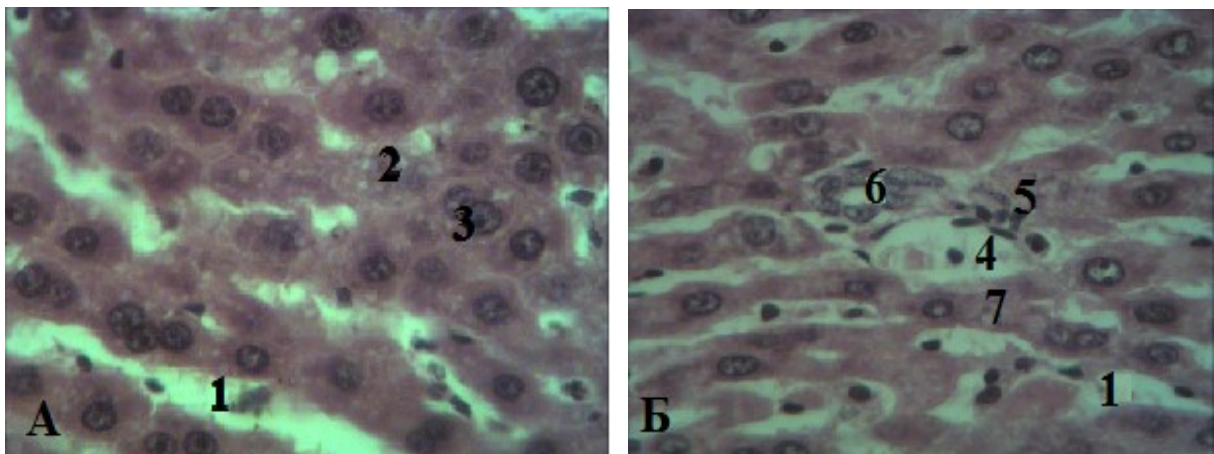


Рис. 5.11 Структура печінки у щурів з НАЖХП+ГГЦ+СД+симвастатин (28 діб). Гематоксилін – еозин. Збільшення: Об. x 40. Ок. x 10.

- 1 – розширені просвіти синусоїдів;
- 2 – жирова дистрофія гепатоцитів;
- 3 – двоядерні гепатоцити;
- 4 – просвіти міжчасточкових вен;
- 5 – незначна лейкоцитарна інфільтрація потальних зон;
- 6 – міжчасточкові жовчні протоки;
- 7 – гепатоцити замикальної пластинки; 8 – просвіти синусоїдів.

Встановлено, що через 14 діб лікування препаратом ω -3 ПНЖК (група 7) у щурів виявлялись патологічні зміни структури стромы та паренхіми печінки, але вони були менш вираженими в порівнянні з такими у щурів груп 2 та 3. Так, у щурів групи 7 гепатоцити були неоднорідними по формі та розмірам, часто виявляли гіпертрофовані гепатоцити. Цитоплазма гепатоцитів дрібнозерниста, однорідно забарвлена. Ядра гепатоцитів нормохромні з добре вираженими ядерцями. Часто виявляли 2-х ядерні гепатоцити (рис. 5.12). Центральні вени звичайного кровонаповнення, їх просвіти не розширені, стінки цілісні. Просвіти синусоїдів однорідні, не розширені. Ендотеліоцити в їх стінках звичайної будови. Перисинусоїдні простори не розширені. У щурів групи 7 групи виявлена лейкоцитарна інфільтрація, однак вона була менш виражена в порівнянні з такою у щурів групи 3. Гепатоцити з вакуолярною дистрофією цитоплазми, як правило розташовані в перилобулярній зоні класичних печінкових часточок.

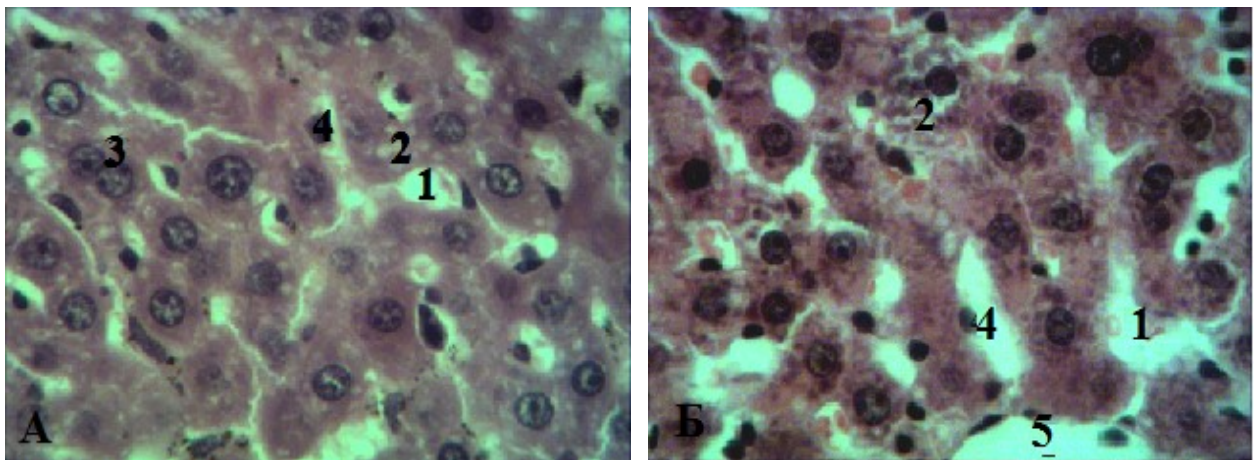


Рис 5.12 Структура печінки у щурів із НАЖХП+ГГЦ+СД, яким вводили препарат ω -3 ПНЖК упродовж 14 діб. Гематоксилін – еозин. Збільшення: Об. х 40. Ок. х 10.

- 1 – просвіти синусоїдів;
- 2 – мілкокрапельна жирова дистрофія цитопазми гепатоцитів;
- 3 – двоядерні гепатоцити;
- 4 – зірчасті макрофагоцити;
- 5 – просвіт центральної вени.

У щурів групи 7 також була виявлена лейкоцитарна інфільтрація печінки, однак вона була менше виражена в порівнянні з такою у щурів групи 2 та групи 3. Частка гепатоцитів на зрізах печінки в класичних печінкових часточках з мілкокрапельною жирною дистрофією цитоплазми була суттєво меншою у порівнянні із тваринами групи 2. Частка некротично змінених гепатоцитів також менше виражена.

Патологічні зміни структури печінки у щурів з НАЖХП+ГГЦ, яким вводили препарат ω -3 ПНЖК протягом 28 діб (група 8), були менше виражені, ніж у щурів групи 7 (рис. 5.13). Класичні печінкові часточки за структурою подібні до таких у щурів групи 1 (контроль). Кути часточок розділені прошарками пухкої сполучної тканини, яка містить міжчасточкові вени, артерії, жовчні протоки.

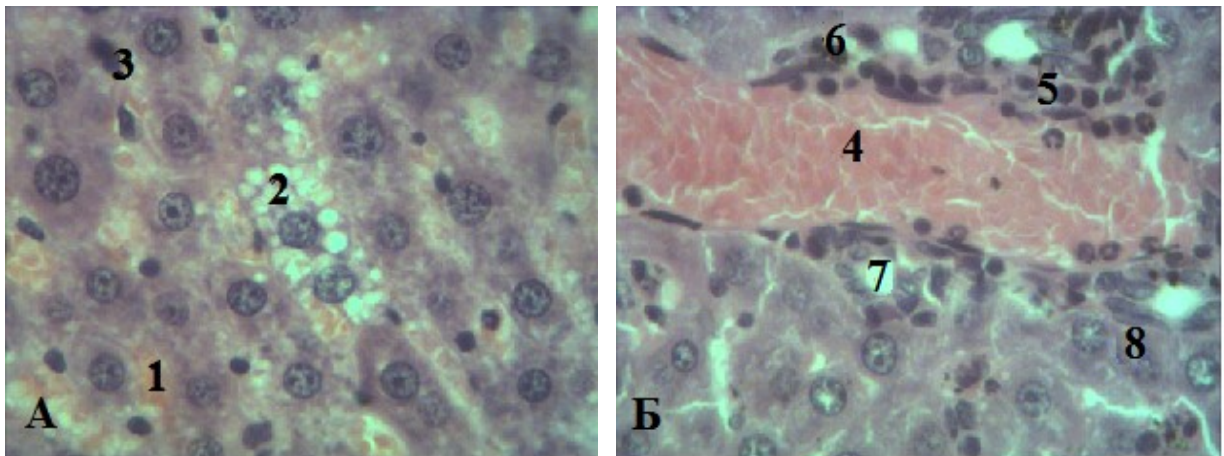


Рис 5.13 Структура печінки у щурів із НАЖХП+ГГЦ+СД, яким вводили препарат ω -3 ПНЖК протягом 28 діб. Гематоксилін – еозин. Збільшення: Об. х 40.Ок. х 10.

- 1 – просвіти синусоїдів;
- 2 – крупнокрапельна жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів;
- 3 – зірчасті макрофагоцити.
- 4 – повнокровні просвіти міжчасточкових вен;
- 5 – адгезія та діapedез лейкоцитів через стінки міжчасточкових вен;
- 6 – незначна лейкоцитарна інфільтрація портальних зон;
- 7 – міжчасточкові жовчні протоки;
- 8 – гепатоцити замикальної пластинки.

У щурів групи 8 виявлена періваскулярна лейкоцитарна інфільтрація сполучної тканини в портальних зонах, однак вона була менш виражена в порівнянні з такою у щурів груп 2 та 4. Центральні вени звичайного кровонаповнення, їх просвіти не розширені, стінки цілісні. Гепатоцити звичайної форми. Цитоплазма гепатоцитів дрібнозерниста, її забарвлення однорідне. Ядра гепатоцитів нормохромні з добре вираженими ядерцями, часто виявляли 2-х ядерні гепатоцити. Як і у щурів групи 7, у щурів групи 8 були наявні дистрофічні зміни в цитоплазмі гепатоцитів, розташованих в центральних зонах класичних печінкових часточок, однак такі вогнища включали поодинокі клітини і виявлялись не у всіх полях зору. Жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів також була менш виражена в порівнянні з такою у щурів групи 7. Просвіти синусоїдів помірно повнокровні, однорідні не розширені. Ендотеліоцити в стінках синусоїдів однорідні по структурі та утворювали суцільний пласт. Наявна гіпертрофія та гіперплазія зірчастих макрофагоцитів. Найбільшу кількість цих клітин виявляли в перилобулярних зонах класичних печінкових часточок. Площа некрозу гепатоцитів також була меншою, ніж така у щурів групи 7 (рис. 5.14).

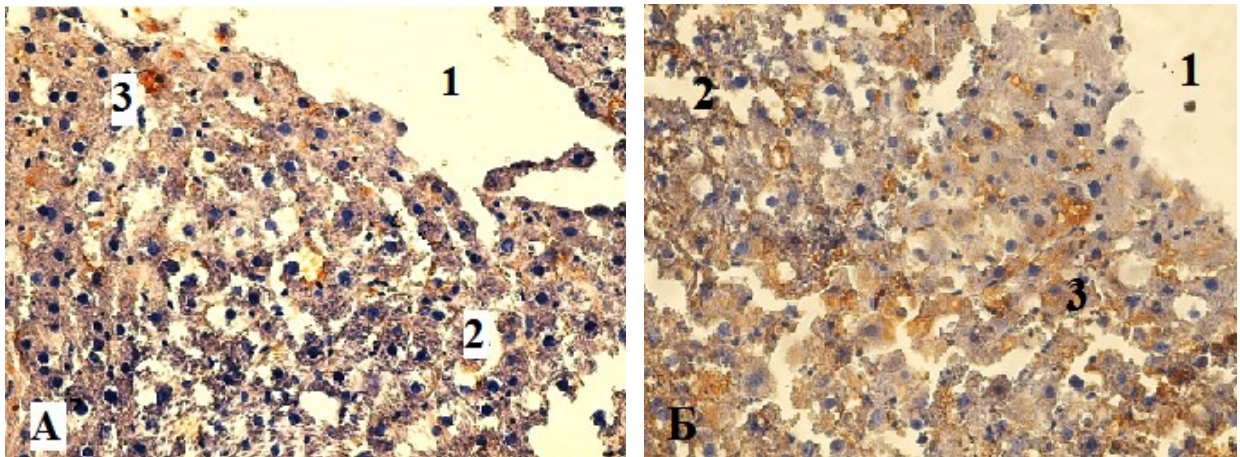


Рис.5.14 Структура печінки у щурів із НАЖХП+ГГЦ+СД, яким вводили препарат ω -3 ПНЖК протягом 28 діб. Судан III. Збільшення: Об. х 20. Ок. х 10.

1 – центральна вена;

2 – синусоїди;

3 – мілкокрапельна жирова дистрофія цитоплазми гепатоцитів.

Таким чином, у щурів з НАЖХП+ГГЦ, на тлі СД препарат ω -3 ПНЖК забезпечував більш помітний лікувальний ефект при 28-добовому застосуванні, про що свідчить суттєве зменшення кількості гепатоцитів із жировою дистрофією цитоплазми, а також площі некрозу гепатоцитів.

Докази негативного впливу ГГЦ на розвиток НАЖХП та відмінності антистеатозного ефекту гіполіпідемічних засобів були підсумовані при морфометричному аналізі структури печінки (табл. 5.1). У щурів з моделлю НАЖХП+ГГЦ (ВЖД+ тіолактон гомоцистеїну 60 діб) ступінь стеатозу відповідав в середньому $2,80 \pm 0,20$ балам: частка гепатоцитів у стані жирової дистрофії та некротично змінених гепатоцитів були вищими у 2,1 та у 1,77, ніж у щурів з НАЖХП (ВЖД 60 діб) відповідно. Щурі з НАЖХП+ГГЦ+СД упродовж 28 діб характеризувалися середнім ступенем стеатозу $2,60 \pm 0,24$, при чому було відмічено відсутність вірогідних змін частки гепатоцитів у стані жирової дистрофії та відносної площі некрозу гепатоцитів у порівнянні із станом до лікування (модель НАЖХП+ГГЦ, 60 доба). Ступінь стеатозу при застосуванні симвастатину на тлі СД протягом 28 діб відповідав у середньому $2,20 \pm 0,20$ балам: показники жирової дистрофії та кількості некротично змінених гепатоцитів були нижчими (на 12% та 33%), ніж у щурів в групі НАЖХП+ГГЦ, але суттєво не відрізнялись від таких у щурів в групі НАЖХП+ГГЦ+СД. Застосування препарату ω -3 ПНЖК на тлі СД більш ефективно покращувало морфологічний стан печінки порівняно із симвастатином. Так, у щурів з НАЖХП+ГГЦ+СД, які отримували препарат ω -3 ПНЖК протягом 28 діб, морфологічна стадія стеатозу відповідала у середньому $1,20 \pm 0,20$ бала: кількість гепатоцитів з жировою дистрофією та некротизованих клітин були нижчими, ніж в групі НАЖХП+ГГЦ+СД у 2,11 та 1,98 рази відповідно.

**Морфометричний аналіз тканин печінки щурів з НАЖХП,
асоційованої із ГГЦ, та за її корекції ($M \pm m$, $n=5$)**

Групи щурів	Гепатоцити з ЖД (на 100 клітин)	Некротизовані гепатоцити (на 100 клітин)	Ступінь стеатозу
Моделювання НАЖХП+ГГЦ (60 діб)			
Контроль	4,60±0,38	0,60±0,10	0
ГГЦ	25,00±1,38*	14,68±1,21*	1,00*
НАЖХП	35,38±1,51*	13,30±1,03*	1,60±0,24*
НАЖХП + ГГЦ	74,00±2,61*	23,60±1,39*	2,80±0,20*
Лікування НАЖХП+ГГЦ (28 діб)			
НАЖХП+ГГЦ+СД (28 діб)	66,78±3,26*	19,68±1,11*#	2,60±0,24*
НАЖХП+ГГЦ+СД + симвастатин (28 діб)	64,85±2,52*#	15,78±1,34*#§	2,20±0,20*
НАЖХП+ГГЦ+СД + ω -3 ПНЖК (28 діб)	31,70±1,77*#§	9,93±0,88*#§	1,20±0,20*#§

Примітки:

- * - достовірність відмінностей відносно контролю ($p < 0,05$);
- # - достовірність відмінностей відносно «НАЖХП+ГГЦ» ($p < 0,05$);
- § - достовірність відмінностей відносно «НАЖХП+ГГЦ+СД» ($p < 0,05$).

Резюме. Таким чином, морфологічні зміни в печінці щурів з НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та при її лікуванні симвастатином та препаратом ω -3 ПНЖК узгоджувались із змінами біохімічних маркерів стеатозу та фіброзу печінки. В структурі печінки щурів із НАЖХП, асоційованою із ГГЦ, були наступні характерні зміни: гістіолейкоцитарна інфільтрація портальних зон, периваскулярна та інтралобулярна лімфоцитарна інфільтрація, гіперплазія перисинусоїдальних зірчастих клітин, некроз та жирова дистрофія гепатоцитів.

