УДК 615.874.25+577.112.3:577.1:616.36
DOI:10.24061/2413-0737/XXI.2.82.1.2017.9

Д.О. Некрут, Н.В. Заічко

ВПЛИВ ПОЄДНАННЯ ВИСОКОЖИРОВОЇ ДІЄТИ ТА ТІОЛАКТОНОВОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ НА МАСО-РОСТОВІ ПАРАМЕТРИ ТА БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ СТАНУ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова

Резюме. Досліджено вплив поєднання високожирової дієти (ВЖД) та тіолактонової гіпергомоцистеїнемії на масо-ростові параметри та біохімічні маркери стану печінки у щурів. Показано, що при застосуванні ВЖД (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 індесу маси тіла (ІМТ) (на 8,9 %), сумарної маси жиру (на 39,8 %) та індексу ожиріння (на 18,5 %), більш суттєво порушується функціональний стан печінки та акселеруються процеси печінкового стеатогенезу та фіброгенезу, ніж в умовах окремого застосування ВЖД.

Ключові слова: гомоцистеїн, високожирова дієта, стеатоз, фіброз, неалкогольна жирова хвороба печінки.

Вступ. Останніми роками спостерігається неухильне зростання поширеності неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП), що здебільшого пояснюється високою розповсюдженістю таких коморбідних станів, як ожиріння, цукровий діабет та метаболічний синдром [1, 23]. За різними даними, частота НАЖХП у хворих на цукровий діабет 2-го типу може коливатися від 28 до 70 %, в осіб з ожирінням – від 60 до 95 %, в осіб із гіперліпідемією – від 27 до 92 % [13, 14, 20, 23]. Ще одним метаболічним розладом, з яким досить часто поєднується НАЖХП, є гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) [2, 11, 16]. В окремих експериментальних дослідженнях засвідчено, що ГГЦ може виступати самостійним чинником, який порушує морфофункціональний стан печінки. Так, тривале введення тіолактону гомоцистеїну ініціювало печінковий фіброгенез у здорових щурів та прискорювало у тварин формування CCl_4-індукованого фіброзу та цирозу печінки [5]. У щурів із дефектом цистатіон-β-синтази (ензиму утилізації гомоцистеїну) розвиток ГГЦ супроводжувався дизрегуляцією генів, які контролюють обмін ліпідів, процеси печінкового стеато- та фіброгенезу [24]. Не виключено, що ГГЦ може модифікувати ефект інших чинників печінкового стеатогенезу (наприклад, аліментарного надлишку ліпідів), впливаючи на перебіг ожиріння чи метаболічного синдрому. Однак, патогенетичне значення ГГЦ при НАЖХП за відсутності коморбідних патологій поки залишається дискутабельним.

Мета дослідження. Встановити вплив поєднання високожирової дієти та тіолактонової гіпергомоцистеїнемії на масо-ростові параметри та біохімічні маркери стану печінки у щурів.

Матеріал і методи. Досліди проведені на 56 білих лабораторних щурах-самцях із початковою масою 210-280 г. Під час експериментів тварини перебували в стандартних умовах віварію, з 12-годинним світловим режимом день/ніч, при температурі 22±2 °С та відносній вологості повітря 50±5 %, воду і корм отримували ad libitum згідно з нормативами. Всі досліди виконані відповідно 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 імені М.І.Пирогова.

Тварини були розподілені на 4 групи (n=14): група 1 та група 2 отримували стандартну дієту, збалансовану за всіма макро- та мікронутрієнтами (СД), яка 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) як описано раніше [4]. Щурам груп 2 та 4 щоденно вводили тіолактон D,L-гомоцистеїну гідрохлорид (Acros Organics, Італія), в дозі 100 мг/кг в/шл на 1 % крохмальному гелі, щури груп порівняння отримували еквівалентну кількість розчинника. Тривалість досліду становила 60 діб.

