

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ імені О.В. ПАЛЛАДИНА**

**Онопченко Олександра Вікторівна**

УДК 577.115.3.[616.39-056.257]-092.9

**НОРМАЛІЗАЦІЯ ЛІПІДНОГО ПРОФІЛЮ ТА ВІДНОВЛЕННЯ  
ЧУТЛИВОСТІ ДО ІНСУЛІНУ У ТКАНИНАХ  
ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНИХ ЩУРІВ ЗА ДІЇ  
N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ**

03.00.04 — біохімія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ — 2015

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі біохімії ліпідів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН та НАМН України  
**Гула Надія Максимівна,**  
завідувач відділу біохімії ліпідів  
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор,  
член-кореспондент НАМН України  
**Губський Юрій Іванович,**  
завідувач відділу біохімічної фармакології  
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

доктор біологічних наук,  
**Калинська Людмила Миколаївна,**  
головний науковий співробітник  
лабораторії гормональної регуляції обміну речовин  
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Захист відбудеться «23» листопада 2015 р. о 14<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ (01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ за адресою 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано «2» жовтня 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук



Н.П. Карлова

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Сьогодні, завдяки стрімкому зростанню кількості людей з надлишковою вагою, ожиріння отримало статус пандемічного захворювання сучасного суспільства. Все частіше дане захворювання вражає молодше покоління людей, що, в першу чергу, обумовлено гіподинамією та зростанням продуктів швидкого харчування з високим вмістом насичених жирів в раціоні. У багатьох випадках ожиріння спричиняє розвиток найбільш поширених захворювань з високим відсотком смертності, а саме, цукрового діабету, ішемічної хвороби серця та раку. Згідно даних світової статистики понад півмільярда людей страждають на ожиріння, 44% з яких складають хворі на діабет [WHO Fact sheet №311., 2014]. Близько 90% від загальної кількості випадків діабету припадає саме на цукровий діабет 2 типу, в основі патогенезу якого є розвиток інсулінорезистентності.

Серед основних патогенетичних чинників пов'язаних з розвитком метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу виділяють ожиріння. З даних літератури відомо, що споживання надлишкової кількості жиру призводить до гіпертрофії, гіпоксії вісцеральної жирової тканини та зростанню загального пулу вільних жирних кислот. Посилення надходження останніх до інсулінозалежних тканин спричиняє виникнення дисліпідемії, розвиток оксидативного стресу, інсулінорезистентності та гіперінсулінемії [Pereira-Lancha L. O. et al., 2012].

Показано, що за ожиріння саме дисліпідемія лежить в основі патогенезу інсулінорезистентності та пов'язаних з нею ускладнень [Saltiel A. R. and Kahn C. R., 2001]. Відомо, що функціональна активність трансмембранних протеїнів безпосередньо залежить від ліпідного мікрооточення плазматичних мембран, основу яких складають фосфоліпіди, жирні кислоти (ЖК) та холестерол. Тому дисбаланс ліпідного складу клітин за жирового навантаження впливає на фізико-хімічні властивості плазматичних мембран та, як наслідок, ензиматичну активність трансмембранних протеїнів, зокрема і рецептора до інсуліну [Zeghari N. et al., 2000]. Встановлено, що жирове навантаження ініціює активацію утворення активних форм кисню (АФК) та, як наслідок, активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів [Dandona P. et al., 2010]. Крім того, надлишок насичених ЖК спричиняє зростання продукції прозапальних цитокінів, активацію Toll-like рецепторів та інтенсифікацію оксигеназного шляху метаболізму полієнових ЖК, що викликає розвиток хронічного запалення [Teng K. T. et al., 2014].

Тому пошук нових біологічно активних сполук природнього походження, здатних нормалізувати ліпідний обмін за умов розвитку аліментарного ожиріння та діабету 2 типу, стоїть на пріоритетній позиції сучасної медицини.