Фіброз в портальних зонах, а також вогнища фіброзу навколо центральних вен та в перисинусоїдальних просторах. У щурів, яким 28 діб вводили препарат ω -3 ПНЖК, патологічні зміни в структурі печінки були виражені менше: суттєво зменшена кількість гепатоцитів із жировою дистрофією цитоплазми, а також площа некрозу гепатоцитів. В печінці були виявлені зміни, які віднесли до компенсаторних, а саме незначне повнокров'я центральних вен і синусоїдів, гіпертрофію гепатоцитів, збільшення розмірів ядер в гепатоцитах, а також збільшення чисельності 2-х ядерних клітин та зірчастих макрофагоцитів. Симвастатин виявив менший лікувальний ефект: у щурів цієї групи кількість гепатоцитів із жировою дистрофією цитоплазми та площа некрозу гепатоцитів були меншими, ніж у нелікованих щурів з НАЖХП+ГГЦ, але ці показники були вищими, ніж при застосуванні препарату ω -3 ПНЖК. Відмінності щодо морфологічних змін при застосуванні засобів з гіполіпідемічною дією можуть бути зумовлені різним впливом на чинники, які визначають репараційний потенціал печінки, та регулюють процеси стеато- та фіброгенезу, зокрема на продукцію IGF-1 та H_2S в гепатоцитах.

Отже, вивчення молекулярних механізмів впливу гіполіпідемічних препаратів з політропними властивостями на процеси стеатозу та фіброзу печінки, поєданого з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот та їх біологічно-активних метаболітів, є перспективним напрямком подальших досліджень, спрямованих на подальше підвищення ефективності лікування НАЖХП в клінічних умовах.

Основні наукові результати розділу висвітлені в наступних публікаціях [37, 38, 44, 45].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

НАЖХП є одним із поширених хронічних захворювань печінки, що охоплює від 20 до 40 % загальної популяції і зустрічається майже в усіх вікових групах населення [36, 78, 226, 245]. В останні роки спостерігається неухильне збільшення частки НАЖХП серед захворювань печінки, що здебільшого пояснюється високою розповсюдженістю таких патологічних станів як ожиріння, ЦД-2 та метаболічний синдром [5, 226].

Розвиток НАЖХП часто супроводжується підвищенням рівня гомоцистеїну, з іншого боку ГГЦ вважають самостійним чинником стеатозу та фіброзу печінки, що засвідчено в ряді експериментальних та клінічних досліджень [12, 21, 61, 106, 124]. ГГЦ є досить розповсюдженим метаболічним розладом, зокрема, в Україні виявляється майже у 10 % практично здорових дорослих осіб [2]. Серед пацієнтів з хронічними захворюваннями печінки частота ГГЦ може сягати 50 % та більше [12, 63]. Таким чином, дослідження патогенетичних особливостей НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, набуває все більшої актуальності.

Гепатотоксичну дію ГГЦ пов'язують з індукцією оксидативного стресу, гіпометилуванням, порушенням продукції вазоактивних медіаторів, мітохондріальною дисфункцією [60, 216, 297]. Однак, з точки зору теорії «множинного удару» механізми стеатогенної дії ГГЦ потребують подальшого вивчення.

Важливу роль в регуляції функціонального стану печінки відіграє IGF-1, який контролює тканинний ріст, диференціацію та проліферацію гепатоцитів, ліпідний метаболізм, проявляє антиоксидантну та цитопротекторну дію, запобігає мітохондріальній дисфункції [192, 195, 208]. Також в процесі обміну гомоцистеїну в печінці синтезується газотрансміттер H_2S , який також проявляє властивості антиоксиданта, цитопротектора, вазодилататора, бере участь в

регуляції аутофагії [184]. Роль вказаних IGF-1 та H_2S в патогенезі НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, залишається не визначеною.

Метою дослідження було встановити роль інсуліноподібного фактору росту-1 та гідроген сульфїду в механїзмах прогресування та корекції експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією.

Дослідження складалось з трьох етапів: 1-й етап був присвячений експериментальному дослідженню біохімічних механїзмів розвитку НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, та встановленню ролі потенційних чинників «множинного удару» - IGF-1 та H_2S (розділ 3); 2-й етап полягав у визначенні впливу гіполіпідемічних засобів з політропними властивостями (симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК) на біохімічні чинники прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, особливо на рівень IGF-1 в сироватці крові та вміст H_2S в печінці щурів (розділ 4); 3-й етап був присвячений морфологічній оцінці антистеатозної ефективності симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ (розділ 5).

Для вирішення завдань дисертаційного дослідження була застосована модель експериментальної НАЖХП, яка поєднувалась з моделлю тіолактонової ГГЦ (розділ 2). Як відомо, найбільш ефективною та наближеною до клінічних умов є модель НАЖХП, індукована тривалим застосуванням ВЖД у щурів [6, 287, 288]. В роботі протягом 60 діб застосовували ВЖД, яка постачала 54 % ккал за рахунок жирів та 29 % ккал за рахунок вуглеводів, в той час як нормальна дієта (СД) постачала 21 % ккал за рахунок жирів та 62 % ккал за рахунок вуглеводів (частка протеїнів забезпечувала 17 % ккал в обох дієтах). Для створення ГГЦ тваринам проводили навантаження тіолактоном гомоцистеїну (100 мг/кг в/шл), що дозволяє підвищити рівень цієї амінокислоти в плазмі крові більш, ніж вдвічі [19, 60, 177].

Досліди були проведені на 156 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях із початковою масою 210-280 г, у відповідності до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положенням Європейської конвенції

щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (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 комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова.

Для дослідження біохімічних особливостей НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, щурі були розподілені на 4 групи (n=14): 1 – контроль; 2 - ГГЦ (на тлі СД); 3 – ВЖД; 4 – ВЖД+ГГЦ (розділ 3). Результати наших досліджень засвідчили, що введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД забезпечувало формування помірної ГГЦ, в той час як застосування ВЖД індукувало розвиток легкої ГГЦ: станом на 60 добу рівні гомоцистеїну у щурів груп 2 та 3 були вищими на 88,1 та 38,2 %, ніж у щурів контрольної групи ($p < 0,05$). Введення тіолактону гомоцистеїну на тлі ВЖД викликало найбільш виразну ГГЦ: рівень гомоцистеїну був достовірно вищим (на 114,2 %), ніж в контрольній групі і становив $11,5 \pm 0,29$ проти $5,37 \pm 0,17$ мкмоль/л ($p < 0,001$), відповідно. Крім того, рівень гомоцистеїну у щурів групи 4 достовірно перевищував такий у щурів груп 2 та 3 на 13,9 та 55,0 % ($p < 0,05$).

Виявилось, що за умов ГГЦ істотно посилюється стеатогенний ефект ВЖД. Про це свідчать суттєві відмінності кінцевих масо-ростових параметрів дослідних щурів (табл. 3.1; 3.2). Так, ІМТ, сумарна маса внутрішнього жиру (ретроперітонеального, епідідимального та вісцерального жиру) та індекс ожиріння у щурів групи контролю становили $0,67 \pm 0,01$ г/см²; $8,64 \pm 0,17$ г; $2,54 \pm 0,05$ ум.од., у щурів групи 3 (ВЖД) - $0,79 \pm 0,02$ г/см²; $11,8 \pm 0,44$ г; $3,08 \pm 0,05$ ум.од., а у щурів групи 4 (ВЖД+ГГЦ) - $0,86 \pm 0,02$ г/см²; $15,1 \pm 0,54$ г; $3,65 \pm 0,26$ ум.од., відповідно. Отже, у щурів групи 4 (ВЖД+ГГЦ) реєструвався більш значний приріст ІМТ, сумарної маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння (на 8,9; 28,0 та 18,5 %, $p < 0,05$) порівняно із щурами групи 3 (ВЖД). Слід відзначити, що за умов дієти з фізіологічним вмістом жирів застосування тіолактону гомоцистеїну викликало тенденцію до підвищення маси внутрішнього жиру (на 9,0 %, $p = 0,1$), хоча в цілому масо-ростові параметри не порушувались.

Як відомо, підвищення вмісту вісцерального жиру тісно пов'язано з розвитком інсулінорезистентності [158]. Цілком ймовірно, що введення тіолактону гомоцистеїну на тлі перевантаження організму тварин екзогенними жирами може порушувати інсуліновий сигналінг та спричиняти розвиток інсулінорезистентності, яка є важливим механізмом «першого удару» патогенезу НАЖХП. За НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, рівень гомоцистеїну в сироватці крові прямо корелював з ІМТ та індексом ожиріння ($r_{sp} = 0,59-0,60$).

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури щодо здатності високих рівнів гомоцистеїну індукувати інсулінорезистентність та спричиняти компенсаторну гіперінсулінемію [215, 292]. В свою чергу, гіперінсулінемія викликає інгібування активності ензимів шляхів реметилювання та транссульфурування гомоцистеїну - метилентетрагідрофолат-редуктази та цистатіонін- β -синтази, що веде до накопичення гомоцистеїну в плазмі крові [215, 292]. З іншого боку, інсулінорезистентність та/ або вживання дієти з високим інсулінемічним індексом може викликати розвиток ГГЦ [157]. Клінічні дослідження підтверджують, що ГГЦ може бути маркером метаболічного синдрому та інсулінорезистентності [120, 176]. Нещодавно було показано, що у еуглікемічних пацієнтів з НАЖХП рівень гомоцистеїну прямо корелював з індексом інсулінорезистентності (НОМА) та ІМТ [120].

Розвиток НАЖХП в умовах ГГЦ характеризувався достовірно більшим зростанням відносної маси печінки та селезінки (на 7,03; 19,2, $p < 0,05$), а також зниженням відношення П/С (на 14,1 %, $p < 0,05$), ніж за умов ізольованого застосування ВЖД (табл. 3.3). Зауважимо, що за умов СД тіолактонова ГГЦ також спричиняла підвищення відносної маси печінки (на 11,9% порівняно з контрольною групою), але не викликала суттєвих змін маси селезінки та відношення П/С. Як відомо, НАЖХП характеризується гепатомегалією, що пов'язано з ектопічною акумуляцією жиру в гепатоцитах, активацією фіброгенезу та накопиченням макромолекул сполучної тканини (колагену, гіалуронату) [35, 67, 202]. В одному з досліджень було показано, що 3-місячне застосування ВЖД викликало вірогідне підвищення об'єму селезінки у щурів [98]. Спленомегалія була зумовлена синусоїдальною дилатацією та

внутрішньоклітинними депозитами, які включали скупчення ліпідів, гемосидерину та лейкоцитарні агрегати [98]. В клінічних умовах одним із неінвазивних маркерів НАЖХП є збільшення об'єму селезінки та зменшення відношення щільності печінки до щільності селезінки (за результатами комп'ютерної томографії) менше 1,0 [309]. Збільшення розмірів селезінки при НАЖХП може свідчити про трансформацію стеатозу у НАСГ [67, 309]. Отже, в умовах ГГЦ прискорювалось формування гепато- та спленомегалії у щурів з НАЖХП.

Дослідження рутинних біохімічних показників сироватки крові засвідчило, що ГГЦ поглиблює порушення функціонального стану печінки за у щурів з НАЖХП (табл. 3.4). Про це свідчать більш виразні ознаки цитолізу та зниження протеїнсинтезуючої функції печінки при поєднанні ВЖД з ГГЦ: активність АЛТ та ГГТ в сироватці крові у щурів в групі 4 була вищою на 47,3 та 36,0 % ($p < 0,05$), а вміст альбуміну – на 6,98 % нижчим, ніж у щурів в групі 3 за ізольованого застосування ВЖД. Між рівнем гомоцистеїну та маркерами некрозапальних змін в гепатоцитах - активністю АЛТ та ГГТ в сироватці крові виявлявся прямий кореляційний зв'язок ($r_{sp} = 0,55; 0,68, p < 0,01$).

В клінічних умовах підвищення рівня гомоцистеїну у пацієнтів з НАЖХП асоціюється з більш виразним підвищенням рівня АЛТ та ГГТ в сироватці крові [120]. Однак, в експериментальних умовах ГГЦ-індуковане порушення стану печінки не завжди супроводжується ознаками цитолізу гепатоцитів, що до певної міри пов'язано з відмінностями моделювання ГГЦ. Так, підшкірне введення гомоцистеїну щурам з 6 по 28 добу життя викликало розвиток оксидативного стресу, пригнічення антиоксидатного захисту, зниження загального рівня тіолів, підвищення маркерів ліпопероксидації, гістологічні ознаки запалення та фіброзу, зниження рівня глікогену/ глікопротеїнів в печінці, але не спричиняло порушення сироваткової активності амінотрансфераз [175]. В той же час, хронічне навантаження щурів метіоніном викликало оксидативний стрес, зниження антиоксидантного потенціалу, зниження вмісту глікогену / глікопротеїнів в печінці, що супроводжувалось підвищенням рівня АЛТ, АСТ, лужної фосфатази та глюкози в сироватці крові

[188]. Метіонін-індукована ГГЦ у щурів з моделлю етанолового ушкодження печінки також викликала оксидативний стрес, але при цьому спостерігалось зниження сироваткової активності АЛТ [199].

Застосування ВЖД у поєднанні з ГГЦ викликало формування більш «агресивної» проатерогенної дисліпідемії (табл. 3.5, рис. 3.2), яка характеризувалась високим сироватковим рівнем ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ на тлі зниження рівня ХС ЛПВЩ. В той же час, окреме застосування ВЖД індукувало підвищення рівня ТГ та ХС ЛПДНЩ і не викликало суттєвих змін рівня ЗХС, натомість окреме застосування тіолактону гомоцистеїну здебільшого підвищувало рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ. В цілому, у щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, гіперхолестеролемія, гіпертриацилгліцеролемія та індекс атерогенності були достовірно вищими (на 36,8; 32,1 та 123,4 %, $p < 0,05$), ніж у щурів з ізольованою НАЖХП.

Отримані нами експериментальні дані узгоджуються з результатами інших експериментальних та клінічних досліджень. Зокрема, введення гомоцистеїну або метіоніну викликало підвищення сироваткового рівня ЗХС та ТГ у щурів [199]. Довготривале 24-тижневе застосування ВЖД викликало у щурів підвищення базального рівня гомоцистеїну, ЗХС та ХС ЛПНЩ [293]. У хворих на НАЖХП між сироватковим рівнем гомоцистеїну та рівнем ТГ виявлявся прямий зв'язок і обернений зв'язок – з рівнем ХС ЛПВЩ [120]. Отже, ГГЦ та ВЖД є взаємопотенціюючими чинниками формування проатерогенної дисліпідемії, що може бути зумовлено порушеннями ліпідного метаболізму та синтезу ліпопротеїнів у печінці.

Дослідження вмісту фракцій ліпідів в печінці засвідчило, що ГГЦ справляла власний ліпогенний ефект (за умов СД) та посилювала стеатогенний ефект ВЖД (табл. 3.6). 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 умов ВЖД в печінці спостерігалось більш суттєве 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 %) порівняно з контролем. Крім того, за умов ВЖД та ГГЦ вміст ТГ та ЗХС був достовірно вищим (на 69,3 та 12,2 %), а вміст фосфоліпідів – достовірно нижчим (на 20,6 %), ніж за умов ізольованого застосування 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. Однак, більш тісний прямий зв'язок зареєстрований рівнем гомоцистеїну та вмістом ЗХС та ТГ у печінці ($r_{sp} = 0,61; 0,63, p < 0,01$), а обернений зв'язок – з печінковим вмістом фосфоліпідів ($r_{sp} = -0,46, p < 0,05$).

Стеатогенний ефект ГГЦ може реалізуватись через різні молекулярні механізми. Встановлено, що ГГЦ індукує ЕПР-стрес та порушує фолдінг протеїнів, викликає дисрегуляцію синтезу ендогенних стеролів, активує SREBPs та посилює експресію генів, відповідальних за біосинтез ХС та ТГ, в культурі гепатоцитів людини [178, 180]. Дисрегуляція експресії генів ліпідного обміну (із підвищенням експресії генів біосинтезу ХС та ЖК, рецепторів та транспортерів ліпідів) реєструвалась у мишей з дефіцитом цистатіон- β -синтази - ключового ензиму утилізації гомоцистеїну шляхом транссульфування [187]. У мишей з важкою ГГЦ на фоні дефіциту цистатіон- β -синтази відмічалось значне підвищення рівня ТГ та неестерифікованих ЖК в печінці та сироватці крові [90, 125], зниження активності β -окиснення ЖК в печінці, зниження рівня ХС ЛПВЩ та активності лецитинхолестеролацилтрансферази, підвищення рівня аполіпопротеїну В 100 та ЛПДНЩ в крові [90]. За експериментальної ГГЦ в печінці пригнічується активність метилтрансферазних реакцій та порушується синтез фосфоліпідів, що також може погіршувати елімінацію ТГ та ХС з гепатоцитів [60, 307]. ВЖД також спричиняє пригнічення експресії рецепторів ЛПНЩ, зниження експресії протеїнів апоЕ, апоВ та апоАІ, підвищує експресію ГМГ-КоА-редуктази в печінці шурів [293]. Отже, найбільш несприятливий метаболічний патерн в гепатоцитах формується за поєднання ГГЦ та ВЖД.

Результати наших досліджень засвідчили, що ГГЦ справляла більш значний профіброгенний ефект, ніж ВЖД (рис. 3.3). Так, за умов ГГЦ, ВЖД та,

особливо, за їх поєднання реєструвалось достовірне підвищення вмісту гідроксипроліну в печінці (на 31,2; 22,8 та 60,0 %) порівняно з контролем. Вміст гідроксипроліну у щурів в групі ВЖД+ГГЦ достовірно перевищував такий на 21,9 та 30,3 % у щурів в групах ГГЦ та ВЖД, відповідно. Між рівнем гомоцистеїну в сироватці крові та рівнем гідроксипроліну в печінці виявлявся прямий кореляційний зв'язок ($r_{sp} = 0,74$).