Масу тіла тварин (г) та назально-анальну довжину тіла (см) вимірювали 1 раз на тиждень. Індекс маси тіла (ІМТ) розраховували за відомою формулою [9]: ІМТ (г/см^2) = Маса тіла, г / (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: (Маса органа, г / Маса тіла, г)*100 %. Визначали відношення маси печінки (г) до маси селезінки (г) із розрахунку на 100 г маси тіла (П/С). Індекс ожиріння (adiposity index) визначали як описано [9]. Вилучали вісцеральну, епідидимальну та ретроперитонеальну жирову тканину, висушували за допомогою фільтрувального паперу та зважували. Індекс ожиріння розраховували як відношення з сумарної маси вісцерального, епідидималь-

© Д.О. Некрут, Н.В. Заічко, 2017

ного та ретроперитонеального жиру (г) до маси тіла (г) *100 %.

Сироватку крові отримували центрифугуванням цільної крові при 1500 g 15 хв при 18-22°С. Аліквоти сироватки відбирали в мікропробірки Eppendorf і зберігали при -20°С до проведення дослідження. Активність аланінамінотрансферази (АЛТ, КФ 2.6.1.2); рівень ліпідів – загального холестеролу (ЗХС), тригліцеридів (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. Білоксинтезувальну функцію печінки оцінювали за рівнем альбуміну в сироватці крові, який визначали за реакцією з бромкрезоловим зеленим за стандартним набором «Альбумін Агат (Біоконт)». Вміст сечовини в сироватці крові визначали за реакцією діацетилмонооксимом за стандартним набором «Сечовина Агат (Біоконт)». Вміст білірубіну визначали за реакцією з діазотованою сульфаніловою кислотою в наявності кофеїнового реактиву (метод Ендрашика) за набором «Білірубін» (Філісит-Діагностика, Україна). Активність гаммаглутамілтрансферази (ГГТ, КФ 2.3.2.2) у сироватці крові визначали за швидкістю вивільнення 4-нітроаніліну з гамма-глутамілнітроаніліду уніфікованим методом за набором «ГГТ» (Філісит-Діагностика, Україна). Вміст гомоцистеїну в сироватці крові визначали методом ELISA за набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія).

Для біохімічних досліджень печінку гомогенізували протягом 1-2 хв в охолодженому 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 Еппендорфа і до проведення досліджень зберігали при -20°С. Для оцінки стеатозу в гомогентах печінки визначали вміст ЗХС та ТГ за наборами «Холестерин-Ф», «Тригліцериди-Ф» (Філісит-Діагностика, Україна). Вміст загальних фосфоліпідів визначали екстракційно-фотометричним методом за утворенням гідрофобного комплексу з феротіоціанатом амонію [7]. Як маркер фіброзу в гомогенаті печінки визначали вміст гідроксипроліну за реакцією з парадиметиламінобензальдегідом як описано [25].

Обробку первинного матеріалу проводили за допомогою універсальних статистичних програм MS Excel, SPSS Statistics 22 for Windows, «STATISTICA 6,0» (ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № AXXR910A374605FA). Визначали середнє значення, стандартні похибки. Для оцінки відмінностей показників застосовували при нормальному розподілі – параметричний t-критерій Стьюдента, при відхиленні від нормального розподілу – непараметричний критерій U Мана-Уітні, нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уілка. Зв'язок між показниками визначали за допомогою кореляційного аналізу за Спірманом. Статистично значущими вважали відмінності при $p<0,05$. Результати наведено як M±m.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що введення тіолактону гомоцистеїну на тлі СД забезпечувало помірне підвищення рівня гомоцистеїну, застосування ВЖД викликало легку ГГЦ, у той час як уведення тіолактону гомоцистеїну на тлі ВЖД спричинило розвиток найбільш тяжкої ГГЦ. Так, через 60 діб рівень гомоцистеїну у щурів 2-, 3-ї та 4-ї групи був вищим на 88,1; 38,2 та 114,2 %, ніж у групі контролю (табл. 1). Рівень гомоцистеїну у щурів групи 4 був вищим 13,9 та 55,0 %, ніж у щурів груп 2 та 3 ($p<0,05$).