Серед претендентів на такі сполуки виділяють мінорні сигнальні ліпіди N-ацилетаноламіни (NAE), які проявляють широкий спектр біологічних ефектів у регуляції енергетичного обміну [Matias I. et al., 2007]. Про механізми дії насичених NAE, зокрема, N-стеароїлетаноламіну (NSE), відомо мало, оскільки вони не зв'язуються з канабіноїдними рецепторами (CB1/2) та залишаються наразі найменш вивченими, порівняно із ненасиченими представниками. Проте відомо, що ненасичені NAE за ожиріння пригнічують дію інсуліну та в такий спосіб порушують транспорт глюкози в адипоцитах [D'Eon T. M. et al., 2008], тоді як насичені

представники (N-пальмітоїлетаноламін) сприяють активації  $\beta$ -окиснення ЖК [Mattace R.G. et al., 2014]. За дії NSE виявлено пригнічення активності стеароїл-КоА-десатурази (SCD-1), модуляція активності нейрональної NO-синтази та фосфоліпази A2, пригнічення продукції прозапальних цитокінів (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) [Terrazzino S. et al., 2004; Maccarrone M. et al., 2002; Zolese G. et al., 2003; Жуков О. Д. та ін., 2014], що може сприяти нормалізації ліпідного обміну клітин за індукованої ожирінням інсулінорезистентності.

Таким чином, відтворення інсулінорезистентності в експериментальній моделі та дослідження біологічної дії NSE, насамперед його впливу на ліпідний склад тканин, які залучені до метаболізму ліпідів (печінки та підшлункової залози), має важливе значення для подальшого розуміння ролі NSE у корекції ліпідного дисбалансу за патології та можливого використання NSE в якості лікарського засобу для фармакотерапії метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота проводилась в рамках наукової тематики відділу біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (проблема “Біохімія тварин та людини”): тема № 0109U001587 «Дослідження протекторної дії насичених N-ацилетаноламінів (NAE) при різних патологічних станах» (2009 – 2013 р.) та тема № 0114U003215 «Дослідження дії N-стеароїлетаноламіну за інсулінорезистентного стану та експериментальних когнітивних порушень у ссавців» (2014 р.).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – дослідити протекторну дію N-стеароїлетаноламіну на тканини печінки та підшлункової залози щурів за експериментальної інсулінорезистентності.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні **завдання**:

1. Відтворити на щурах модель інсулінорезистентності, яка б найбільш повно відображала природні процеси розвитку цукрового діабету 2 типу.

2. Оцінити вплив NSE на маркери розвитку інсулінорезистентності, а саме толерантність до глюкози, вміст інсуліну в плазмі крові, рівень глікозильованого гемоглобіну, величину індексу HOMA-IR у щурів з аліментарним ожирінням;

3. На моделі інсулінорезистентності, індукованої ожирінням, дослідити ефект NSE на ліпідний склад (вміст холестеролу, рівень індивідуальних фосфоліпідів та жирнокислотний склад різних ліпідних фракцій) печінки та підшлункової залози щурів. Вивчити вплив NSE на ліпідний профіль (відсотковий вміст вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, рівень загального холестеролу та його вмісту у складі ліпопротеїнових фракцій) плазми крові щурів за інсулінорезистентності;

4. Дослідити ефект NSE на стан про/антиоксидантної системи (вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів, активність основних ензимів антиоксидантного захисту) в печінці щурів за умов розвитку інсулінорезистентності.

**Об'єкт дослідження:** ліпідний профіль тканин за умов розвитку інсулінорезистентності, спричиненої аліментарним ожирінням.

**Предмет дослідження:** механізми регуляторного впливу NSE на ліпідний склад печінки та підшлункової залози щурів за експериментальної інсулінорезистентності.

**Методи дослідження:** експериментальна модель інсулінорезистентності на щурах, газорідина та тонкошарова хроматографія, імуноензимний аналіз, ензиматичні, колориметричні, спектрофотометричні, статистичні методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В представленій роботі розкрито роль представника насичених NAE – N-стеароїлетаноламіну (NSE) у біохімічних механізмах відновлення чутливості до інсуліну за умов розвитку інсулінорезистентності, індукованої аліментарним ожирінням. Встановлено, що компенсаторний вплив NSE на зміни ліпідного профілю печінки, підшлункової залози та плазми крові щурів за інсулінорезистентності супроводжується відновленням про/антиоксидантного балансу організму та покращенням чутливості до інсуліну.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані дані мають важливе значення для подальшого розуміння ролі NSE у корекції системної дисліпідемії та можливостей його застосування як лікарського засобу для фармакотерапії ускладнень пов'язаних з розвитком ожиріння та цукрового діабету 2 типу.