Існують дані, що окреме застосування ВЖД не викликає формування фіброзу печінки у тварин, в той час як за її поєднання з іншим чинниками (аліментарним дефіцитом холіну та метіоніну) підвищується акумуляція гідроксипроліну у печінці та прискорюється розвиток стеатогепатиту [125]. Засвідчено суттєве підвищення рівня гідроксипроліну в печінці мишей за умов важкої ГГЦ, що викликана дефіцитом цистатіонін- β -синтази [125]. Результати наших досліджень показали, що при поєднанні ВЖД з помірно-важкою ГГЦ, індукованою тривалим введенням тіолактону гомоцистеїну, відбувається значна акселерація печінкового фіброгенезу.

Виникає питання щодо патогенетичних механізмів, які можуть прискорювати трансформацію простого стеатозу у стеатогепатит за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Результати наших досліджень підтвердили, що механізми прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, реалізуються через ключовий чинник «другого удару» - потенціювання оксидативного стресу.

При поєднанні ГГЦ та ВЖД спостерігалось більш суттєве підвищення продукції супероксид-аніону та пригнічення антиоксидантної активності, що супроводжувалось більшим накопиченням продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів, ніж за ізольованої ГГЦ або ВЖД (табл. 3.7, 3.8). Зокрема, у щурів в групі ВЖД+ГГЦ активність NADPH-оксидази була вищою на 32,5 та 36,0 %, активність СОД – нижчою на 23,0 та 36,3 %, активність тіоредоксинредуктази – достовірно нижчою на 17,9 та 19,9 %, вміст ТБК-АП вищим на 41,3 та 58,0 %, а карбонільованих протеїнів – вищим на 14,9 та 42,0 %, ніж у щурів в групах з ізольованою ГГЦ та ВЖД, відповідно. Вміст гомоцистеїну тісно корелював з маркерами оксидативного стресу в печінці: прямо - з активністю NADPH-оксидази, рівнем ТБК-АП та карбонільних груп протеїнів ($r_{sp} = 0,69$; $0,70$ та

0,58, $p < 0,01$), обернено – з активністю СОД та тіоредоксинредуктази ($r_{Sp} = -0,64$ та $-0,61$, $p < 0,01$).

Роль ГГЦ у розвитку оксидативного стресу в печінці відмічена також в експериментальних та клінічних дослідженнях [136, 269]. Зокрема, у щурів з важкою метіоніновою ГГЦ відмічалось підвищення рівня карбонільованих протеїнів в мітохондріях гепатоцитів [216]. У пацієнтів з НАЖХП реєструвався значно нижчий рівень глутатіонпероксидази, загального та відновленого глутатіону, підвищений рівень малонового діальдегіду в сироватці крові, ніж у практично здорових осіб [269]. Механізми активації оксидативного стресу за умов ГГЦ є досить різноманітними і описані в багатьох роботах [11, 34, 297]. Окремо слід відмітити здатність ГГЦ підвищувати експресію NADPH-оксидази та інгібувати експресію тіоредоксинредуктази *in vitro* [169]. Подібні зміни активності NADPH-оксидази та тіоредоксинредуктази в печінці щурів за умов тіолактонової ГГЦ відмічались і в інших дослідженнях [19]. Зауважимо, що тіоредоксинредуктаза залучена до регуляції багатьох процесів, зокрема внутрішньоклітинного редокс-статусу запалення, апоптозу, проліферації клітин, туморогенезу [103, 132], тому порушення її активності може бути вагомим механізмом трансформації стеатозу у стеатогепатит за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Порушення рівня та експресії тіоредоксинредуктази розглядають як чинник гепатоцелюлярної карциноми [304], холангіокарциноми [97].

Одним із найбільш вагомих патогенетичних механізмів трансформації простого стеатозу у НАСГ є імунозапальна та профіброгенна стимуляція за участі прозапальних цитокінів [203, 289]. Результати наших досліджень засвідчили, що за умов ГГЦ та ВЖД, і особливо за їхнього поєднання суттєво підвищується сироватковий вміст TNF α (табл. 3.9). Зокрема, у щурів групи ВЖД+ГГЦ сироватковий рівень TNF α був на 12,6 та 69,8 % вищим за такий у щурів в групах з ізольованою ГГЦ та ВЖД, що свідчить про адитивний ефект вказаних чинників на продукцію прозапальних медіаторів. Рівень гомоцистеїну в крові прямо корелював з рівнем TNF α ($r_{xy} = 0,64$, $p < 0,01$).

В досліджах *in vitro* було показано, що TNF α викликає акселерацію апоптозу в стеатозних гепатоцитах [310]. Чутливість гепатоцитів до прозапальної та проапоптичної дії TNF α тісно асоціюється з підвищенням вмісту S-аденозилгомоцистеїну (попереднику гомоцистеїну) в гепатоцитах, що було показано *in vivo* у щурів з етаноловим ураженням печінки [96] та *in vitro* при інкубації гепатоцитів людини з гомоцистеїном [258]. Зауважимо, що при введенні тіолактону гомоцистеїну в печінці суттєво знижується активність S-аденозилгомоцистеїнгідролази та пригнічуються реакції метилування [19, 60]. Отже, при поєднанні ВЖД з ГГЦ гепатотоксичний ефект TNF α може суттєво посилитись.

В процесі метаболізму сірковмісних амінокислот в гепатоцитах активно синтезується газотрансмітер H₂S, який здатний взаємодіяти з активними формами кисню, реакційно-здатними ліпідними дериватами, регулювати активність багатьох редокс-чутливих протеїнів [181, 185, 186]. За останні роки накопичились чисельні дані щодо причетності H₂S до процесів фіброгенезу у різних органах і тканинах [181, 185]. Було показано, що розвиток CCl₄-індукованого фіброзу печінки супроводжується зниженням сироваткового та печінкового рівня H₂S та пригніченням його ендогенної продукції [60, 182]. Введення екзогенного донору H₂S (NaHS) покращувало функціональний стан печінки, зменшувало продукцію прозапальних цитокінів, в той час як пригнічення ендогенної продукції H₂S поглиблювало гепатотоксичний ефект CCl₄ [182]. Засвідчено, що донори H₂S сприяють зниженню вмісту гіалуронової кислоти, гідроксипроліну, колагену у печінці, пригнічують проліферацію зірчастих клітин та апоптоз гепатоцитів у тварин з різними моделями печінкового фіброзу [128, 182, 248, 275, 302]. Нещодавно було відмічено, що H₂S залучений до регуляції аутофагії [184] і, очевидно, може бути причетний до контролю акумуляції жиру в гепатоцитах. Між тим, роль H₂S в патогенезі НАЖХП, в тому числі і за умов ГГЦ, остаточно не з'ясована.

Нами було встановлено, що за ізольованої тіолактонової ГГЦ, як і за ізольованої ВЖД, відмічається вірогідне зменшення вмісту H₂S в печінці, однак найбільш суттєвий дефіцит цієї біологічно активної молекули формується саме

за умов поєднаної дії вказаних чинників (рис. 3.4). Так, вміст H_2S в печінці щурів в групі контролю становив $5,09 \pm 0,21$ мкг/г тканини, а в групах ГГЦ, ВЖД та ВЖД+ГГЦ – $3,75 \pm 0,25$; $4,02 \pm 0,13$; $3,11 \pm 0,15$ мкг/г тканини, відповідно (критерій Краскела-Уолліса, $p=0,000$). Отже, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, печінковий вміст H_2S був достовірно нижчим на 22,6 %, ніж за НАЖХП. Негативний вплив ГГЦ на обмін H_2S може реалізуватись через різні механізми, адже ензими метаболізму цієї біологічно активної молекули є редокс-чутливим протеїнами [186]. Зауважимо, що при поєднанні ВЖД та ГГЦ істотно посилюється оксидативний стрес, що може прискорювати деградацію H_2S в гепатоцитах. Кореляційний аналіз підтвердив значимий обернений зв'язок між рівнем H_2S в печінці та рівнем гомоцистеїну в сироватці крові ($r_{xy} = -0,73$, $p < 0,01$). Вміст H_2S в печінці достовірно обернено корелював з маркерами деструкції гепатоцитів, оксидативного стресу, печінкового стеатозу та фіброзу ($r_{sp} = -0,47-0,60$), рівнем $TNF\alpha$ в сироватці ($r_{sp} = -0,40$). Натомість, між печінковим вмістом H_2S та маркерами антиоксидантного захисту (активністю тіоредоксинредуктази та СОД), вмістом фосфоліпідів в печінці виявлялись прямі зв'язки ($r_{sp} = 0,53-0,65$). Отже, зниження вмісту H_2S в гепатоцитах може бути вагомим механізмом трансформації стеатозу у НАСГ за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

До чинників, що мають антифіброзну дію та детермінують репараційний потенціал печінки, належить IGF-1 [192, 195, 208]. IGF-1 залучений до регуляції метаболізму вуглеводів та ліпідів, посилює чутливість клітин до інсуліну, запобігає мітохондріальній дисфункції та підвищує продукцію АТФ, контролює диференціацію та проліферацію гепатоцитів та інших клітин [70, 192].

Результати наших досліджень засвідчили, що за умов ГГЦ, ВЖД і, особливо, за їх поєднання суттєво знижується рівень IGF-1 в сироватці крові щурів. Так, у щурів групи контролю рівень IGF-1 в сироватці крові становив $303,4 \pm 7,91$ нг/мл, а в групах ГГЦ, ВЖД та ВЖД+ГГЦ - $208,2 \pm 11,5$; $255,9 \pm 9,87$ та $173,6 \pm 5,48$ нг/мл. Отже, рівень IGF-1 в сироватці крові щурів за умов НАЖХП, асоційованою з ГГЦ, був на 16,6 та 32,2 % нижчим, ніж за умов ізольованої ГГЦ та НАЖХП, відповідно (критерій Краскела-Уолліса, $p < 0,001$).

За НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, рівень IGF-1 достовірно обернено корелював з активністю АЛТ та ГГТ в сироватці крові ($r_{sp} = -0,58; -0,52$), печінковим вмістом гідроксипроліну ($r_{sp} = -0,54$), маркерами стеатозу печінки ($r_{sp} = -0,40-0,47$), натомість прямо корелював з вмістом H_2S та активністю тіоредоксинредуктази в печінці ($r_{sp} = 0,47$ та $0,50$). Однак, найбільш тісний обернений зв'язок виявлявся між рівнем IGF-1 та рівнем гомоцистеїну в сироватці крові ($r_{xy} = -0,68, p < 0,01$). Як відомо, біля 75 % циркулюючого в крові IGF-1 секретується гепатоцитами [192]. Тому можна припустити, що виявлене нами зниження рівня IGF-1 в сироватці крові є наслідком пригнічення його продукції у печінці в умовах ВЖД та ГГЦ.

Зниження рівня IGF-1 в крові розглядають як чинник формування метаболічного синдрому, ожиріння та кардіоваскулярних ускладнень [159, 192, 194, 252]. В одному дослідженні засвідчено, що зниження рівня IGF-1 може відображати наявність цитолізу та холестазу в пацієнтів НАЖХП на тлі ЦД2 та ожиріння. У пацієнтів з рівнем IGF-1 нижчим $143,9 \pm 4,92$ нг/мл виявлявся високий ризик прогресування порушень функціонального стану печінки [315].

Питання щодо молекулярних механізмів депримуєчого впливу ГГЦ на систему IGF-1 потребує подальшого вивчення. В досліджах *in vitro* в культурі стовбурових клітин кісткового мозку було засвідчено, що високі рівні гомоцистеїну здатні індукувати оксидативний стрес та апоптоз і таким чином пригнічувати клітинну продукцію IGF-1 [102]. За результатами клінічних спостережень, підвищення рівня гомоцистеїну супроводжується зниженням рівня IGF-1 в сироватці крові у практично здорових чоловіків [87], осіб похилого віку [294] та у дітей з дефіцитом соматотропного гормону [267]. Зниження рівня IGF-1 може виявитись чинником, що індукує розвиток ГГЦ за НАЖХП, оскільки *in vitro* встановлена здатність цього ростового фактору підвищувати активність метіонінсинтетази та посилювати фолатзалежне метилування фосфоліпідів [92].

Таким чином, НАЖХП, асоційована з ГГЦ, характеризується більш «агресивними» біохімічними порушеннями на рівні оксидативного стресу, продукції прозапального та профіброгенного медіатора $TNF\alpha$, чинників

антифіброзного та репараційного потенціалу гепатоцитів - IGF-1 та H₂S, що веде до прискореної акумуляції жиру та продукції колагенових протеїнів у печінці. Отже, ГГЦ можна розглядати як чинник, що задіяний на всіх напрямках «множинного удару» при НАЖХП.

Сучасна фармакотерапія НАЖХП передбачає використання гіполіпідемічних засобів для корекції гіперхолестеринемії та гіпертриацилгліцеролемії. Цілком очевидно, що гіполіпідемічна терапія буде потрібна при НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, у зв'язку з акселерацією формування проатерогенної дисліпідемії. Питання щодо ефективності засобів з різними механізмами гіполіпідемічної дії, особливо їх вплив на вміст H₂S та IGF-1 за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, залишається не з'ясованим.

Для корекції метаболічних порушень були обрані засоби з політропними властивостями - симвастатин та препарат ω-3 ПНЖК. За даними літератури, вказаним засобам притаманний не лише гіполіпідемічний ефект, а й антиоксидантний, протизапальний, цитопротекторний ефекти [110, 197, 230]. В окремих роботах засвідчено, що прийом ω-3 ПНЖК знижував рівень гомоцистеїну у пацієнтів з ЦД2 [295] та гемодіалітичних пацієнтів [142], а прийом симвастатину супроводжувався зниженням рівня гомоцистеїну у пацієнтів з дисліпідемією [74, 143, 313]. Препарати із групи фібратів не застосовувались у зв'язку з наявністю доведеної гіпергомоцистеїнемічної дії [130, 131].

Після моделювання НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, тварин переводили на звичайний раціон (СД із фізіологічним вмістом жирів та інших нутрієнтів), на фоні якого проводили лікування симвастатином (20 мг/кг маси тіла) або препаратом ω-3 ПНЖК (150 мг/кг маси тіла) упродовж 14 та 28 діб, відповідно (більш детально схема дослідження описана в розділах 2 та 4). В дослідженні були застосовані фармакопейні препарати симвастатину (Вазиліп, KRKA) та ω-3 ПНЖК (Епадол-Нео, АТ «Київський вітамінний завод»). Капсула епадолу-нео містить 1000 мг етилових ефірів ω-3 ПНЖК: 300 мг ейкозапентаєнової кислоти, 200 мг докозагексаєнової кислоти, 498 мг інших ЖК, d-α-токоферол (Е) - 2 мг. Дві групи шурів з НАЖХП+ГГЦ (групи порівняння) отримували лише СД упродовж 14 та 28 діб.

Результати наших досліджень засвідчили, що за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, нормалізація кількості жирів в раціоні тварин упродовж 14 та 28 днів не спричиняла антиліпогенного ефекту, не забезпечувала зниження маси печінки та селезінки, однак виявлені розлади не поглиблювались (табл. 4.1, 4.2). Застосування симвастатину не спричиняло змін масо-ростових параметрів, не впливало на акумуляцію вісцерального жиру, не впливало відношення П/С у щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни дослідження. Натомість 28-добовий прийом препарату ω -3 ПНЖК викликав зменшення ІМТ, вмісту вісцерального жиру, а також сприяв регресу гепато- та спленомегалії у щурів з НАЖХП+ГГЦ. В цій групі ІМТ, сумарна маса внутрішнього жиру та індекс ожиріння були достовірно нижчими (на 10,5; 18,4 та 16,5 %), ніж у нелікованих щурів, хоча і залишались вірогідно вищими (на 18,5; 51,5 та 26,5 %), ніж у контрольних щурів.

Аналіз біохімічних показників стану печінки засвідчив (табл. 4.3 - 4.7), що окреме застосування СД не викликало суттєвої позитивної динаміки маркерів цитолізу та дисліпідемії, не коригувало ознаки стеатозу та фіброзу у щурів з НАЖХ+ГГЦ станом на 14 та 28 добу. Застосування засобів з гіполіпідемічною дією на тлі СД зменшувало масштабність метаболічних розладів в сироватці крові та печінці у щурів з НАЖХП+ГГЦ, і достовірна позитивна динаміка реєструвалась як правило на 28 добу лікування. В цілому, прийом препарату ω -3 ПНЖК більш ефективно покращував функціональний стан печінки, ніж прийом симвастатину, при цьому вплив гіполіпідемічних засобів на окремі біохімічні параметри суттєво відрізнявся.

Так, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, застосування симвастатину практично не впливало на рівень печінкових ензимів в сироватці крові, натомість застосування препарату ω -3 ПНЖК суттєво зменшувало біохімічні ознаки пошкодження гепатоцитів. Зокрема, через 28 днів активність АЛТ та ГГТ у щурів, які отримували препарат ω -3 ПНЖК, наближалась до такої в контролі і була достовірно нижчою на 41,4 та 37,1 % ($p < 0,05$), ніж у щурів, які отримували симвастатин. Також, застосування препарату ω -3 ПНЖК сприяло нормалізації рівня альбуміну в сироватці крові, на відміну від симвастатину.