Аналіз масо-ростових показників у групах щурів, репрезентативних за початковою масою тіла, виявив вірогідні відмінності залежно від режиму харчування на 60-ту добу досліду (див. табл. 1). Так, у щурів групи 1 (контроль) середньо-добовий приріст маси тіла коливався в межах 1,03- 1,76 г/добу (95 % ДІ), а ІМТ становив 0,62-0,74 г/см^2. Майже аналогічні показники реєструвались у щурів групи 2, які отримували тіолактон гомоцистеїну на тлі СД. У той же час, у щурів групи 3 середньо-добовий приріст маси тіла був вищим на 50,3%, а ІМТ – вищим на 17,9 %, ніж у щурів групи 1. Виявилось, що стеатогенний ефект ВЖД істотно посилюється на тлі тіолактонової ГГЦ. Так, у щурів групи 4 середньо-добовий приріст маси тіла був достовірно вищим на 89,5; 38, 7% та 26,0 %, а ІМТ – вищим на 28,4; 24,6 % та 8,3 %, ніж у щурів у групах 1, 2 та 3.

Аналіз маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння у щурів підтвердив акселерацію стеатогенезу при поєднанні ВЖД та ГГЦ. Зокрема, у щурів групи 1 сумарна маса ретроперитонеального, епідидимального 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 щурів [9].

У щурів групи 2 спостерігалося невірогідне підвищення (на 9,0 %, $p=0,1$) маси внутрішнього жиру, але індекс ожиріння суттєво не змінився. Застосування ВЖД викликало достовірне зростання маси внутрішнього жиру та індексу ожиріння: за станом на 60-ту добу у щурів групи 3 вказані показники були на 36,6 % та 21,3 % вищими, ніж у щурів групи 1, і на 25,4 % та 17,1 % вищими, ніж у щурів групи 2 відповідно. При поєднанні ВЖД та ГГЦ приріст жирової маси суттєво підвищувався: у щурів групи 4 сумарна маса внутрішнього жиру перевищувала таку в групах 1 та 3 на 74,8 % та 28,0 %, а індекс ожиріння – на 43,7 % та 18,5 % відповідно. Рівень гомоцистеїну в сироватці крові прямо корелював з ІМТ та індексом ожиріння ($r= 0,59-0,60$, $p < 0,01$) у щурів з НАЖХП та ГГЦ.

Як відомо, підвищення маси вісцерального жиру тісно пов'язано з розвитком інсулінорезис-

Таблиця 1

Рівень гомоцистеїну в сироватці крові та масо-ростові параметри у щурів за високожирової дієти та її поєднання з тіолактоновою ГГЦ (M±m)

Показники	Група 1 (контроль), n=14	Група 2 (ГГЦ), n=14	Група 3 (ВЖД), n=14	Група 4 (ВЖД+ГГЦ), n=14
Гомоцистеїн, мкмоль/л	5,37±0,17	10,1±0,32 *	7,42±0,34 *#	11,5±0,29 *#§
Початкова маса тіла, г	255,6±4,67	264,2±4,09	253,9±5,98	251,0±4,71
Кінцева маса тіла, г	341,1±6,85	357,5±6,18	382,8±8,98 *#	413,9±11,2*#§
Приріст маси тіла, г/добу	1,43±0,07	1,55±0,09	2,15±0,12 *#	2,71±0,14 * #§
ІМТ, г/см^2	0,67±0,01	0,69±0,01	0,79±0,02 *#	0,86±0,02 *#§
Сумарна маса жиру, г	8,64±0,17	9,41±0,35	11,8±0,44 * #	15,1±0,54 *#§
Індекс ожиріння, (г жиру / 100 г маси тіла)	2,54±0,05	2,63±0,07	3,08±0,05 *#	3,65±0,26 *#§
Відносна маса печінки, %	2,77±0,05	3,10±0,08 *	3,13±0,10 *	3,35±0,06 *#§
Відносна маса селезінки, %	0,27±0,01	0,29±0,01	0,26±0,01	0,31±0,01 *§
П/С	3,02±0,07	3,08±0,08	3,11±0,47	2,67±0,09 *#§