**Особистий внесок здобувача.** Головна ідея та завдання досліджень були сформульовані спільно з науковим керівником – членом-кореспондентом НАН та АМН України проф. Гулою Н.М та к.б.н. Косяковою Г. В. Автор самостійно проаналізовано літературні джерела за темою дисертації, інтерпретовано та графічно представлено отримані дані досліджень, проведено їх статистичну та кореляційну обробку. Створення експериментальної моделі інсулінорезистентності у щурів було проведено разом з к.б.н. Косяковою Г. В. Визначення вмісту ТБК-реагуючих продуктів та 2,4-динітрофенілгідразонів в печінці та плазмі крові щурів за інсулінорезистентності проведено за участю з к.б.н. Мегедь О.Ф. Визначення відсоткового вмісту ЖК та рівня холестеролу в тканинах та плазмі крові проведено разом з к.б.н. Клімашевським В. М. Визначення активностей супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази проведено разом з к.б.н. Горідько Т. М. Визначення активності каталази проведено за участю к.б.н. Бердишева А. Г. Самостійно проаналізовано отримані результати та сформульовано й обґрунтовано висновки, а також підготовлено до друку ряд публікацій. Всі розділи дисертації написано здобувачем особисто.

**Апробація результатів дослідження.** Результати досліджень, викладених в дисертації, представлено на таких наукових конференціях: XVIII Lipid Meeting (Лейпциг, Німеччина, 2013 р.); конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2013» (Київ, Україна, 2013 р.); конкурсі молодих учених на кращу наукову роботу Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (Київ, Україна, 2014 р.); FEBS EMBO 2014 Conference (Париж, Франція, 2014 р.); XI Український біохімічний конгрес (Київ, Україна, 2014 р.); 5<sup>th</sup> European Workshop on Lipid Mediators (Стамбул, Туреччина, 2014 р.); 83<sup>rd</sup> EAS Congress 2015 (Глазго, Великобританія, 2015р.); 40<sup>th</sup> FEBS Congress The biochemical Basis of Life (Берлін, Німеччина, 2015 р.).

Експериментальні результати неодноразово доповідались та обговорювались на наукових семінарах відділу біохімії ліпідів та засіданнях Вченої Ради Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2011 – 2014 pp.).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей (4 – у фахових виданнях України та 1 стаття у іноземному журналі), 8 тезисів. Статті опубліковані в журналах, що включені до міжнародних наукометричних баз SCOPUS, PubMed (5 статей) та Springer (1 стаття). Основні результати роботи доповідались та обговорювались на вітчизняних та міжнародних конференціях та з'їздах.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертація складається зі «Вступу», «Огляду літератури», розділів, в яких описані основні методи досліджень, експериментальні результати та їх обговорення, «Висновків» та «Переліку цитованої літератури» (232 найменування). Роботу викладено на 133 сторінках машинописного тексту (загальний обсяг дисертації), проілюстровано 17 рисунками, 8 таблицями та 3 додатками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### РОЗДІЛ 1. Огляд літератури

В цьому розділі відображена загальна характеристика N-ацилетаноламінів, представлена їх біологічна роль та основні механізми дії у регуляції вуглеводного та ліпідного обміну, наведено сучасні уявлення про біологічні ефекти N-стеароїлетаноламіну за різних патологічних станів. Розглянуто основні патогенетичні чинники, асоційовані з аліментарним ожирінням, у розвитку інсулінорезистентності та діабету 2 типу.

### РОЗДІЛ 2. Експериментальна частина

#### *Модель інсулінорезистентності*

Експериментальну модель відтворювали на безпородних щурах-самцях з початковою масою тіла 200-220 г. Протягом експерименту тварин утримували в стандартних клітках з вільним доступом до їжі та води у відповідності до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001р.).