Застосування обох гіполіпідемічних засобів суттєво зменшувало проатерогенний патерн, при цьому симвастатин більш ефективно коригував рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ, а препарат ω -3 ПНЖК – рівень ТГ та ХС ЛПВЩ, що в цілому забезпечило еквівалентне зниження індексу атерогенності у щурів з НАЖХП+ГГЦ. Слід відзначити, що за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, симвастатин за гіпохолестеролемічним ефектом достовірно перевершував препарат ω -3 ПНЖК, але поступався йому за здатністю коригувати рівень антиатерогенних ЛПВЩ у різні терміни досліджу. Так, через 28 діб у щурів з НАЖХП+ГГЦ рівні ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ та ЛПДНЩ були нижчими при прийомі симвастатину на 31,4; 44,8; 59,7 та 44,7 %, а при прийомі препарату ω -3 ПНЖК - на 23,3; 48,6; 46,8 та 51,1 %, ніж у щурів, що отримували лише СД. Застосування симвастатину викликало тенденцію до підвищення рівня ХС ЛПВЩ, в той час як застосування препарату ω -3 ПНЖК достовірно підвищило рівень ХС ЛПВЩ на 31,0 та 20,6 % у щурів з НАЖХП+ГГЦ порівняно із нелікованими тваринами та тваринами, що отримували лише СД.

За здатністю коригувати стеатоз печінки, асоційований з ГГЦ, більш ефективним виявився препарат ω -3 ПНЖК, який не лише зменшував акумуляцію нейтральних жирів та холестеролу, а сприяв нормалізації вмісту фосфоліпідів в гепатоцитах, що зумовлює мембраностабілізуючий ефект. Станом на 28 добу у щурів, що отримували симвастатин, вміст ТГ в печінці залишався вищим (на 180,2 %), а вміст фосфоліпідів нижчим (на 19,5 %), ніж в контролі. При цьому, рівень ЗХС в печінці щурів, що отримували симвастатин, був на 27,0 та 17,0% нижчим, ніж у нелікованих щурів та щурів, що перебували на СД. Натомість, у щурів, що отримували препарат ω -3 ПНЖК, на 14 та 28 добу вміст ТГ був достовірно нижчим на 11,3 та 34,9 %, ніж у щурів, що отримували симвастатин. Застосування препарату ω -3 ПНЖК упродовж 14 та 28 діб спричиняло вірогідне підвищення вмісту фосфоліпідів в печінці (на 12,6 та 19,2 %) відносно щурів, які отримували СД, а також сприяло зниженню вмісту ЗХС в печінці.

Симвастатин суттєво поступався препарату ω -3 ПНЖК за впливом на біохімічні маркери фіброзу печінки. Так, прийом симвастатину не спричиняв

вірогідних змін вмісту гідроксипроліну в печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни досліджу. Натомість, при застосуванні ω -3 ПНЖК вміст гідроксипроліну в печінці на 14 та 28 добу був достовірно нижчим на 40,7 та 58,7 %, ніж у щурів, що отримували лише СД, та на 13,5 та 28,3 % нижчим, ніж у щурів, що отримували симвастатин.

Антифіброзний та антистеатозний потенціал статинів пов'язують зі здатністю викликати активацію рецепторів PPAR α , підвищувати мітохондріальну та пероксисомальну оксидацію ЖК, зменшувати акумуляцію вільного холестеролу в гепатоцитах, пригнічувати активність зірчастих клітин в умовах *in vitro* та *in vivo* [107, 281, 283]. Показано, що у мишей, що утримувались на метіонін-холіндефіцитній дієті, 6-тижневе застосування різних статинів (флувастатину, правастатину, симвастатину, аторвастатину, розувастатину в однаковій дозі 15 мг/кг) зменшувало печінковий рівень ТГ та сироватковий рівень АЛТ, а при гістологічному дослідженні спостерігалась значна редукція стеатозу та фіброзу печінки [283]. В той же час, мета-аналіз клінічних досліджень щодо ефективності та безпеки застосування статинів у пацієнтів з НАЖХП та НАСГ засвідчив, що симвастатин не викликає суттєвого зниження рівня трансаміназ, ГГТ, лужної фосфатази, хоча забезпечував корекцію дисліпідемії та частково сприяв покращенню ехокардіографічної картини печінки [282]. Однак, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, симвастатин не показав суттєвого антистеатогенного та антифіброгенного ефекту.

Політропні властивості ω -3 ПНЖК, особливо їх вплив на процеси стеатогенезу та фіброгенезу, привертають все більшу увагу. Показано, що ω -3 ПНЖК активують рецептори PPAR α та γ і таким чином можуть стимулювати окиснення жирних кислот, підвищувати чутливість до інсуліну, інгібувати печінковий ліпогенез та пригнічувати печінкову продукцію активних форм кисню [148, 150, 229]. Відмічена здатність ω -3 ПНЖК пригнічувати експресію матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 та їхніх тканинних інгібіторів [147], що може пояснювати антифіброзний ефект вказаних засобів. Нещодавно опубліковані результати мета-аналізу 10 рандомізованих клінічних досліджень переконливо свідчать, що ω -3 ПНЖК виявляють антистеатогенний ефект і

сприяють зменшенню вмісту жиру в гепатоцитах, нормалізації рівня ГГТ, ТГ та ЛПВЩ, хоча менш ефективно коригують рівень АЛТ, ЗХС та ЛПНЩ [148].

Як було зазначено вище, за поєднання ВЖД з ГГЦ суттєво потенціюється дія чинників «множинного удару» - виникає дисбаланс між прооксидантними та антиоксидантними системами в печінці, підвищується сироватковий рівень TNF α , формується дефіцит антифіброзних модуляторів H₂S та IGF-1. Результати наших досліджень засвідчили, що застосування СД не забезпечувало належної корекції чинників прогресування НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, а вплив на ці фактори гіполіпідемічних засобів мав суттєві відмінності (табл. 4.8-4.9). Виявилось, що препарат ω -3 ПНЖК істотно перевершував симвастатин за впливом на чинники «другого удару» у різні терміни досліджу. Наприклад, застосування препарату ω -3 ПНЖК вірогідно зменшувало ознаки оксидативного стресу – на 14 та 28 добу знижувались активність NADPH-оксидази (на 20,7 та 12,4 %) та вміст ТБК-АП та карбонільних груп протеїнів (на 22,3-44,3%), але підвищувалась активність антиоксидантних ензимів тіоредоксинредуктази (на 19,1 та 16,3 %) СОД (на 46,0 та 53,7 %) порівняно з тваринами, що отримували СД. 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 суттєво впливало на активність антиоксидантних ензимів в гепатоцитах.

Антиоксидантні властивості гіполіпідемічних засобів можуть реалізуватись через різні механізми, однак їх вплив на систему тіоредоксинредуктази викликає найбільший інтерес. Показано, що статини (особливо симвастатин) можуть пригнічувати базальну активність експресії гена TxR1 і викликати специфічне зниження рівня тіоредоксинредуктази 1 в клітинах гепатоми *in vitro* [278]. В іншому дослідженні було засвідчено пригнічення експресії тіоредоксинредуктази та тіоредоксину в печінці щурів з гепатоцелюлярною карціномною *in vivo* та в біоптатах печінки людей, що тривалий приймали аторвастатин (80 мг) [284]. Цей механізм з одного боку свідчить про антиканцерогенний потенціал статинів, а з іншого боку може

бути шляхом реалізації їх токсичних ефектів [284]. За нещодавно опублікованими даними, статини викликали зниження експресії мРНК антиоксидантних ензимів (СОД, каталази, глутатонпероксидази) в печінці мишей із стеатозом, індукованим метіонінхоліндефіцитною дієтою [283].

Натомість встановлено, що докозогексаєнова кислота може підвищувати експресію генів антиоксидантних протеїнів (Txn1-2, Trxrd1-2, Prdx3, Srxn1) системи тіоредоксин/ пероксиредоксин та глутатіон/ глутаредоксин, збільшувати активність тіоредоксинредуктази *in vitro* [93]. Тривале застосування ейкозопентаєнової кислоти сприяло нормалізації рівня ВЖК, TNF α та тіоредоксину в сироватці крові у пацієнтів з НАЖХП, що може відображати її здатність до зниження рівня оксидативного стресу в гепатоцитах [174]. Результати наших досліджень узгоджуються з даними літератури і підтверджують відмінності впливу симвастатину та ω -3 ПНЖК на активність тіоредоксинредуктази в печінці щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ.

Відмінності антистеатогенної та антифіброзної ефективності гіполіпідемічних засобів за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, можуть пояснюватись особливостями їхньої дії на профіброгенні чинники (рівень гомоцистеїну та TNF α) та чинники, що детермінують репараційний потенціал гепатоцитів (H₂S та IGF-1) (табл. 4.10-4.11).

Застосування симвастатину не викликало вірогідних змін рівня гомоцистеїну в сироватці крові у щурів з НАЖХП+ГГЦ у різні терміни дослідження. В той же час, застосування препарату ω -3 ПНЖК викликало вірогідне зниження рівня гомоцистеїну (на 15,6 та 29,6 %) станом на 14 та 28 добу порівняно з щурами, що отримували лише СД. Отже, препарат ω -3 ПНЖК перевершував симвастатин (на 13,3 - 27,6 %, $p < 0,05$) за гіпогомоцистеїнемічним ефектом.

Аналіз літератури засвідчив, що симвастатин може знижувати рівень гомоцистеїну у пацієнтів з первинною дисліпідемією, однак цей ефект суттєво модифікується при поліморфізмі ензиму фолатного циклу метилентетрагідрофолатредуктази [143]. За іншими даними, симвастатин взагалі не виявляє гіпогомоцистеїнемічного ефекту, що було показано на прикладі постменопаузальних жінок з гіперхолестеролемією [263]. У пацієнтів з

дисліпідемією зниження рівня гомоцистеїну спостерігалось лише при тривалому застосуванні симвастатину у високих дозах (80 мг), в той час як при застосуванні дози, оптимальної для корекції рівнів ЗХС та ЛПНЩ (40 мг), такого ефекту не виникало [313]. Механізми гіпогомоцистеїнемічної дії статинів пов'язують із впливом на ензими метаболізму гомоцистеїну, однак інформація з цього питання є обмеженою. *In vitro* в культурі клітин гепатоми симвастатин підвищував експресію метилентерагідрофолатредуктази та стимулював фолатзалежний метаболізм гомоцистеїну [223]. З іншого боку, гомоцистеїн може суттєво модифікувати антиатерогенний та протизапальний ефект статинів за рахунок пригнічення експресії апоА1 протеїнів та посилення експресії нуклеарного фактора каппа В (NF- κ B) [223].

У препаратів ω -3 ПНЖК наявність гіпогомоцистеїнемічного ефекту була відмічена в ряді клінічних досліджень, але вони не включали пацієнтів з НАЖХП [83, 122, 142, 295]. За даними мета-аналізу 21 дослідження (3267 учасників), застосування ω -3 ПНЖК викликало зниження рівня гомоцистеїну в середньому на 1,18 мкмоль/л і цей ефект суттєво посилювався в комбінації з фолієвою кислотою та іншими вітамінами групи В, залученими до регуляції метаболізму сірковмісних амінокислот [83]. Механізми гіпогомоцистеїнемічної дії ω -3 ПНЖК остаточно не з'ясовані. В одному дослідженні засвідчено, що ω -3 ПНЖК можуть впливати на експресію генів *Bhmt* та *Cbs*, які контролюють біосинтез ензимів утилізації гомоцистеїну (бетаїгомоцистеїнметилтрансферази та цистатіонін- β -синтази) [206]. В культурі клітин ω -3 ПНЖК (особливо докозогоксаєнова кислота) виявляли здатність регулювати експресію мРНК ензимів метаболізму гомоцистеїну: підвищували експресію метилентетрагідрофолатредуктази, цистатіонін- γ -ліази, пригнічували експресію метіонінаденозилтрансферази, не впливали на експресію цистатіонін- β -синтази та S-аденозилгомоцистеїнгідролази [179, 180]. Отже, отримані нами дані щодо метаболічних ефектів симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, в цілому узгоджуються з даними літератури.

Встановлено, що препарат ω -3 ПНЖК більш ефективно коригує сироватковий рівень профібrogenного медіатора TNF α , ніж симвастатин. Вміст

TNF α в сироватці крові станом на 14 та 28 добу був нижчим на 35,6 і 32,5 % в групі симвастатину та на 45,4 і 43,4 % нижчим в групі ω -3 ПНЖК, ніж у відповідних групах, що отримували СД. Станом на 28 добу рівень TNF α у щурів, лікованих препаратом ω -3 ПНЖК, був достовірно нижчим (на 16,0 %), ніж у щурів, лікованих симвастатином. Здатність симвастатину та ω -3 ПНЖК знижувати рівень чи експресію TNF α , що веде до зменшення прозапальної стимуляції, відмічена також в інших дослідженнях [149, 168, 277].

Нами вперше було засвідчено, що за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, прийом препарату ω -3 ПНЖК сприяє зменшенню дефіциту H₂S в печінці на відміну від симвастатину. Застосування симвастатину не викликало вірогідних змін вмісту H₂S в печінці у щурів з НАЖХП+ГГЦ: станом на 14 та 28 добу досліду цей показник суттєво не відрізнявся від такого у нелікованих щурів. В той же час, застосування препарату ω -3 ПНЖК викликало на 14 та 28 добу підвищення печінкового вмісту H₂S на 20,4 та 41,2 % (відносно щурів, що отримували СД). Отже, за здатністю коригувати вміст H₂S в печінці препарат ω -3 ПНЖК вірогідно перевершував симвастатин (на 28,9 та 32,0 %, $p < 0,05$) у різні терміни досліду.

Механізми впливу статинів та ω -3 ПНЖК на систему H₂S поки що не визначені. Експериментально засвідчено, що статини не впливають на активність H₂S-синтезуючих ензимів, але можуть прискорювати мітохондріальне окиснення H₂S в печінці, зокрема права- та аторвастатин [110]. Ймовірно, що виявлена нами здатність препарату ω -3 ПНЖК підвищувати вміст H₂S в печінці також реалізується через пригнічення оксидативного стресу, зменшення мітохондріальної дисфункції, нормалізацію активності тіоредоксинредуктази. Зауважимо, що підвищення вмісту тіоредоксину може посилювати продукцію та депонування H₂S у мітохондріях [183, 186].

Аналіз сироваткового рівня IGF-1 виявив найбільш суттєві відмінності в ефектах гіполіпідемічних засобів. Так, на 14 та 28 добу прийом симвастатину викликав зниження рівня IGF-1 в сироватці крові (на 12,2 та 25,6 %) , натомість прийом препарату ω -3 ПНЖК викликав підвищення (на 12,3 та 31,1 %) відносно нелікованих щурів. В цілому, рівень IGF-1 у щурів, лікованих

препаратом ω -3 ПНЖК, виявився достовірно вищим на 28,0 та 76,2 %, ніж у щурів, лікованих симвастатином. Отже, за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, вплив симвастатину та препарату ω -3 ПНЖК на рівень IGF-1 в сироватці крові (і очевидно на його продукції в печінці) є абсолютно протилежним.

Механізми впливу засобів з гіполіпідемічною дією на систему IGF-1 остаточно не з'ясовані і інформації щодо цього питання поки є досить обмеженою. Існують дані, що інгібітори ГМГ-КоА-редуктази здатні порушувати IGF-1-залежний сигналінг через інгібування післятрансляційного ізопренілювання та глікозилювання рецепторів IGF-1, що пов'язано з пригніченням синтезу мевалонової кислоти, ізопреноїдів і доліхолу [91, 139, 162, 279, 285]. Відмічена здатність симвастатину пригнічувати експресію рецепторів IGF-1, активувати апоптоз та пригнічувати проліферацію різних пухлинних клітин *in vitro* [280].

В одному з досліджень засвідчено, що збагачення дієти ω -3 ПНЖК викликало підвищення секреції IGF-1 у тварин [141]. Тривале застосування ω -3 ПНЖК (у вигляді риб'ячого жиру) викликало стать-специфічне підвищення рівня IGF-1 в крові у немовлят (лише у хлопчиків) [161]. За іншими даними, застосування ω -3 ПНЖК підвищувало рівень IGF-1 в сироватці крові у пацієнтів з кардіоваскулярної патологією [316]. Прийом ω -3 ПНЖК на фоні низькожирової дієти викликав підвищення рівня IGF-1 у практично здорових постменопаузальних жінок [213]. Таким чином, отримані нами результати не суперечать даним літератури щодо різного ефекту статинів та ω -3 ПНЖК на систему IGF-1 за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Цілком очевидно, що цей механізм може пояснювати суттєві відмінності антистеатогенної та антифіброзної дії вказаних гіполіпідемічних засобів.

Виникає питання, в якій мірі зміни біохімічних маркерів стеатозу та фіброзу узгоджуються з морфологічними змінами печінки за умов НАЖХП, асоційованої з ГГЦ. Морфологічні дослідження підтвердили, що ГГЦ прискорювала розвиток стеатозу печінки та його трансформацію у стеатогепатит за умов 60-добового застосування ВЖД (рис. 5.1 - 5.6). Зокрема, у щурів з групи 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; виявлено повнокрів'я міжчасточкових вен в портальних зонах, синусоїдів та центральних вен. В той же час, як у щурів з НАЖХП були наявні осередки жирової дистрофії, некрозу гепатоцитів та лейкоцитарна інфільтрація, але вони були менш виразними, ніж у тварин з групи НАЖХП+ГГЦ.