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

Таблиця 2

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

Показники	Група 1 (контроль), n=14	Група 2 (ГГЦ), n=14	Група 3 (ВЖД), n=14	Група 4 (ВЖД+ГГЦ), n=14
Показники сироватки крові				
АЛТ, Од/л	51,4±2,67	60,4±3,39 *	62,8±3,40 *	92,5± 8,52 *#§
ГГТ, мккат/л	1,38±0,11	2,06±0,10 *	2,25±0,11 *	3,06±0,11*#§
Альбумін, г/л	41,4±0,75	39,8±0,69	40,1±0,69	37,3±0,45 *#§
Сечовина, ммоль/л	5,09±0,21	5,16±0,19	5,12±0,20	5,24±0,19
Білірубін, мкмоль/л	8,34±0,32	9,01±0,14	8,98±0,25	9,02±0,37
ЗХС, ммоль/л	1,28±0,06	1,61±0,05 *	1,44±0,04 *#	1,97±0,09 *#§
ТГ, ммоль/л	0,59±0,07	0,62±0,04	0,81±0,07 *#	1,07±0,07 *#§
ХС ЛПВЩ, ммоль/л	0,70±0,03	0,63±0,04	0,69±0,05	0,56±0,04 *
ХС ЛПНЩ, ммоль/л	0,31±0,06	0,70±0,07 *	0,39±0,05 #	0,92±0,11 *§
ХС ЛПДНЩ, ммоль/л	0,27±0,03	0,28±0,02	0,37±0,03 *#	0,48±0,03 *#§
Індекс атерогенності	0,86±0,12	1,70±0,20*	1,21±0,17	2,71±0,30 *#§
Показники печінки				
ТГ, мкмоль/ г тканини	19,2±0,96	28,3±1,54 *	33,5±1,70 *#	56,7±2,25 *#§
ЗХС, мкмоль/ г тканини	6,90±0,20	8,91±0,30 *	8,53±0,29 *	10,4±0,35 *#§
Фосфоліпіди, мкмоль/ г тканини	25,6±1,06	20,7±1,37 *	23,8±1,12	18,9±0,88 *§
Гідроксипролін, мкмоль / г тканини	2,85±0,10	3,74±0,12 *	3,50±0,10 *	4,56±0,16 *§

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

тентності [27]. Очевидно, введення тіолактону гомоцистеїну на тлі аліментарного перевантаження організму тварин жирами може порушувати інсуліновий сигналінг та викликати інсулінорезистеність. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури щодо здатності високих рівнів гомоцистеїну індукувати інсулінорезистентність та спричиняти компенсаторну гіперінсулінемію [12, 22]. У свою чергу, гіперінсулінемія викликає інгібування активності ензимів шляхів реметилування та транссульфурування гомоцистеїну (метилентетрагідрофолатредуктази та цистатіонін-β-синтази), що веде до накопичення гомоцистеїну в плазмі крові [12, 22]. Нещодавно показано, що в еуглікемічних пацієнтів із НАЖХП рівень гомоцистеїну прямо корелював з індексом інсулінорезистентності та ІМТ [16].

Аналіз показників абсолютної та відносної маси печінки та селезінки у щурів засвідчив міжгрупові відмінності. У щурів груп 2 та 3 реєстру-

валасядостовірно вища (на 11,9 % та 13,0 %) відносна маси печінки, але не спостерігалося суттєвих змін маси селезінки та відношення П/С. У той же час, при поєднанні ГГЦ із ВЖД спостерігалося більш суттєвий приріст маси органів: у щурів групи 4 відносна маса печінки була вищою на 20,9; 8,06 % та 7,03 %, ніж у щурів групи 1, 2 та 3 відповідно. Також, у щурів групи 4 реєструвалася більш висока відносна маса селезінки, тому відношення П/С було вірогідно нижчим (на 11,6; 13,3 % та 14,1 %), ніж у групах 1, 2 та 3 відповідно.

Як відомо, НАЖХП характеризується гепатомегалією, що пов'язано з ектопічною акумуляцією жиру в гепатоцитах, активацією фіброгенезу та накопиченням макромолекул сполучної тканини [3, 6, 19]. Показано, що 3-місячне застосування ВЖД викликало вірогідне підвищення об'єму селезінки у щурів [8]. Спленомегалія була зумовлена синусоїдальною дилатацією та внутрішньоклітинними депозитами, які включали скупчення ліпідів, гемосидерину та лейкоцитарні агрегати [8]. Збільшення розмірів селезінки при НАЖХП може свідчити про трансформацію стеатозу в стеатогепатит [6, 28]. Отже, при поєднанні ВЖД та ГГЦ прискорювалося формування гепато- та спленомегалії у щурів.