Інсулінорезистентність у щурів індукували довготривалим навантаженням жирною дієтою (відсоток жиру в загальному раціоні складав 58%) протягом 6 місяців у комбінації з одноразовою ін'єкцією на 23 тиждень експерименту розчину стрептозоточину (Sigma, США) із розрахунку 15 мг/кг маси тіла, як описано у роботах [Svegliati-Baroni G. Et al., 2006; Zhang F. Et al., 2003]. Відсоток жиру збільшували додаванням свинячого вісцерального жиру до раціону щурів, де вміст насичених та мононенасичених ЖК був відповідно на 38% та 35% більше порівняно з цими показниками у складі гранульованого корму за рахунок зростання вмісту пальмітинової та стеаринової кислот. Вміст холестеролу в жирі складав 0,57 мг/г. Контрольні щури отримували стандартний гранульований корм, який містив 4% жирів від загального раціону.

Щомісяця фіксували масу тіла всіх тварин та визначали вміст глюкози в крові, використовуючи портативний глюкометр Optium Omega (виробництво Abbott diabetes care Ltd., Alameda, USA). Через 25 тижнів було проведено пероральний тест на толерантність до глюкози. Щурів з порушеною толерантністю (у яких рівень

глюкози через 150 хв після перорального введення глюкози залишався на високому рівні (>5 ммоль/л)) було відібрано та розділено на дві групи: «IP» (n=9) та «IP+NSE» (n=10). Контрольних щурів з нормальною толерантністю до глюкози (у яких рівень глюкози на 90 хв складав 5,1 ммоль/л, а через 150 хв знижувався до нормального рівня – 3,8 ммоль/л) було поділено на групи: «Контроль» (n=6-10) та «NSE» (n=6-7). Щурам «NSE» та «IP+NSE» щоденно протягом двох тижнів до завершення експерименту вводили per os водну суспензію NSE в дозі 50 мг/кг маси тіла.

Наприкінці експерименту (28 тижнів) щурів декапітували під нембуталовим наркозом (50 мг/кг маси тіла). Для біохімічних досліджень відбирали кров, печінку та підшлункову залозу тварин. Кров збирали у пробірки з 10 % водним розчином цитрату натрію. Плазму відділяли центрифугуванням протягом 20 хв при 450g та температурі 4 °C та відбирали у пластикові пробірки (типу Eppendorf). Плазму крові та органи одразу заморожували при -80°C.

### ***Матеріали та методи дослідження***

Вагову частину тканини гомогенізували у об'ємі 1:10 ізотонічного фізіологічного розчину та екстрагували ліпіди за методом Bligh і Dyer [Bligh E. G. and Dyer W. I., 1959]. Фосфоліпіди розділяли методом двовимірної тонкошарової хроматографії. У першому напрямку використовували систему для розділення : хлороформ (65) : метанол (30) : аміак (6) : бензол (10), та у другому напрямку – хлороформ (5) : метанол (1) : оцтова кислота (1) : вода (0,5) : ацетон (2) [Vaskovsky V. E. and Terekhova T. A., 1979; Svetashev V. I. and Vaskovsky V. E., 1972].

Метиллові естери ЖК з ліпідного екстракту одержували за модифікованим методом Ichihara і Fukubayashi [Ichihara K. and Fukubayashi Y., 2010]. Після розділення ліпідного екстракту шляхом тонкошарової хроматографії в системі розчинників гексан : діетиловий етер : льодяна оцтова кислота (85 : 15 : 1) окремі ліпідні фракції знімали та метилювали. Кількісний аналіз метилових естерів проводили за допомогою газорідинної хроматографії на хроматографі HRGC 5300 (Італія). Ідентифікацію ЖК проводили за допомогою стандартів фірм Sigma та Serva (Німеччина). Вміст індивідуальних ЖК виражали у процентах від загальної суми.

Зону вільного холестеролу переносили в підготовлені мікроколони, елюювали 3 мл діетилового етеру та залишали випаровуватись. Після випаровування розчинника сухий залишок холестеролу хроматографували на газорідинному хроматографі на скляних колонках (0,5 м) з носієм 1,5% OV-1 на Chimalite W (80 — 100 меш) при температурі 250 °C. Вміст холестеролу у кожному зразку розраховували за різницею отриманих піків проб та піку стандарту холестеролу.