Відомо, що для моделювання НАЖХП у тварин застосовують різні стеатогенні дієти - ВЖД, метіонін- та холін-дефіцитну дієту, атерогенну дієту з надлишком холестеролу та холату, дієту «Кафетерій», дієту з навантаженням фруктозою, які викликають схожі порушення морфологічного стану печінки [86, 89, 112, 214, 247]. Показано, що застосування ВЖД протягом 21 доби викликає явища стеатозу, макрофагальної інфільтрації та утворення вогнищ некрозу в печінці щурів [86]. Тривале вживання дієти «Кафетерій», яка полягає у годуванні щурів *ad libitum* фастфудом та снековими продуктами, призводить до мікроезичулярного стеатозу гепатоцитів, незначної макрофагальної інфільтрації та невеликої кількості запальних вогнищ у тканинах печінки [112]. Отже, отримані нами дані щодо морфологічних змін в печінці при 60-добовому застосуванні ВЖД узгоджуються з даними літератури.

Нами не знайдено інформації щодо морфологічних змін в печінці щурів при одночасному застосуванні ВЖД та тіолактону гомоцистеїну. Однак, існують дані, введення щурам тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг маси тіла упродовж 6 тижнів) на тлі CCl_4 викликало проліферацію фібробластів, відкладання колагену в перисинусоїдальних просторах, а також зменшення кількості жиронакопичувальних клітин в печінці [64]. Також було показано, що введення тіолактону гомоцистеїну індукує важкі зміни в суднах мікроциркуляторного русла, зокрема розвиток гіперплазії та гіпертрофії гладких м'язів середньої оболонки, склероз та фіброз зовнішньої оболонки артеріол [64]. У щурів, яким підшкірно вводили гомоцистеїн з 6 по 28 добу

після народження, виявлялись запальні інфільтрати, фіброз та зниження вмісту глікогену та глікопротеїну при гістологічному дослідженні печінки [175]. У пацієнтів із НАЖХП, у яких реєструються високі рівні гомоцистеїну в крові, вивлені макро- та мікроезичулярні жирові включення в гепатоцитах, вогнища некрозу, портальний фіброз, запальні та фіброзні інфільтрати в біоптатах печінки [242]. Результати наших досліджень підтвердили, що при поєднанні ГГЦ та ВЖД стеатогенний та фіброгенний ефект потенціюється.

На наступному етапі ми оцінили, в якій мірі застосування гіполіпідемічних засобів, котрі виявили кардинально протилежний вплив на рівень IGF-1 в сироватці крові, впливало на морфологічний стан печінки щурів з НАЖХП, асоційованою з ГГЦ (рис. 5.7 - 5.14, табл. 5.1). Зауважимо, що нормалізація раціону тварини (СД) не викликала суттєвих змін морфологічної структури печінки у щурів із НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, через 14 та 28 діб. Застосування симвастатину на тлі СД не спричиняло значного регресу морфологічних ознак стеатогепатиту у різні терміни досліджу. Зокрема, станом на 28 добу в печінці щурів з НАЖХП+ГГЦ, яких лікували симвастатином, виявлені гепатоцити з явищами гідропічної дистрофії цитоплазми, а 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.

Існують дані, що лікування симвастатином призвело до незначного зменшення проявів стеатозу, фіброзу, вогнищ запалення в печінці за НАЖХП у мишей [283], а лікування аторвастатином повністю усунуло гістологічні ознаки некрозапалення гепатоцитів у щурів [312]. Однак, в нещодавно проведеному клінічному дослідженні було продемонстровано, що у пацієнтів із НАЖХП, які приймали статини (симвастатин, флувастатин, правастатин, ловастатин), за даними біопсії прояви стеатозу та фіброзу печінки були вираженими та не відрізнялись від таких у пацієнтів, які не приймали статини [286].

При морфологічному дослідженні структури печінки у щурів з НАЖХП+ГГЦ, яким проводили корекцію препаратом ω -3 ПНЖК, через 28 діб було виявлено зменшення кількості гепатоцитів із жировою дистрофією

цитоплазми, а також площі некрозу гепатоцитів. Отримані нами дані узгоджуються із результатами інших досліджень. Показано, що 20-тижневне застосування ω -3 ПНЖК забезпечило суттєве зменшення стеатозу, ознак інфільтрації та повну відсутність некротично змінених гепатоцитів у щурів з НАЖХП, індукованою 8-тижневою ВЖД [133]. Існують дані, що у щурів, яких 16 тижнів утримували на ВЖД, введення риб'ячого жиру істотно зменшувало печінковий стеатоз та фіброз, а також запальну інфільтрацію гепатоцитів [160]. В одному із рандомізованих контрольованих досліджень було підтверджено, що прийом докозагексаєнної кислоти призвів до значного зменшення проявів стеатозу у дітей в порівнянні із групою, що приймала плацебо [134].

Таким чином, за НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, препарат ω -3 ПНЖК виявив більший лікувальний ефект, ніж симвастатин, за результатами біохімічної та морфологічної оцінки маркерів стеатозу та фіброзу печінки.

За даними літератури [34, 226, 235, 289, 291, 297] та результатами власних досліджень розроблена схема, що відображає вплив ГГЦ на етапи формування НАЖХП та показані можливі механізми патогенетичної корекції стеатозу печінки за допомогою гіполіпідемічних засобів – симвастатину та ω -3 ПНЖК.

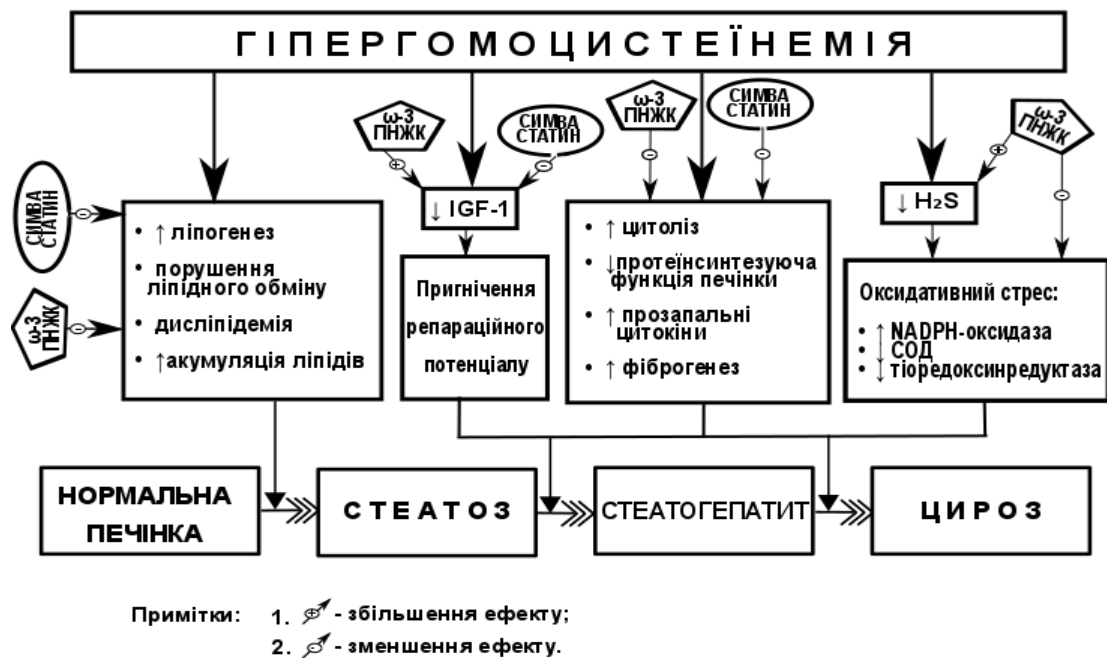


Рис. 6.1 Механізми впливу ГГЦ на формування НАЖХП та можливі патогенетичні мішені при корекції гіполіпідемічними засобами.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукового завдання - на основі встановлення нових біохімічних чинників прогресування експериментальної неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП), асоційованої з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), 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 та 123,4%) порівняно із окремим застосуванням високожирової дієти. 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 α (на 69,8 %) порівняно із окремим застосуванням високожирової

дієти ($p < 0,05$). Між рівнем гомоцистеїну та маркерами стеатозу та фіброзу печінки виявляються значимі кореляційні зв'язки ($r = 0,55-0,68$).

3. Застосування високожирової дієти та введення тіолактону гомоцистеїну викликає зниження вмісту H_2S в печінці та зниження рівня IGF-1 в сироватці крові щурів, однак при поєднанні цих стеатогенних чинників депримуєчий ефект істотно посилюється. За НАЖХП, асоційованої з ГГЦ, вміст H_2S та IGF-1 були достовірно нижчими на 22,6 та 32,2 %, ніж за НАЖХП. Рівні H_2S та IGF-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 на 14 та 28 добу в сироватці крові 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 ω -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 ω -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 ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Адаптована клінічна настанова «Неалкогольна жирова хвороба печінки» / Н.В. Харченко, [та ін.] // Наказ МОЗ України від 06.11.2014 №826. <http://www.dec.gov.ua/mtd/reestr.html>.
2. Андрушко І. І. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та аргініну у практично здорових осіб: вікові та статеві особливості // Український кардіологічний журнал. 2008. №5. С. 89-95.
3. Андрушко І.І. Гіпергомоцистеїнемія як фактор патогенезу атеросклерозу та ішемічної хвороби серця: механізми її проатерогенної дії: автореф. дис. На здобуття наук. ступеня д.мед.н / Нац. акад. мед. наук України, Нац. наук. центр «Ін-т кардіології ім. акад. М. Д. Стражеска», Київ. 2012. 34 с.
4. Бабак О.Я. Колесникова Е.В. Неалкогольная жировая болезнь печени и кардиоваскулярный риск: современный взгляд на проблему, оптимизация терапии // Гастроентерология. 2012. №5. С. 68–70.
5. Бабак О.Я., Колесникова Е.В., Дубров К.Ю. Неалкогольный стеатоз печени - "аккорд" метаболических нарушений / О.Я. Бабак [и др.] // Український терапевтичний журнал. 2011. №1. С. 5–11.
6. Бивалькевич Н.В., Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П. Методические подходы к экспериментальному моделированию неалкогольной жировой болезни печени / Н.В. Бивалькевич [и др.] // РЖГГК. 2015. №4. С. 39–45.
7. Біохімічні зміни в крові, печінці та нирках при експериментальній гіпергомоцистеїнемії за її лікування вітамінами та вітамінно-мінеральним комплексом / К. П. Постовітенко [та ін.] // Вісник Вінницького національного медичного університету. 2005. Т. 9, №2. С. 222-227.
8. Владимиров Ю.В., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука. 1972. 252 с.
9. Власенко А.В. Влияние гипергомоцистеинемии на развитие неалкогольной жировой болезни печени при сахарном диабете // Международный эндокринологический журнал. 2013. №49. С. 10–14.

10. Вплив медикаментозних та хірургічних методів лікування на профіль артеріального тиску у хворих на морбідне ожиріння і артеріальну гіпертензію / А.О.Шкрюба [та ін.] // Український науково-медичний молодіжний журнал. 2014. №1. С. 36–141.
11. Гіпергомоцистеїнемія: медико-соціальні та фармакологічні аспекти / Н. В. Заїчко [та ін.] // Фармацевтичний кур'єр. 2012. №9. С. 30-35.
12. Глущенко С.В. Гіпергомоцистеїнемія как предиктор развития и прогрессирования неалкогольной жировой болезни печени // Проблеми безперервної медичної освіти та науки. 2014. №2. С. 89–92.
13. Глущенко С.В. Оптимізація діагностики та лікування неалкогольного стеатогепатита у хворих на цукровий діабет 2 типу шляхом вивчення маркерів мітохондріальної дисфункції : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: 14.01.02 / ХМАПО. Х., 2015. 19 с.
14. Данченко О.П., Пентюк О.О. Оцінка протекторної дії триметазидину, тіотриазоліну, таурину та убіхінону на індуковану симвастатином міо- та гепатотоксичність у щурів з гіперхолестеринемією // Современные проблемы токсикологии. 2008. №3. С. 61–67.
15. Доклінічні дослідження гіпогомоцистеїнемічної дії потенційних лікарських засобів / О.О. Пентюк та ін.; К.: ДФЦ МОЗ України, 2007. 30 с.
16. Драпкина О.М., Смирин В.И., Ивашкин В.Т. Патогенез, лечение и эпидемиология НАЖБП – что нового? Эпидемиология НАЖБП в России // РМЖ. 2011. №28. С. 1717–1721.
17. Журавльова А.К. Неалкогольна жирова хвороба печінки у хворих на цукровий діабет 2-го типу і ожиріння // Ліки України. 2012. №7. С. 16–20.
18. Зайченко О.Е. Терапевтические мишени при неалкогольной жировой болезни печени // Сучасна гастроентерологія. 2014. №75. С. 130–138.
19. Заїчко Н.В. Вплив хронічного навантаження тіолактоном гомоцистеїну та його комбінації з L-NAME на ензими метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці щурів. Корекція вітамінно-мікроелементним комплексом // Вісник наукових досліджень. 2010. №2. С. 61-65.

20. 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.
21. Звягинцева Т.Д., Глущенко С.В. Неалкогольный стеатогепатит и методы патогенетической коррекции // Міжнародний медичний журнал. 2014. Т. 20, №78. С. 29–32.
22. Звягинцева Т.Д., Чернобай А.И., Глущенко С.В. Роль адеметионина в развитии и прогрессировании хронических заболеваний печени // Український медичний часопис. 2014. №3. С. 56–59.
23. Звягинцева Т.Д., Чернобай А.И., Глущенко С.В. Хроническое заболевание печени и нарушение синтеза S-аденозил-L-метионина // Сучасна гастроентерологія. 2014. Т.77, №3. С. 80–88.
24. Изменение жирнокислотного состава ДНК-связанных липидов селезенки крыс при фолат-индуцированной гипергомоцистеинемии как результат нестабильности геномной ДНК / Р.И. Жданов [и др.] // Казанский медицинский журнал. 2008. №2. С. 135–139.
25. Инструкция для приготовления основной диеты для крыс. Утверждена Институтом Питания АМН СССР 27.12.1952. М., 1952. 8 с.
26. 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.
27. КОМПЕНДИУМ 2015 - лекарственные препараты / за ред. Р. Богатирьової та ін.; К.: Морион. 2015. 1408 с.
28. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. 1990. Т. 36, №2. С. 88–91.
29. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа. 1980. 272 с.

30. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте: Монография / М. П. Западнюк и др.; К. : Вища школа, 1983. 246 с.
31. 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.
32. 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. С. 49–50.
33. 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.
34. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О. О. Пентюк [та ін.] // Український біохімічний журнал. 2003. Т. 75, №1. С. 5–17.
35. Михальчук Л.М., Єфімов А.С. Неалкогольна жирова хвороба печінки // Международный эндокринологический журнал. 2010. №26. С. 71-82.
36. Мохорт Т.В. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет: аспекты патогенеза, диагностики и лечения // Медицинские новости. 2012. №4. С. 4–10.
37. Некрут Д.О. Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування неалкогольної жирової хвороби печінки у щурів // Вісник морфології. 2016. Т. 22, №1. С. 40–45.
38. 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.

39. 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.
40. 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 сьогодення», 27-29 березня 2017 р., Вінниця. 2016. С. 50.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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 жирною 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.

46. 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.

47. Некрут Д.О., Заїчко Н.В. Вплив поєднання високожирової дієти та тіолактонової гіпергомоцистеїнемії на масо-ростові параметри та біохімічні маркери стану печінки у щурів // Буков. Мед. Віс. 2017. Т. 21, №2. С. 36–41.

48. 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.

49. Некрут Д.О., Заїчко Н.В., Штатсько О.І. Спосіб корекції неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією: пат. 119010 України: МПК А61К31/00, G09B23/28 № u2017 01693; заявл. 22.02.17; опубл. 11.09.17; Бюл. № 17.

50. Некрут Д.О., Ільченко О.В. Автоматизація розрахунку параметрів зворотної 4-параметричної логістичної кривої як градуовального графіка при визначенні концентрації гомоцистеїна імуноферментним методом // Матеріали ІХ Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення», 29-30 березня 2016 р. Вінниця. 2016. С. 22.

51. 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 сьогодення», 24 лютого 2016 р., Вінниця, ВМК. 2016. С. 68–70.

52. 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.

53. 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.
54. 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.
55. Ольховський О.С. Вплив тривалого введення тіолактону гомоцистеїну на вміст гідрогенсульфіду та показники про-антиоксидантної системи міокарду щурів різних вікових груп // Медична хімія. 2014. Т.16, №1(58). С. 34-38.
56. Ожиріння й неалкогольна жирова хвороба печінки з позиції кардіоваскулярного ризику в практиці сімейного лікаря / В.І. Величко [та ін.] // Медицина транспорту України. 2014. №1. С. 79–82.
57. Орловський В.Ф., Кучма Н.Г. Вплив корекції гіпергомоцистеїнемії на функціональні печінкові проби та ліпідний профіль у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки в поєднанні з цукровим діабетом 2-го типу // Міжнародний ендокринологічний журнал. 2015. №69. С. 31–34.
58. Патогенетичні аспекти гіпергомоцистеїнемії та перспективи створення лікарських засобів для лікування патології, асоційованої з порушеннями обміну гомоцистеїну / О.О. Пентюк [та ін.] // Biomedical and Biosocial Anthropology. 2008. №10. С. 297–303.
59. Пентюк А.А., Гуцол В.И., Яковлева О.А. Определение фосфолипидов по образованию гидрофобного комплекса с феротиоцианатом аммония // Лаб. дело. 1987. №6. С. 457–459.
60. Пентюк Н.О. Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування СС14-індукованого фіброзу печінки у щурів // Сучасна гастроентерологія. 2009. Т. 5, №49. С. 33–37.