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. 2). Так, активність АЛТ та ГГТ у сироватці крові у щурів груп 2 та 3 була вищою на 17,5 % та 49,3 %, а у щурів групи 3 – на 22,2 % та 63,0 % вищою, ніж у щурів групи 1. У щурів групи 4 активність АЛТ у 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. Отже, НАЖХП, поєднана з ГГЦ, характеризується більшою виразністю цитолізу та зниженням протеїнсинтезуючої функції печінки порівняно з НАЖХП. Між рівнем гомоцистеїну та маркерами некрозапальних змін у гепатоцитах (активністю АЛТ та ГГТ у сироватці крові) виявлявся прямий кореляційний зв'язок ($r = 0,55; 0,68, p<0,01$).

Існують дані, що хронічне навантаження щурів метіоніном викликало підвищення рівня АЛТ, АСТ та лужної фосфатази в сироватці крові [26]. Однак у щурів із моделлю етанолового ушкодження печінки метіонін-індукована ГГЦ асоціювалася зі зниженням активності АЛТ [18]. Зауважимо, що у пацієнтів із НАЖХП підвищення рівня гомоцистеїну зазвичай пов'язано з підвищенням рівня АЛТ та ГГТ у крові [16].

Застосування ВЖД у поєднанні з ГГЦ викликало формування більш тяжкої проатерогенної дисліпідемії, ніж окреме застосування ВЖД. Так, у сироватці крові щурів групи 2 реєструвався більш високий рівень ЗХС та ХС ЛПНЩ (на 25,8 % та 125,8 %) порівняно з шурами групи 1, у той час як інші ліпідні фракції суттєво не змінювались. У щурів групи 3 реєструвалося 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. У той же час, у щурів групи 4 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 1. Зауважимо, що гіперхолестеролемія та гіпертриацилгліцеролемія у щурів групи 4 були достовірно вищими, ніж у щурів групи 2 (на 22,4 % та 72,5 %) та групи 3 (на 36,8 % та 32,1 %) відповідно. Індекс атерогенності у щурів групи 4 достовірно перевищував такий (на 215,1; 59,4 % та 123,4 %) у щурів у групах 1, 2 та 3. Рівень гомоцистеїну достовірно корелював із маркерами дисліпідемії: прямий зв'язок виявлявся з рівнем ЗХС, ТГ, ХС ЛПНЩ ($r = 0,55; 0,48; 0,51, p<0,05$) і обернений – із рівнем ХС ЛПВЩ ($r=-0,50, p<0,05$) у сироватці крові. Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших досліджень. Показано, що введення гомоцистеїну або метіоніну викликало підвищення сироваткового рівня ЗХС та ТГ у щурів [18]. За іншими даними, 24-тижневе застосування ВЖД викликало у щурів підвищення базального рівня гомоцистеїну, ЗХС та ХС ЛПНЩ [10]. Отже, ГГЦ та ВЖД справляють адитивний ефект на формування проатерогенної дисліпідемії.

Дослідження фракцій ліпідів у печінці засвідчило, що застосування ВЖД забезпечує розвиток стеатозу печінки, введення тіолактону гомоцистеїну також справляє помірну ліпогенну дію, однак при поєднанні вказаних чинників стеатогенний ефект істотно потенціюється. Так, у щурів групи 2 у печінці виявлявся підвищений вміст ТГ та ЗХС (на 47,4 % та 29,1 %), знижений вміст фосфоліпідів (на 19,1 %) порівняно з групою 1. У щурів групи 3 спостерігалося більш суттєве підвищення вмісту ТГ (на 74,5 %) та помірне підвищення вмісту ЗХС (на 23,6 %), але вміст фосфоліпідів суттєво не змінився. Водночас, у щурів групи 4 реєструвалося підвищення вмісту ТГ та ЗХС (на 195,3 %, та 50,7 %) та зниження вмісту фосфоліпідів (на 26,2 %) порівняно з контролем. Крім того, у щурів групи 4 вміст ТГ та ЗХС у печінці був достовірно вищим (на 69,3 % та 12,2 %), а вміст фосфоліпідів – достовірно нижчим (на 20,6 %), ніж у щурів групи 3. Рівень гомоцистеїну в крові прямо корелював з вмістом ЗХС та ТГ ($r = 0,61; 0,63, p<0,01$) та обернено – з вмістом фосфоліпідів ($r = - 0,46, p<0,05$) у печінці.

Посилення стеатогенного ефекту при поєднанні ГГЦ із ВЖД може реалізуватися через різні молекулярні механізми. Встановлено, що в культурі гепатоцитів людини ГГЦ індукує ЕПР-стрес, викликає дизрегуляцію синтезу ендогенних стеролів, активує SREBPs та посилює експресію

генів, відповідальних за біосинтез ХС та ТГ [29]. Дизрегуляція експресії генів ліпідного обміну реєструвалась у мишей із дефіцитом цистатіон-β-синтази [15]. За експериментальної ГГЦ у печінці пригнічується активність метилтранферазних реакцій та порушується синтез фосфоліпідів [5, 17], що може погіршувати елімінацію ТГ та ХС із гепатоцитів.

Встановлено, що за умов ГГЦ, ВЖД та, особливо, за їх поєднання реєструвалося достовірне підвищення вмісту гідроксипроліну в печінці (на 31,2; 22,8 % та 60,0 %) порівняно з контролем. При цьому вміст гідроксипроліну у щурів групи 4 достовірно перевищував такий на 21,9 % та 30,3 % у щурів груп 2 та 3 відповідно. Між рівнем гомоцистеїну в сироватці крові та рівнем гідроксипроліну в печінці виявлявся прямий кореляційний зв'язок ($r = 0,74$, $p<0,01$). Існують дані, що окреме застосування ВЖД не викликає формування фіброзу печінки у тварин, у той час як за її поєднання з іншим чинниками (дефіцитом холіну або метіоніну) підвищується акумуляція гідроксипроліну у печінці та прискорюється розвиток стеатогепатиту [21]. Засвідчено суттєве підвищення рівня гідроксипроліну в печінці мишей за умов ГГЦ, зумовленої дефіцитом цистатіонін-β-синтази [21].

Отже, при поєднанні ВЖД із тіолактоновою ГГЦ посилюється акумуляція внутрішнього жиру, підвищується індекс ожиріння, відбувається акселерація печінкового стеатогенезу та фіброгенезу. Перспективним напрямком подальших досліджень є розробка підходів до патогенетичної корекції НАЖХП, асоційованої з ГГЦ.

Висновки

1. За умов тіолактонової гіпергомоцистеїнемії істотно посилюється стеатогенний ефект високожирової дієти: підвищується (на 9,0-18,5 %) приріст індексу маси тіла, маси вісцерального жиру, індексу ожиріння, акселерується розвиток гепато- та спленомегалії.

2. Неалкогольна жирова хвороба печінки, асоційована з гіпергомоцистеїнемією, характеризується більш виразними (в 1,36-2,23 раза) порушеннями функціонального стану печінки (зростанням **а**ланінамінотрансферази – на 47,3 %, гаммаглутамілтрансферази – на 36 %, зниженням вмісту альбуміну в сироватці крові), більш тяжкою проатерогенногою дисліпідемією, більш значною акумуляцією триацилгліцеролів (на 32 %), холестеролу (на 21,9 %), зниженням вмісту фосфоліпідів (на 20,6 %), підвищенням рівня гідроксипроліну (на 30,3 %) в печінці.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним напрямком подальших досліджень може бути вивчення впливу препаратів з гіполіпідемічною дією на біохімічні показники стеатозу та фіброзу у щурів із неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованої із гіпергомоцистеїнемією.