61. Пентюк Н.О. Вплив донорів метильних груп бетаїну та S-аденозилметіоніну на формування експериментального цирозу печінки у щурів // Вісник проблем біології і медицини. 2013. Т. 102, №3. С. 148–152.
62. Пентюк Н.О. Гіпергомоцистеїнемія та асоційовані з нею метаболічні та судинні фактори прогресування фіброзу і цирозу печінки: можливості патогенетичної терапії : дис. докт. мед. наук: 14.01.36 / ВНМУ. В., 2011. 334 с.
63. Пентюк Н.О. Метаболічні предиктори фіброзу печінки у хворих на хронічні гепатити // Експериментальна та клінічна медицина. 2011. Т. 1, №50. С. 134–138.
64. Пентюк Н.О., Король А.П. Морфологічні аспекти впливу гіпергомоцистеїнемії на печінковий фіброгенез у щурів // Вісник Вінницького національного медичного університету. 2009. Т. 13, №2. С. 460–465.
65. Пентюк О.О., Луцюк М.Б., Андрушко І.І. Вітаміни В9, В12 та В6, поліморфізм ферментів їх обміну, зв'язок з метаболізмом гомоцистеїну, роль в патології. Ренесанс клінічної вітамінології // Медична хімія. 2007. Т. 9, №1. С. 122–127.
66. Поготова Г.А. Вплив метаболічних препаратів з гепатопротекторною дією на показники цитолізу в сироватці крові щурів при токсичному гепатиті // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. Т. 3, №4. С. 174–177.
67. Просоленко П.О., Колеснікова О.В. Аналіз ультрасонографічних особливостей варіантів неалкогольної жирової хвороби печінки на тлі метаболічного синдрому // Сучасна гастроентерологія. 2008. Т. 5, №43. С. 61–65.
68. Расин М.С. Роль рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом, в патологии печени // Сучасна гастроентерологія. 2013. Т. 3, №71. С. 122–127.
69. Рикало Н. А., Яровенко Л.О. Інсуліноподібний фактор росту - 1 у патогенезі хронічного алкогольного ураження печінки щурів різних вікових груп // Світ медицини та біології. 2015. №4. С. 129–136.
70. Рикало Н.А., Яровенко Л.О. Вплив інсуліноподібного фактора росту - 1 на процеси репаративної регенерації печінки у щурів різного віку за умов хронічної алкогольної інтоксикації // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2015. Т. 2, №41-II. С. 79–83.

71. Саркисов Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника. М.: Медицина 1996. 543 с.
72. Синдром гіпергомоцистеїнемії: етіопатогенез та фармакологічні аспекти
№огляд літератури / К.П. Постовітенко [та ін.] // Ультразвукова перинатальна
діагностика. 2009. №27-28. С. 282–296.
73. Синдром гіпергомоцистеїнемії: причини виникнення, способи
профілактики та лікування / М.Б. Луцюк [та ін.] // Рациональная
фармакотерапия. 2013. Т. 4, №29. С. 55–60.
74. Соболева Е.В. Гомоцистеинемия как мишень терапевтического
воздействия у больных ишемической болезнью сердца. Эффекты симвастатина //
РМЖ. 2007. №5. С. 340.
75. Современный профиль факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний
в городской популяции Украины / Е.И. Митченко [и др.] // Український
кардіологічний журнал. 2013. №4 Додатковий. С. 76–83.
76. Шевчук С.В., Пентюк О.О., Мусін Р.А., Заїчко Н.В. Спосіб визначення
карбонільних сполук в сироватці крові: пат. 58110А України: МПК 7 А61К35/16.
№ 2002107890; заявл. 04.10.2002; опубл. 15.07.2003; Бюл. № 7.
77. Титов В. Н. Функция митохондрий, карнитин, коэнзим-А, жирные
кислоты, глюкоза, цикл Рендла и инсулин (лекция) // Клиническая лабораторная
диагностика. 2012. №2. С. 32–42.
78. Ткач С.М., Чеверда Т.Л. Неалкогольна жирова хвороба печінки:
поширеність, природний перебіг, сучасні підходи до діагностики та лікування //
Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. 2016. Т. 1, №53. С. 60–71.
79. Ткаченко В.І. Аналіз поширеності та захворюваності на цукровий діабет
серед населення світу та України за 2003–2013 рр. // Ліки України. 2014. Т. 4,
№21. С. 55–59.
80. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної №спеціалізованої
та третинної №високоспеціалізованої медичної допомоги №УКПМД
«Неалкогольний стеатогепатит» / М.К. Хобзей [та ін.] // Наказ МОЗ України від
06.11.2014 №826. <http://www.dec.gov.ua/mtd/reestr.html>.

81. Фадеенко Г.Д., Колесникова Е.В. Возможности комплексной терапии неалкогольной жировой болезни печени с использованием препарата вазонат // Медичні перспективи. 2012. Т. XVII, №2. С. 50–56.
82. Хворостинка В.Н., Лахно О.В., Цивенко О.И. Особенности нарушения микро- и макроэлементарного спектра сыворотки крови при жировой дистрофии печени у больных СД 2 типа // Международный эндокринологический журнал. 2007. Т.3, №9. С. 23 -26.
83. A combination of omega-3 fatty acids, folic acid and B-group vitamins is superior at lowering homocysteine than omega-3 alone: A meta-analysis / Dawson S.L. [et al.] // Nutr Res. 2016. Vol. 36, №6. P. 499–508.
84. A conserved SREBP-1/phosphatidylcholine feedback circuit regulates lipogenesis in metazoans / Walker A. K. [et al.] // Cell. 2011. Vol. 147, №4. P. 840–852.
85. A descriptive study to provide evidence of the teratogenic and cellular effects of sibutramine and ephedrine on cardiac- and liver-tissue of chick embryos / Oberholzer H. M. [et al.] // Microsc Res Tech. 2015. Vol. 78, №8. P. 737–746.
86. A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet/ Baumgardner J.N. [et al.] // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008. Vol. 294, №1. P. G27-G38.
87. A panel study on the effects of a Chinese medicinal suppository, Vigconic VI-28, on insulin-like growth factor 1 and homocysteine in healthy men / Chui S.H. [et al.] // Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2004. Vol. 26, №5. P. 349–355.
88. A placebo-controlled, multicenter, double-blind, randomised trial of emricasan in subjects with non-alcoholic fatty liver disease №NAFLD and raised transaminases / Shiffman M., [et al.] // J Hepatol. 2015. doi:10.1016/S0168-8278№1530191-4.
89. A Silybin-Phospholipid Complex Prevents Mitochondrial Dysfunction in a Rodent Model of Nonalcoholic Steatohepatitis / Serviddio G. [et al.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2009. Vol. 332, №3. P. 922-932.
90. Abnormal lipid metabolism in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for hyperhomocysteinemia / Namekata K. [et al.] // J Biol Chem. 2004. Vol. 279, №51. P. 52961–52969.

91. Abrogation of insulin-like growth factor-I №IGF-I and insulin action by mevalonic acid depletion: synergy between protein prenylation and receptor glycosylation pathways / Siddals K.W. [et al.] // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279, №37. P. 38353–38359.
92. Activation of methionine synthase by insulin-like growth factor-1 and dopamine: a target for neurodevelopmental toxins and thimerosa / Waly M. [et al.] // *Mol Psychiatry*. 2004. Vol. 9, №4. P. 358–370.
93. Addition of docosahexaenoic acid, but not arachidonic acid, activates glutathione and thioredoxin antioxidant systems in murine hippocampal HT22 cells: potential implications in neuroprotection / Casañas-Sánchez V. [et al.] // *J Neurochem*. 2014. Vol. 131, №4. P. 470–483.
94. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase / Yamauchi T. [et al.] // *Nat Med*. 2002. Vol. 8, №11. P. 1288–1295.
95. Agius L. Dietary carbohydrate and control of hepatic gene expression: mechanistic links from ATP and phosphate ester homeostasis to the carbohydrate-response element-binding protein // *Proc Nutr Soc*. 2016. Vol. 75, №1. P. 10–18.
96. Alcohol-induced S-adenosylhomocysteine accumulation in the liver sensitizes to TNF hepatotoxicity: possible involvement of mitochondrial S-adenosylmethionine transport / Song Z. [et al.] // *Biochem Pharmacol*. 2007. Vol. 74, №3. P. 521–531.
97. Altered expression of thioredoxin reductase-1 in dysplastic bile ducts and cholangiocarcinoma in a hamster model / Yoon B.I. [et al.] // *J Vet Sci*. 2006. Vol. 7, №3. P. 211–216.
98. Altunkaynak B. Z., Ozbek E., Altunkaynak M. E. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet // *Saudi Med J*. 2007. Vol. 28, №3. P. 353–357.
99. Amir M., Czaja M.J. Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011. Vol. 5, №2. P. 159–166.
100. An open-label randomized control study to compare the efficacy of vitamin E versus ursodeoxycholic acid in nondiabetic and noncirrhotic Indian NAFLD patients / Parikh P. [et al.] // *Saudi J Gastroenterol*. 2016. Vol. 22, №3. P. 192–197.

101. Angulo P. Epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2007. №25. P. 883–889.
102. Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by homocysteine via activating JNK signal / Cai B. [et al.] // *PLoS One*. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0063561.
103. Arner E., Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase // *Eur. J. Biochem*. 2000. №267. P. 6102-6109.
104. Arterburn D. E, Crane P. K., Veenstra D. L. The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review // *Arch Intern Med*. 2004. Vol. 164, №9. P. 994–1003.
105. Arturi F., Succurro E., Procopio C. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor-I // *J Clin Endocrinol Metab*. 2011. doi:10.1210/jc.2011-1227.
106. Association of homocysteine level with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis / Dai Y. [et al.] // *J Clin Biochem Nutr*. 2016. Vol. 58, №1. P. 76–83.
107. Atorvastatin attenuates hepatic fibrosis in rats after bile duct ligation via decreased turnover of hepatic stellate cells / Trebicka J. [et al.] // *J Hepatol*. 2010. Vol. 53, №4. P. 702–712.
108. Autophagy: a new target for nonalcoholic fatty liver disease therapy / Mao Y. [et al.] // *Hepat Med*. 2016. №8. P. 27–37.
109. Baynes H. W. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus // *J Diabetes Metab*. 2015. doi:10.4172/2155-6156.100054.
110. Bełtowski J., Jamroz-Wiśniewska A. Modulation of H₂S metabolism by statins: a new aspect of cardiovascular pharmacology // *Antioxid Redox Signal*. 2012. Vol. 17, №1. P. 81–94.
111. Bray G.A., Bellanger T. Epidemiology, trends, and morbidities of obesity and the metabolic syndrome // *Endocrine*. 2006. Vol. 2, №1. P. 109–117.
112. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet / Sampey B. P. [et al.] // *Obesity* №Silver Spring. 2011. Vol. 19, №6. P. 1109–1117.

113. Carbone F., La Rocca C., Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin // *Biochimie*. 2012. Vol. 94, №10. P. 2082–2088.
114. Carvedilol induces endogenous hydrogen sulfide tissue concentration changes in various mouse organs / Wiliński B. [et al.] // *Folia Biol №Krakow*. 2011. Vol. 59, №3-4. P. 151–155.
115. Cellular cholesterol accumulation modulates high fat high sucrose №HFHS diet-induced ER stress and hepatic inflammasome activation in the development of non-alcoholic steatohepatitis / Bashiri A. [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. 2016. Vol. 1861, №7. P. 594–605.
116. Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008 / Younossi Z.M.[et al.] // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2011. Vol. 9, №6. P. 524–530.
117. Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation / Buchman A.L. [et al.] // *Hepatology*. 1995. Vol. 22, №5. P. 1399–1403.
118. Christensen R., Kristensen P. K., Bartels E. M. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials // *Lancet*. 2007. doi:10.1016/S0140-6736№0761721-8.
119. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats / Leopoldo A.S. [et al.] // *Braz J Med Biol Res*. 2016. doi:10.1590/1414-431X20155028.
120. Clinical Study of Serum Homocysteine and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Euglycemic Patients / Hu Y. [et al.] // *Med Sci Monit*. 2016. №22. P. 4146–4151.
121. Cohen J. C., Horton J. D., Hobbs H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights // *Science*. 2011. №332. P. 1519–1523.
122. Complementary effects of multivitamin and omega-3 fatty acid supplementation on indices of cardiovascular health in individuals with elevated homocysteine / Earnest C.P. [et al.] // *Int J Vitam Nutr Res*. 2012. Vol. 82, №1. P. 41–52.
123. C-reactive protein impairs hepatic insulin sensitivity and insulin signaling in rats: role of mitogen-activated protein kinases / Xi L. [et al.] // *Hepatology*. 2011. Vol. 53, №1. P. 127–135.

124. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver / Robert K. [et al.] // *Gastroenterology*. 2005. Vol. 128, №5. P. 1405-1415.
125. Cystathionine beta-synthase null homocystinuric mice fail to exhibit altered hemostasis or lowering of plasma homocysteine in response to betaine treatment / Maclean K. N. [et al.] // *Mol Genet Metab*. 2010. Vol. 101, №2-3. P. 163–171.
126. Day C.P., James O.F. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? // *Gastroenterology*. 1998. Vol. 114, №4. P. 842–845.
127. Decreased exposure of simvastatin and simvastatin acid in a rat model of type 2 diabetes / Xu D. [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014. Vol. 35, №9. P. 1215–1225.
128. Decreased expression of p38 MAPK mediates protective effects of hydrogen sulfide on hepatic fibrosis / Fan H.N. [et al.] // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013. Vol. 17, №5. P. 644–652.
129. Després J. P., Golay A., Sjöström L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia // *N Engl J Med*. 2005. doi:10.1056/NEJMoa044537.
130. Dierkes J., Luley C., Westphal S. Effect of lipid-lowering and anti-hypertensive drugs on plasma homocysteine levels // *Vasc Health Risk Manag*. 2007. Vol. 3, №1. P. 99–108.
131. Dierkes J., Westphal S., Luley C. The effect of fibrates and other lipid-lowering drugs on plasma homocysteine levels // *Expert Opin Drug Saf*. 2004. Vol. 3, №2. P. 101–111.
132. Differential thioredoxin reductase activity from human normal hepatic and hepatoma cell lines / Jung H. I. [et al.] // *Yonsei Med J*. 2004. Vol. 45, №2. P. 263–272.
133. Ding W.J., Wang Y., Fan J.G. Regulation of adipokines by polyunsaturated fatty acids in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis // *Arch Iran Med*. 2014. Vol. 17, №8. P. 563–568.

134. Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial / Nobili V. [et al.] // *Arch Dis Child*. 2011. Vol. 96, №4. P. 350–353.
135. Dyson J. K., Anstee Q. M., McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging // *Frontline Gastroenterol*. 2014. Vol. 5, №3. P. 211–218.
136. Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease / Pacana T. [et al.] // *PLoS One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0136822.
137. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes / Lazo M. [et al.] // *Diabetes Care*. 2010. Vol. 33, №10. P. 2156–2163.
138. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta-cell function, fat cell size, and ectopic lipid in overweight subjects / Larson-Meyer D. E. [et al.] // *Diabetes Care*. 2006. Vol. 29, №6. P. 1337–1344.
139. Effect of HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) reductase inhibitors on the concentration of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in hypercholesterolemic patients / Szkodziński J., [et al.] // *Pharmacol Rep*. 2009. Vol. 61, №4. P. 654–664.
140. Effect of methionine-deficient and methionine-supplemented diets on the hepatic one-carbon and lipid metabolism in mice / Aissa A.F. [et al.] // *Mol Nutr Food Res*. 2014. Vol. 58, №7. P. 1502–1512.
141. Effect of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid enriched diet on plasma IGF-1 and testosterone concentration, puberty and semen quality in male buffalo / Tran L.V. [et al.] // *Anim Reprod Sci*. 2016. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.08.012.
142. Effect of omega-3 supplementation on serum level of homocysteine in hemodialysis patients / Tayebi-Khosroshahi H. [et al.] // *Iran J Kidney Dis*. 2013. Vol. 7, №6. P. 479–484.
143. Effect of Simvastatin on Plasma Homocysteine Levels and Its Modification by MTHFR C677T Polymorphism in Chinese Patients with Primary Hyperlipidemia / Jiang S. [et al.] // *Cardiovascular Therapeutics*. 2013. doi:10.1111/1755-5922.12002.

144. Effect of Telmisartan or Losartan for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Fatty Liver Protection Trial by Telmisartan or Losartan Study №FANTASY / Hirata T. [et al.] // *Int J Endocrinol*. 2013. doi:10.1155/2013/587140.
145. Effect of vitamin B-12 and n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma homocysteine, ferritin, C-reaction protein, and other cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial / Huang T. [et al.] // *Asia Pac J Clin Nutr*. 2015. Vol. 24, №3. P. 403–411.
146. Effect of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome: A propensity score-matched cohort study / Kim G.H. [et al.] // *Clin Mol Hepatol*. 2015. Vol. 21, №4. P. 379–386.
147. Effects of long chain omega-3 fatty acids on metalloproteinases and their inhibitors in combined dyslipidemia patients / Derosa G. [et al.] // *Expert Opin Pharmacother*. 2009. Vol. 10, №8. P. 1239–1247.
148. Effects of Omega-3 Fatty Acid in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-Analysis / Lu W. [et al.] // *Gastroenterol Res Pract*. 2016. doi:10.1155/2016/1459790.
149. Effects of ω -3 fatty acids on toll-like receptor 4 and nuclear factor- κ B p56 in lungs of rats with severe acute pancreatitis / Wang B. [et al.] // *World J Gastroenterol*. 2016. Vol. 22, №44. P. 9784–9793.
150. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice / Ishii H. [et al.] // *J Hepatol*. 2009. Vol. 50, №3. P. 562–571.
151. Emodin alleviates hepatic steatosis by inhibiting sterol regulatory element binding protein 1 activity by way of the calcium/calmodulin-dependent kinase kinase-AMP-activated protein kinase-mechanistic target of rapamycin-p70 ribosomal S6 kinase signaling / Wang S. [et al.] // *Hepatol Res*. 2016. doi:10.1111/hepr.12788.
152. Enhancement of autophagy by simvastatin through inhibition of Rac1-mTOR signaling pathway in coronary arterial myocytes / Wei Y. [et al.] // *Cell Physiol Biochem*. 2013. Vol. 31, №6. P. 925–937.
153. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice / Chen W. [et al.] // *Cell Metab*. 2007. Vol. 5, №1. P. 73–79.

154. Expression and significance of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 in hepatocyte steatosis model / Zhang Q. [et al.] // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2012. Vol. 20, №3. P. 196–200.
155. Fan J.G. Peng Y.D. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: Asian definitions and Asian studies // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2007. Vol. 6, №6. P. 572–578.
156. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis №FLINT: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial / Neuschwander-Tetri B. A. [et al.] // *Lancet*. 2015. [doi:10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4).
157. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham offspring study / Meigs J.B. [et al.] // *Diabetes Care*. 2001. Vol. 24, №8. P. 1403–1410.
158. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: lessons from type 2 diabetic liver / Takamura T. [et al.] // *Endocr J*. 2012. Vol. 59, №9. P. 745–763.
159. Fatty Liver Index Associates with Relative Sarcopenia and GH/ IGF- 1 Status in Obese Subjects / Poggiogalle E. [et al.] // *PLoS One*. 2016. [doi:10.1371/journal.pone.0145811](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145811).
160. Fish oil alleviated high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via regulating hepatic lipids metabolism and metaflammation: a transcriptomic study / Yuan F., [et al.] // *Lipids Health Dis*. 2016. [doi: 10.1186/s12944-016-0190-y](https://doi.org/10.1186/s12944-016-0190-y).
161. Fish oil supplementation from 9 to 18 months of age affects the insulin-like growth factor axis in a sex-specific manner in Danish infants / Damsgaard C.T. [et al.] // *Br J Nutr*. 2016. Vol. 115, №5. P. 782–790.
162. Fluvastatin attenuates IGF-1-induced ERK1/2 activation and cell proliferation by mevalonic acid depletion in human mesangial cells / Shibata T. [et al.] // *Life Sci*. 2009. Vol. 84, №21-22. P. 725–731.
163. Gene polymorphisms associated with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease: a concise review / Li X.L. [et al.] // *Lipids Health Dis*. 2016. [doi:10.1186/s12944-016-0221-8](https://doi.org/10.1186/s12944-016-0221-8).

164. Genetic variation in the patatin-like phospholipase domain-containing protein-3 №PNPLA-3 gene in Asian Indians with nonalcoholic fatty liver disease / Bhatt S.P. [et al.] // *Metab Syndr Relat Disord*. 2013. Vol. 11, №5. P. 329–335.
165. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease / Chalasani N. [et al.] // *Gastroenterology*. 2010. Vol. 139, №5. P. 1567–1576.
166. Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan / Kitamoto T. [et al.] // *Hum Genet*. 2013. Vol. 132, №7. P. 783–792.
167. Gentile C.L., Pagliassotti M.J. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease // *J Nutr Biochem*. 2008. Vol. 19, №9. P. 567–576.
168. Gomaa A.M., Abd El-Aziz E.A. Omega-3 fatty acids decreases oxidative stress, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta in hyperthyroidism-induced hepatic dysfunction rat model // *Pathophysiology*. 2016. doi:10.1016/j.pathophys.2016.10.001.
169. H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells / Tyagi N. [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal*. 2009. Vol. 11, №1. P. 25-33.
170. Hepatic TLR4 signaling in obese NAFLD / Sharifnia T. [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015. 4. doi:10.1152/ajpgi.00304.2014.
171. High fat diet-induced liver steatosis promotes an increase in liver mitochondrial biogenesis in response to hypoxia / Carabelli J. [et al.] // *J Cell Mol Med*. 2011. Vol. 15, №6. P. 1329–1338.
172. High Fat Diets Induce Colonic Epithelial Cell Stress and Inflammation that is Reversed by IL-22 / Gulhane M. [et al.] // *Sci Rep*. 2016. doi:10.1038/srep28990.
173. High hepatic SCD1 activity is associated with low liver fat content in healthy subjects under a lipogenic diet / Silbernagel G. [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. 2012. doi:10.1210/jc.2012-2152.
174. Highly purified eicosapentaenoic acid treatment improves nonalcoholic steatohepatitis / Tanaka N. [et al.] // *J Clin Gastroenterol*. 2008. Vol. 42, №4. P. 413–418.

175. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats / Matté C. [et al.] // *Int J Dev Neurosci*. 2009. doi:/10.1016/j.ijdevneu.2009.03.005.
176. Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis / Sreckovic B. [et al.] // *Diabetes Metab Syndr*. 2016. doi:10.1016/j.dsx.2016.08.026.
177. Homocysteine thiolactone-induced hyperhomocysteinemia does not alter concentrations of cholesterol and SREBP-2 target gene mRNAs in rats / Stangl G.I. [et al.] // *Exp Biol Med* №Maywood. 2007. Vol. 232, №1. P. 81-87.
178. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways / Werstuck G.H. [et al.] // *J Clin Invest*. 2001. Vol. 107, №10. P. 1263–1273.
179. Huang T., Wahlqvist M. L., Li D Docosahexaenoic acid decreases plasma homocysteine via regulating enzyme activity and mRNA expression involved in methionine metabolism // *Nutr J*. 2010. doi:10.1016/j.nut.2009.05.015
180. Huang T., Wahlqvist M. L., Li D. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid on gene expression of the critical enzymes involved in homocysteine metabolism // *Nutr J*. 2012. doi:10.1186/1475-2891-11-6.
181. Hydrogen Sulfide as a Potential Therapeutic Target in Fibrosis / Zhang S. [et al.] // *Oxid Med Cell Longev*. 2015. doi:10.1155/2015/593407.
182. Hydrogen sulfide attenuates carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, liver cirrhosis and portal hypertension in rats / Tan G. [et al.] // *PLoS One*. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0025943.
183. Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant / Kimura H. [et al.] // *Antioxid Redox Signal*. 2012. Vol. 17, №1. P. 45–57.
184. Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway / Sun L. [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015. doi: 10.1152/ajpendo.00294.2015.
185. Hydrogen Sulfide: A Therapeutic Candidate for Fibrotic Disease / Song K. [et al.] // *Oxid Med Cell Longev*. 2015. doi:10.1155/2015/458720.
186. Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role / Zaichko N.V. [et al.] // *Ukr. Biochem. J*. 2014. Vol. 86, №5. P. 5-25.

187. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice / Hamelet J. [et al.] // *J Hepatol.* 2007. Vol. 46, №1. P. 151–159.
188. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats / Stefanello F.M. [et al.] // *Biochimie.* 2009. Vol. 91, №8. P. 961–968.
189. IGF-1 levels in different stages of liver steatosis and its association with metabolic syndrome / Mallea-Gil M.S. [et al.] // *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2012. Vol. 42, №1. P. 20–26.
190. Impact of *Anthocleista vogelii* root bark ethanolic extract on weight reduction in high carbohydrate diet induced obesity in male wistar rats / Anyanwu G.O. [et al.] // *Afr. J. Biochem. Res.* 2013. Vol. 7, №11. P. 225–232.
191. Impact of eight weeks endurance training on biochemical parameters and obesity-induced oxidative stress in high fat diet-fed rats / Emami S. R. [et al.] // *J Exerc Nutrition Biochem.* 2016. Vol. 20, №1. P. 29–35.
192. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome / Aguirre G.A. [et al.] // *J Transl Med.* 2016. doi:10.1186/s12967-015-0762-z
193. Insulin-like growth factor-I and -II levels are associated with the progression of nonalcoholic fatty liver disease in obese children / Cianfarani S. [et al.] // *J Pediatr.* 2014. Vol. 165, №1. P. 92–98.
194. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 are related to cardiovascular disease biomarkers in obese adolescents / Katz L.E. [et al.] // *Pediatr Diabetes.* 2016. Vol. 17, №2. P. 77–86.
195. Inzaghi E., Cianfarani S., Nobili V. Insulin-like growth factors №IGF-I and -II: New actors in the development of non-alcoholic fatty liver disease // *Expert Review of Endocrinology & Metabolism.* 2014. doi:10.1586/17446651.2014.900438.
196. Jakubowski H. The molecular basis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease // *Clin Chem Lab Med.* 2007. Vol. 45, №12. P. 1704–1716.
197. Kar S. Omacor and omega-3 fatty acids for treatment of coronary artery disease and the pleiotropic effects // *Am J Ther.* 2014. doi:10.1097/MJT.0b013e31822b5603.

198. Kemper J. K., Xiao Z., Ponugoti B. FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states // *Cell Metab.* 2009. Vol. 10, №5. P. 392–404.
199. Kim S. Y., Kim H., Min H. Effects of excessive dietary methionine on oxidative stress and dyslipidemia in chronic ethanol-treated rats // *Nutr Res Pract.* 2015. Vol. 9, №2. P. 144–149.
200. Krentz A. J., Fujioka K., Hompesch M. Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles // *Diabetes Obes Metab.* 2016. Vol. 18, №6. P. 558–570.
201. Krishnamurthy H. A. The Serum Gamma Glutamyl Transpeptidase - A Non invasive Diagnostic Bio Marker of Chronic Anicteric Non Alcoholic Liver Diseases // *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2013. Vol. 7, №4. P. 691–694.
202. Kucera O., Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats // *World J Gastroenterol.* 2014. Vol. 20, №26. P. 8364–8376.
203. Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease / Wenfeng Z. [et al.] // *Ann Hepatol.* 2014. Vol. 13, №5. P. 489–495.
204. Law K., Brunt E.M. Nonalcoholic fatty liver disease // *Clin Liver Dis.* 2010. Vol. 14, №4. P. 591–604.
205. Lipid accumulation stimulates the cap-independent translation of SREBP-1a mRNA by promoting hnRNP A1 binding to its 5'-UTR in a cellular model of hepatic steatosis / Siculella L. [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* 2016. Vol. 1861, №5. P. 471–481.
206. Long-term omega-3 fatty acid supplementation prevents expression changes in cochlear homocysteine metabolism and ameliorates progressive hearing loss in C57BL/6J mice / Martínez-Vega R. [et al.] // *J Nutr Biochem.* 2015. Vol. 26, №12. P. 1424–1433.
207. López-Vara M.C., Gasset M., Pajares M.A. Refolding and characterization of rat liver methionine adenosyltransferase from *Escherichia coli* inclusion bodies // *Protein Expr Purif.* 2000. Vol. 19, №2. P. 219–226.

208. Lewitt M.S., Dent M.S., Hall K. The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus // *J Clin Med*. 2014. Vol. 3, №4. P. 1561–1574.
209. Losartan may inhibit the progression of liver fibrosis in chronic HCV patients / Salama Z.A. [et al.] // *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2016. Vol. 5, №3. P. 249–255.
210. Losartan, an angiotensin-II type 1 receptor blocker, attenuates the liver fibrosis development of non-alcoholic steatohepatitis in the rat / Yoshiji H. [et al.] // *BMC Res Notes*. 2009. doi:10.1186/1756-0500-2-70.
211. Low insulin-like growth factor 1 is associated with low high-density lipoprotein cholesterol and metabolic syndrome in Chinese nondiabetic obese children and adolescents: a cross-sectional study / Liang S. [et al.] // *Lipids Health Dis*. 2016. doi:10.1186/s12944-016-0275-7.
212. Lower levels of insulin-like growth factor-1 standard deviation score are associated with histological severity of non-alcoholic fatty liver disease / Sumida Y. [et al.] // *Hepatol Res*. 2015. Vol. 45, №7. P. 771–781.
213. Low-fat diet with omega-3 fatty acids increases plasma insulin-like growth factor concentration in healthy postmenopausal women / Young L.R. [et al.] // *Nutr Res*. 2013. doi:10.1016/j.nutres.2013.04.011.
214. Mamikutty N., Thent Z.C., Suhaimi F.H. Fructose-Drinking Water Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Ultrastructural Alteration of Hepatocyte Mitochondria in Male Wistar Rat // *BioMed Research International*. 2015. doi:10.1155/2015/895961.
215. McCarty M.F. Increased homocysteine associated with smoking, chronic inflammation, and aging may reflect acute-phase induction of pyridoxal phosphatase activity // *Med Hypotheses*. 2000. Vol. 55, №4. P. 289–293.
216. Medvedev D.V., Zvyagina V.I. [The study of biochemical mechanisms of mitochondrial dysfunction in rats' hepatocytes during experimental hyperhomocysteinemia] // *Vopr Pitan*. 2016. Vol. 85, №1. P. 29–35.

217. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease
№NAFLD and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity /
Musso G. [et al.] // Ann Med. 2011. Vol. 43, №8. P. 617–649.
218. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance / Cani P.D. [et
al.] // Diabetes. 2007. Vol. 56, №7. P. 1761–1772.
219. Methionine adenosyltransferase purified from rat liver / Pérez-Mato I. [et al.] //
Croatica Chemica Acta. 2002. Vol. 75, №1. P. 247-254.
220. Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision
of creatine and guanidinoacetate / Stead L.M. [et al.] // Am J Physiol Endocrinol
Metab. 2001. №5. P. E1095-E1100.
221. Methyl-donor supplementation in obese mice prevents the progression of
NAFLD, activates AMPK and decreases acyl-carnitine levels / Dahlhoff C. [et al.] //
Mol Meta. 2014. Vol. 3, №5. P. 565–580.
222. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and serum
homocysteine levels in nonalcoholic fatty liver disease / Franco Brochado M.J. [et al.]
// Ann Nutr Metab. 2013. Vol. 63, №3. P. 193–199.
223. Mikael L.G., Rozen R. Homocysteine modulates the effect of simvastatin on
expression of ApoA-I and NF-kappaB/iNOS // Cardiovasc Res. 2008. 80№1. 151–158.
224. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated
steatohepatitis / Marí M. [et al.] // Cell Metab. 2006. Vol. 4, №3. P. 185–198.
225. Mitochondrial gene polymorphisms alter hepatic cellular energy metabolism and
aggravate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis / Schröder T. [et al.] // Mol
Metab. 2016. Vol. 5, №4. P. 283–295.
226. Monjur A. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015 // World J Hepatol. 2015.
Vol. 7, №11. P. 1450–1459.
227. MTHFR 677C/T and 1298A/C mutations and non-alcoholic fatty liver disease /
Kasapoglu B. [et al.] // Clin Med №Lond. 2015. Vol. 15, №3. P. 248–251.
228. Myers M. G., Cowley M. A., Münzberg H. Mechanisms of leptin action and
leptin resistance // Annu Rev Physiol. 2008. №70. P. 537–556.

229. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- α activation and PPAR- α /NF- κ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury / Zúñiga J. [et al.] // PLoS One. 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0028502.
230. Nakagami H., Jensen K.S., Liao J.K. A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms // *Ann Med*. 2003. Vol. 35, №6. P. 398–403.
231. 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.
232. Nekrut D.A., Il'chenko A.V. About the possible connection of nonalcoholic fatty liver disease with hyperhomocysteinemia // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы клинико-лабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией», 10-11 ноября 2015г., Самарканд, 2015. С. 177.
233. 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.
234. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with increased GHBP and reduced GH/IGF-I levels / Fusco A. [et al.] // *Clin Endocrinol* №Oxf. 2012. Vol. 77, №4. P. 531–536.
235. Non-Alcoholic Steatohepatitis: Limited Available Treatment Options but Promising Drugs in Development and Recent Progress Towards a Regulatory Approval Pathway / Filozof C. [et al.] // *Drugs*. 2015. Vol. 75, №12. P. 1373–1391.
236. Orlistat for overweight subjects with nonalcoholic steatohepatitis: A randomized, prospective trial / Harrison S.A. [et al.] // *Hepatology*. 2009. Vol. 49, №1. P. 80–86.
237. p22phox mRNA Expression and NADPH Oxidase Activity Are Increased in Aortas From Hypertensive Rats / Fukui T. [et al.] // *Circ Res*. 1997. doi:10.1161/01.RES.80.1.45.