Література

1. Бабак О.Я. Неалкогольный стеатоз печени – "аккорд" метаболических нарушений / О.Я. Бабак, Е.В. Колесникова, К.Ю. Дубров // Укр. терапевт. ж. – 2011. – № 1. – С. 5-11.
2. Звягинцева Т.Д. Неалкогольный стеатогепатит и методы патогенетической коррекции / Т.Д. Звягинцева, С.В. Глущенко // Міжнар. мед. ж. – 2014. – Т. 20, № 2 (78). – С. 29-32.
3. Михальчук Л.М. Неалкогольна жирова хвороба печінки / Л.М. Михальчук, А.С. Єфімов // Междунар. эндокринол. ж. – 2010 – № 2 (26). – С. 71-82.
4. Некрут Д.О. Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування неалкогольної жирової хвороби печінки у щурів / Д.О. Некрут // Вісн. морфол. – 2016. – Т. 22, № 1. – С. 40-45.
5. Пентюк Н.О. Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування CCl4-індукованого фіброзу печінки у щурів / Н.О. Пентюк // Сучас. гастроентерол. – 2009. – № 5 (49). – С. 33-37.
6. Просоленко П.О. Аналіз ультрасонографічних особливостей варіантів неалкогольної жирової хвороби печінки на тлі метаболічного синдрому / П.О. Просоленко, О.В. Колеснікова // Сучас. гастроентерол. – 2008. – № 5 (43). – С. 61-65.
7. Пентюк А.А. Определение фосфолипидов по образованию гидрофобного комплекса с феротиоцианатом аммония / А.А. Пентюк, В.И. Гуцол, О.А. Яковлева // Лаб. дело. – 1987. – № 6. – С. 457-459.
8. Altunkaynak B.Z. A stereological and histological analysis of spleen on obese female rats, fed with high fat diet / B.Z. Altunkaynak, E. Ozbek, M.E. Altunkaynak // Saudi Med. J. – 2007. – Vol. 28, № 3. – P. 353-357.
9. Impact of Anthocleista vogelii root bark ethanolic extract on weight reduction in high carbohydrate diet induced obesity in male wistar rats / G.O. Anyanwu, E.C. Onyeneke, U. Usunobun [et al.] // Afr. J. Biochem. Res. – 2013. – Vol. 7, № 11. – P. 225-232.
10. The effects of berberine on hyperhomocysteinemia and hyperlipidemia in rats fed with a long-term high-fat diet [Електронний ресурс] / X.X. Chang, H.M. Yan, G. Xu [et al.] // Lipids Health Dis. – 2012. – Режим доступу до ресурсу: https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-86.
11. Association of homocysteine level with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis / Y. Dai, J. Zhu, D. Meng [et al.] // J. Clin. Biochem. Nutr. – 2016. – Vol. 58, № 1. – P. 76-83.
12. Dicker-Brown A. The effect of glucose and insulin on the activity of enzymes in homocysteine metabolism (Abstract) / A. Dicker-Brown, V.A. Fonseca, L.M. Fink // Diabetes. – 1999. – Vol.48, Supp l. – P.135.
13. Dyson J. K. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to diagnosis and staging / J.K. Dyson, Q.M. Anstee, S. McPherson // Frontline Gastroenterol. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 211-218.
14. Fan J. G. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: Asian definitions and Asian studies / J.G. Fan, Y.D. Peng // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. – 2007. – Vol. 6, № 6. – P. 572-578.
15. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice / J. Hamelet, K. Demuth, J.L. Paul [et al.] // J. Hepatol. – 2007. – Vol. 46, № 1. – P. 151-159.
16. Clinical Study of Serum Homocysteine and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Euglycemic Patients / Y. Hu, J. Liu, X. Dong [et al.] // Med. Sci. Monit. – 2016. – № 22. – P. 4146-4151.
17. 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 / K. Ikeda, A. Kubo,