238. Palmitate-induced Endoplasmic Reticulum stress and subsequent C/EBP α Homologous Protein activation attenuates leptin and Insulin-like growth factor 1 expression in the brain / Marwarha G. [et al.] // *Cell Signal*. 2016. Vol. 28, №11. P. 1789–1805.
239. Perła-Kaján J., Jakubowski H. Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism // *Amino Acids*. 2012. Vol. 43, №4. P. 1405–1417.
240. Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease // *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04640.
241. Plasma Levels of Homocysteine and Cysteine Increased in Pediatric NAFLD and Strongly Correlated with Severity of Liver Damage / Pastore A. [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. 2014. doi:[10.3390/ijms151121202](https://doi.org/10.3390/ijms151121202).
242. Plasmatic higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease №NAFLD / de Carvalho S. C. [et al.] // *Nutr J*. 2013. doi:10.1186/1475-2891-12-37.
243. Presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in a large prospective primary care cohort / Armstrong M. J. [et al.] // *J Hepatol*. 2012. №1. P. 234–240.
244. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: a review of 589 consecutive liver biopsies in a single center / Lee J.Y. [et al.] // *J Hepatol*. 2007. Vol. 47, №2. P. 239–244.
245. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994 / Lazo M. [et al.] // *Am J Epidemiol*. 2013. Vol. 178, №1. P. 38–45.
246. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010 / Flegal K.M. [et al.] // *JAMA*. 2012. Vol. 307, №5. P. 491–507.
247. Prevention and treatment effect of total flavonoids in *Stellera chamaejasme* L. on nonalcoholic fatty liver in rats / Wang Y. [et al.] // *Lipids in Health and Disease* 2015. doi:10.1186/s12944-015-0082-6.
248. Protective effects of hydrogen sulfide on oxidative stress and fibrosis in hepatic stellate cells / Fan H.N. [et al.] // *Mol Med Rep*. 2013. Vol. 7, №1. P. 247–253. **a**
249. Protective effects of saffron extract and crocin supplementation on fatty liver tissue of high-fat diet-induced obese rats / Mashmoul M., [et al.] // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016. doi:10.1186/s12906-016-1381-9.

250. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase / Corrales F.J. [et al.] // *J Nutr.* 2002. Vol. 132, №8. P. 2377S–2381S.
251. Relationship between serum circulating insulin-like growth factor-1 and liver fat in the United States / Runchey S.S. [et al.] // *J Gastroenterol Hepatol.* 2014. Vol. 29, №3. P. 589–596.
252. Ren J., Anversa P. The insulin-like growth factor I system: physiological and pathophysiological implication in cardiovascular diseases associated with metabolic syndrome // *Biochem Pharmacol.* 2015. Vol. 93, №4. P. 409–417.
253. Rimonabant improves cholesterol, insulin resistance and markers of non-alcoholic fatty liver in morbidly obese patients: a retrospective cohort study / Wierzbicki A.S. [et al.] // *Int J Clin Pract.* 2011. doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02683.
254. Role of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3 in development of non-alcoholic fatty liver disease / Ichikawa T. [et al.] // *Hepatol Int.* 2007. Vol. 1, №2. P. 287–294.
255. Role of hydrogen sulfide in portal hypertension and esophagogastric junction vascular disease / Wang C. [et al.] // *World J Gastroenterol.* 2014. 20№4. P. 1079–1087.
256. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice / Tanaka S. [et al.] // *Hepatology.* 2016. doi:10.1002/hep.28820.
257. Rui L. Energy Metabolism in the Liver // *Compr Physiol.* 2014. Vol. 4, №1. P. 177–197.
258. S-adenosylhomocysteine inhibits NF- κ B-mediated gene expression in hepatocytes and confers sensitivity to TNF cytotoxicity / Watson W.H. [et al.] // *Alcohol Clin Exp Res.* 2014. Vol. 38, №4. P. 889–896.
259. Safadi R., Konikoff F. M., Mahamid M. The fatty acid-bile acid conjugate Aramchol reduces liver fat content in patients with nonalcoholic fatty liver disease // *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.038.
260. Safety and efficacy of liraglutide in patients with type 2 diabetes and elevated liver enzymes: individual patient data meta-analysis of the LEAD program / Armstrong M. J. [et al.] // *Aliment Pharmacol Ther.* 2013. №2. P. 234–242.

261. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes / de Vries J.E. [et al.] // *J Lipid Res.* 1997. Vol. 38, №7. P. 1384–1394.
262. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells / Wei Y. [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006. doi: 10.1152/ajpendo.00644.2005.
263. Sbarouni E., Kyriakides Z.S., Kremastinos D.T. The effect of hormone replacement therapy and simvastatin on plasma homocysteine // *J Womens Health* №Larchmt. 2005. Vol. 14, №2. P. 154–158.
264. Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation / Marcos A. [et al.] // *Transplantation.* 2000. Vol. 69, №11. P. 2410–2415.
265. Serum concentrations of human insulin-like growth factor-1 and levels of insulin-like growth factor-binding protein-5 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology / Colak Y.[et al.] // *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012. Vol. 24, №3. P. 255–261.
266. Serum gamma-glutamyltranspeptidase distinguishes non-alcoholic fatty liver disease at high risk / Tahan V. [et al.] // *Hepatogastroenterology.* 2008. 55№85. P. 1433–1438.
267. Serum homocysteine concentrations in children with growth hormone №GH deficiency before and after 12 months GH replacement / Esposito V. [et al.] // *Clin Endocrinol №Oxf.* 2004. Vol. 61, №5. P. 607–611.
268. Serum homocysteine levels in patients with nonalcoholic fatty liver disease / Polyzos S.A. [et al.] // *Ann Hepatol.* 2012. Vol. 11, №1. P. 68–76.
269. Serum homocysteine levels, oxidative stress and cardiovascular risk in non-alcoholic steatohepatitis / Leach N.V. [et al.] // *Eur J Intern Med.* 2014. 25№8. P. 762–767.
270. Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease / Huang X.D. [et al.] // *World J Gastroenterol.* 2008. Vol. 14, №18. P. 2888–2893.

271. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis / Polyzos S.A. [et al.] // *Metabolism*. 2011. Vol. 60, №3. P. 313–326.
272. Serum γ -glutamyl Transferase Levels, Insulin Resistance and Liver Fibrosis in Patients with Chronic Liver Diseases / Petta S. [et al.] // *PLoS One*. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0051165.
273. Serviddio G., Bellanti F., Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease // *Free Radic Biol Med*. 2013. №65. P. 952–968.
274. Sex Difference in the Association between Serum Homocysteine Level and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease / Won B.Y. [et al.] // *Korean J Fam Med*. 2016. Vol. 37, №4. P. 242–247.
275. Shen Q., Qin Z., Lu A. Preventive effect of exogenous hydrogen sulfide on hepatic fibrosis in rats // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2012. Vol. 37, №9. P. 911–915.
276. Siddiqi N.J., Alhomida A.S. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble- and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues // *J Biochem Mol Biol*. 2003. Vol. 36, №2. P. 154–158.
277. Simvastatin Attenuates Oxidative Stress, NF- κ B Activation, and Artery Calcification in LDLR^{-/-} Mice Fed with High Fat Diet via Down-regulation of Tumor Necrosis Factor- α and TNF Receptor 1 / Lin C.P. [et al.] // *PLoS One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0143686.
278. Simvastatin inhibits the core promoter of the TXNRD1 gene and lowers cellular TrxR activity in HepG2 cells / Ekström L. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. 2013. Vol. 430, №1. P. 90–94.
279. Simvastatin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor / Sekine Y. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. Vol. 372, №2. P. 356–361.
280. Statin induces apoptosis of human colon cancer cells and downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor via proapoptotic ERK activation / Jang H.J. [et al.] // *Oncol Lett*. 2016. Vol. 12, №1. P. 250–256.

281. Statin induction of liver fatty acid-binding protein №L-FABP gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent / Landrier J. F. [et al.] // *J Biol Chem*. 2004. Vol. 279, №44. P. 45512–45518.
282. Statins for non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis / Eslami L. [et al.] // *Cochrane Database Syst Rev*. 2013. doi: 10.1002/14651858.CD008623.
283. Statins Increase Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in the Liver and Prevent Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice / Park H.S. [et al.] // *Diabetes Metab J*. 2016. Vol. 40, №5. P. 376–385.
284. Statins inhibit expression of thioredoxin reductase 1 in rat and human liver and reduce tumour development / Skogastierna C. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. 2012. Vol. 417, №3. P. 1046–1051.
285. Statins inhibit insulin-like growth factor action in first trimester placenta by altering insulin-like growth factor 1 receptor glycosylation / Forbes K. [et al.] // *Mol Hum Reprod*. 2015. Vol. 21, №1. P. 105–114.
286. Statins, antidiabetic medications and liver histology in patients with diabetes with non-alcoholic fatty liver disease / Nascimbeni F. [et al.] // *BMJ Open Gastroenterol*. 2016. doi: 10.1136/bmjgast-2015-000075.
287. Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research / Willebrords J. [et al.] // *Prog Lipid Res*. 2015. doi:10.1016/j.plipres.2015.05.002.
288. Takahashi Y., Soejima Y., Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis // *World J Gastroenterol*. 2012. Vol. 18, №19. P. 2300–2308.
289. Takaki A., Kawai D., Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis №NASH // *Int J Mol Sci*. 2014. Vol. 19, №5. P. 7352–7379.
290. Tetradecylthiopropionic acid induces hepatic mitochondrial dysfunction and steatosis, accompanied by increased plasma homocysteine in mice / Berge R.K. [et al.] // *Lipids Health Dis*. 2016. doi:10.1186/s12944-016-0192-9.

291. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association / Chalasani N. [et al.] // *Am J Gastroenterol*. 2012. Vol. 107, №6. P. 811–826.
292. The effect of glucose and insulin on the activity of enzymes in homocysteine metabolism №Abstract / Dicker-Brown A. [et al.] // *Diabetes*. 1999. SA 135.
293. The effects of berberine on hyperhomocysteinemia and hyperlipidemia in rats fed with a long-term high-fat diet / Chang X.X. [et al.] // *Lipids Health Dis*. 2012. doi:10.1186/1476-511X-11-86.
294. The effects of long-term resistance exercise on the relationship between neurocognitive performance and GH, IGF-1, and homocysteine levels in the elderly / Tsai C.L. [et al.] // *Front Behav Neurosci*. 2015. doi:10.3389/fnbeh.2015.00023.
295. The efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on plasma homocysteine and malondialdehyde levels of type 2 diabetic patients / Pooya S. [et al.] // *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010. doi:10.1016/j.numecd.2009.04.002.
296. The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans / Benhamed F. [et al.] // *J Clin Invest*. 2012. Vol. 122, №6. P. 2176–2194.
297. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health / Škovierová H. [et al.] // *Int J Mol Sci*. 2016. doi:10.3390/ijms17101733.
298. The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background / Yu J. [et al.] // *Gastroenterol Res Pract*. 2016. doi:10.1155/2016/2862173.
299. The Riddle of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Progression From Nonalcoholic Fatty Liver to Nonalcoholic Steatohepatitis / Sharma M. [et al.] // *J Clin Exp Hepatol*. 2015. Vol. 5, №2. P. 147–158.
300. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome / Lim J.S. [et al.] // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010. Vol. 7, №5. P. 251–264.
301. The role of micronutrients in the risk of urinary tract cancer / Golabek T. [et al.] // *Arch Med Sci*. 2016. Vol. 12, №2. P. 436–447.

302. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis / Fiorucci S. [et al.] // *Hepatology*. 2005. Vol. 42, №3. P. 539–548.
303. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver / Ueno T. [et al.] // *J Hepatol*. 1997. Vol. 27, №1. P. 103–107.
304. Thioredoxin reductase: a novel, independent prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma / Li C. [et al.] // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, №19. 17792–17804.
305. Tilg H., Moschen A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis // *Hepatology*. 2010. Vol. 52, №5. P. 1836–46.
306. Toll-like receptor 7 affects the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease / Kim S. [et al.] // *Sci Rep*. 2016. doi: 10.1038/srep27849.
307. Triacylglycerol/phospholipid molecular species profiling of fatty livers and regenerated non-fatty livers in cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model for homocysteinemia/homocystinuria / Ikeda K. [et al.] // *Anal Bioanal Chem*. 2011. Vol. 400, №7. P. 1853–1863.
308. Tsochatzis E.A., Papatheodoridis G.V, Archimandritis A. J. Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy // *Mediators Inflamm*. 2009. doi:10.1155/2009/831670.
309. Tsushima Y., Endo K. Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver: correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen // *Dig Dis Sci*. 2000. Vol. 45, №1. P. 196–200.
310. Tumor necrosis factor-alpha accelerates apoptosis of steatotic hepatocytes from a murine model of non-alcoholic fatty liver disease / Zhang W. [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. 2010. Vol. 391, №4. P. 1731–1736.
311. Vernon G., Baranova A., Younossi Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults // *Aliment Pharmacol Ther*. 2011. Vol. 34, №3. P. 274–285.
312. Vilà L., Rebollo A., Adalsteisson G.S. // Reduction of liver fructokinase expression and improved hepatic inflammation and metabolism in liquid fructose-fed

rats after atorvastatin treatment // *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011.
doi:10.1016/j.taap.2010.11.011.

313. Vladimirova-Kitova L. G., Deneva T. I., Marinov B. Effect of moderate and high-dose simvastatin on asymmetric dimethylarginine-homocysteine metabolic pathways in patients with newly detected severe hypercholesterolemia // *Cardiovasc Ther.* 2011. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00149.

314. Wong V.W. Nonalcoholic fatty liver disease in Asia: a story of growth // *J Gastroenterol Hepatol.* 2013. Vol. 28, №1. P. 18–23.

315. Zhuravlyova L.V., Ogneva E.V., Zhuravlyova A. K. Insulin-like growth factor-1: the influence on the liver function and relationships with resistin in patients with nonalcoholic fatty liver disease and its combination with type 2 diabetes mellitus // *Eksp Klin Gastroenterol.* 2015. №11. P. 23–27.

316. ω -3 fatty acid differentially modulated serum levels of IGF1 and IGFBP3 in men with CVD: a randomized, double-blind placebo-controlled stud / Gholamhosseini S. [et al.] // *Nutrition.* 2015. doi:10.1016/j.nut.2014.09.010.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

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 Wissenschaftsherald 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 сульфід у печінці, рівнів IGF-1 та TNF α в сироватці крові, статистичний аналіз результатів, написання статті).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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 α в сироватці крові методом ELISA, рівня гідроген сульфід у печінці, статистичний аналіз результатів, написання статті).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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 А61К31/00, 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 научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы клинико-лабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией», 10-11 ноября 2015 р., Самарканд, 2015. С. 177. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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 градуовального 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).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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, 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 сьогодення», 24 лютого 2016 р., Вінниця, ВМК. 2016. С. 68–70. (Виконала експериментальні дослідження, 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 сульфїду у формуванні неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією // Матеріали Х Української наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення», 27-29 березня 2017 р., Вінниця. 2017. С. 50. (Виконала експериментальні дослідження, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ А

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. (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, провела 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, провела статистичний аналіз та узагальнення матеріалу, написання тез).

ДОДАТОК Б

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы клинико-лабораторной и функциональной диагностики с клинической патофизиологией» (Самарканд, 10-11 ноября 2015 р., форма участі – публікація тез).
2. VIII Всеукраїнській науково–практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця, 9-10 листопада 2015 р., форма участі – публікація тез).
3. VIII науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 1-2 жовтня 2015 р., форма участі - публікація тез).
4. IX науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 29-30 вересня 2016 р., форма участі - публікація тез).
5. Всеукраїнській науково–практичній конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики та медицини сьогодні» (Вінниця, 24 лютого 2016 р., форма участі – публікація тез).
6. XIII міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2016» (Вінниця, 7-8 квітня 2016 р., форма участі – усна доповідь, отримала диплом третього ступеня в конкурсі серед молодих вчених в секції – клінічна фармація та клінічна фармакологія).
7. Міжнародній науково-практичній конференції «Natural science readings» (Bratislava, May 19-22, 2016, форма участі – публікація тез).

ПРОДОВЖЕННЯ ДОДАТКУ Б

8. Всеукраїнській науково–практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини - в практику охорони здоров'я 2016» (Запоріжжя 24-25 березня 2016 р., форма участі - публікація тез).
9. Всеукраїнській науково–практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 12-13 травня 2016 р., форма участі – публікація тез).
10. ІХ Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів, молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, 29-30 березня 2016 р., форма участі - публікація тез).
11. Міжнародній науково–практичній конференції «Рівень ефективності та необхідність впливу медичної науки на розвиток медичної практики» (Київ, 3-4 березня 2017 р., форма участі - публікація тез).
12. Х Українській науковій конференції студентів, аспірантів, молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, 27-29 березня 2017 р., форма участі - публікація тез).
13. XIV міжнародній науково–практичній конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку – 2017» (Вінниця, 26-28 квітня 2017 р., форма участі – публікація тез, усна доповідь, отримала диплом І ступеня за найкращу доповідь в конкурсі серед молодих вчених в секції - медична біохімія).
14. Міжнародній науково–практичній конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки і практики» (Одеса, 19-20 травня 2017 р., форма участі - публікація тез).
15. LX науково–практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 14-15 червня 2017 р., форма участі – публікація тез).