N. Akahoshi [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. – 2011. – Vol. 400, № 7. – P. 1853-1863.
18. Effect of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease with metabolic syndrome: A propensity score-matched cohort study / G.H. Kim, J.W. Chung, J.H. Lee [et al.] // Clin. Mol. Hepatol. – 2015. – Vol. 21, № 4. – P. 379-386.
19. Kucera O. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats / O. Kucera, Z. Cervinkova // World. J. Gastroenterol. – 2014. – Vol. 20, № 26. – P. 8364-8376.
20. Law K. Nonalcoholic fatty liver disease / K. Law, E.M. Brunt // Clin. Liver. Dis. – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 591-604.
21. Cystathionine beta-synthase null homocystinuric mice fail to exhibit altered hemostasis or lowering of plasma homocysteine in response to betaine treatment / K.N. Maclean, J. Sikora, V. Kožich [et al.] // Mol. Genet Metab. – 2010. – Vol. 101, № 2-3. – P. 163-171.
22. McCarty M. F. Increased homocysteine associated with smoking, chronic inflammation, and aging may reflect acute-phase induction of pyridoxal phosphatase activity / M.F. McCarty // Med. Hypotheses. – 2000. – Vol. 55, № 4. – P. 289-293.
23. Monjur A. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015 / A. Monjur // World. J. Hepatol. – 2015. – Vol. 7, № 11. – P. 1450-1459.
24. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver / K. Robert, J. Nehme, E. Bourdon [et al.] // Gastroenterology. – 2005. – Vol. 128, № 5. – P. 1405-1415.
25. Siddiqi N. J. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble- and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues / N.J. Siddiqi, A.S. Alhomida // J. Biochem. Mol. Biol. – 2003. – Vol. 36, № 2. – P. 154-158.
26. Hypermethioninemia provokes oxidative damage and histological changes in liver of rats / F.M. Stefanello, C. Matte, C.D. Pederzolli [et al.] // Biochimie. – 2009. – Vol. 91, № 8. – P. 961-968.
27. Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: lessons from type 2 diabetic liver / T. Takamura, H. Misu, T. Ota, S. Kaneko // Endocr. J. – 2012. – Vol. 59, № 9. – P. 745-763.
28. Tsushima Y. Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver: correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen / Y. Tsushima, K. Endo // Dig. Dis. Sci. – 2000. – Vol. 45, № 1. – P. 196-200.
29. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways / G.H. Werstuck, S.R. Lentz, S. Dayal [et al.] // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 107, № 10. – P. 1263-1273.

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАНИЯ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ И ТИОЛАКТОНОВОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА МАССО-РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ СОСТОЯНИЯ ПЕЧЕНИ У КРЫС

Д.А. Некрут, Н.В. Заичко

Резюме. Исследовано влияние сочетания высокожировой диеты (ВЖД) и тиолактоновой гипергомоцистеинемии на массо-ростовые параметры и биохимические маркеры состояния печени у крыс. Показано, что при применении ВЖД (54 % ккал за счет жиров) в сочетании с введением тиолактона гомоцистеина (100 мг/кг в/жел) в течение 60 суток у крыс регистрируется более значительное повышение сывороточного уровня гомоцистеина (на 55,0 %), увеличение индекса массы тела (ИМТ) (на 8,9 %), суммарной массы жира (на 39,8 %) и индекса ожирения (на 18,5 %), более существенно нарушается функциональное состояние печени и ускоряются процессы печеночного стеатогенеза и фиброгенеза, чем в условиях отдельного применения ВЖД.

Ключевые слова: гомоцистеин, высокожировая диета, стеатоз, фиброз, неалкогольная жировая болезнь печени.

EFFECT OF A COMBINED HIGH-FATTY DIET AND THIOLACTONE HYPERHOMOCYSTEINEMIA ON MASS, GROWTH AND ON BIOCHEMICAL MARKERS OF THE LIVER IN RATS

D.O. Nekrut, N.V. Zaichko

Abstract. The impact of high fat diet (HFD) and thiolactone hyperhomocysteinemia combination on mass-growth parameters and biochemical markers of liver state in rats has been studied. It was proved that using HFD (54 % of kilocalories from fat) combined with the administration of homocysteine thiolactone (100 mg/kg intragastrically) for 60 days in rats lead to a significant increase of homocysteine concentration in the serum (by 55,0 %), BMI increase (by 8,9 %), total fat weight (by 39,8 %) and obesity index (by 18,5 %). In addition, the functional state of the liver was disturbed significantly and the processes of hepatic steatogenesis and fibrogenesis were accelerated, in comparison with single HFD use.

Key words: homocysteine, high-fat diet, steatosis, fibrosis, nonalcoholic fatty liver disease.

Pirogov National Medical University (Vinnytsia)

Рецензент – доц. Н.П. Григор'єва

Buk. Med. Herald. – 2017. – Vol. 21, № 2 (82), part 1. – P. 36-41

Надійшла до редакції 25.03.2017 року

© Д.О. Некрут, Н.В. Заічко, 2017