Зону естерів холестеролу переносили в ампулу та метилювали. Після чого суміш екстрагували гексаном. Гексанову фракцію наносили на хроматографічну пластинку та проводили хроматографію в бензолі. Зону холестеролу знімали та переносили в мікроколони. Наступні маніпуляції та кількісний аналіз вмісту холестеролу проводили, як описано вище.

Вміст інсуліну у плазмі крові щурів визначали з використанням набору реактивів для твердофазного імуноензимного аналізу (ELISA) фірми DRG, Німеччина. Для визначення вмісту цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-6 та IL-1 $\beta$  в сироватці крові

щурів використовували набір Platinum ELISA фірми eBioscience, США. Вимірювання проводили на планшетному аналізаторі STAT FAX 2100.

Вміст триацилгліцеролів, вільного та естерифікованого холестеролу визначали у плазмі крові ензиматичним методом з використанням стандартних наборів «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна).

Дослідження вмісту ліпопротеїнів низької (ЛПНЩ) та високої (ЛПВЩ) щільності проводили з використанням наборів «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна). Рівень холестеролу у ліпопротеїнах проміжної (ЛППЩ) та дуже низької (ЛПДНЩ) щільності визначали за різницею рівня загального холестеролу та у складі ЛПНЩ, ЛПВЩ.

Вміст загальних фосфоліпідів оцінювали за кількістю неорганічного фосфору у ліпідних екстрактах, який визначали методом Васьковського і Костецького [Vaskovsky V. E. et al., 1975]. Вміст індивідуальних фосфоліпідів в ліпідному екстракті розраховували за кількістю неорганічного фосфору в ліпідних плямах після проведення двовимірної тонкошарової хроматографії та ідентифікації з сірчаною кислотою в етанолі.

Вміст глікозильованого гемоглобіну в гемолізаті крові щурів оцінювали за визначенням концентрації 1-дезоксиглюкози з використанням стандартного набору («Реагент», Дніпропетровськ). Визначення кількості загального гемоглобіну проводили ціанідним методом з використанням стандартного набору («Філісіт-Діагностика», Дніпропетровськ).

Вміст нітрит-аніону визначали спектрофотометрично за реакцію Гріса, метод Грін [Green L. C. et al., 1982] у модифікації [Коцюруба А. В. та ін., 2000].

Визначення інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) проводили за накопиченням кінцевих продуктів ПОЛ, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реагуючі продукти) [Владимиров Ю. А. и Арчаков А. И., 1972; Мельничук С. Д. и др., 1998].

Інтенсивність процесів окисної модифікації протеїнів в печінці оцінювали за вмістом 2,4-динітрофенілгідразонів (2,4-ДНФГ) [Oliver C. N. et al., 1987; Дубинина Е. Е. и др., 1995].

Вміст протеїну визначали за методом Бредфорд [Bradford M. M., 1976].

Активність каталази [КФ 1.11.1.6] в гомогенатах печінки щурів визначали за швидкістю розпаду пероксиду водню за методом Королюк [Королюк М. Л. и др., 1988], сумарну активність супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] – за ступенем зниження відновлення нітросинього тетразолію у присутності NADH та феназинметасульфату [Чевари С. и др., 1991], активність глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.1.9] – за накопиченням у середовищі інкубації окисленого глутатіону [Переслегина И. А., 1989].

Оцінку рівня резистентності до інсуліну проводили за допомогою обчислення індексу НОМА-IR (The Homeostasis Model Assessment) – співвідношення добутку отриманих концентрацій глюкози та інсуліну до добутку їх показників у нормі (22,5) [Hosker J. P. et al., 1985]. Отримані значення виражали в умовних одиницях.

Для оцінки активності десатураз використовували розрахунковий індекс за співвідношенням відсотків вмісту індивідуальних ЖК: ліноленової/лінолевої ( $\Delta 6$ -



десатураза), арахідонової/ліноленої та арахідонової/ейкозотриєнової ( $\Delta 5$ -десатураза), олеїнової/стеаринової ( $\Delta 9$ -десатураза) [Cedernaes J. et al., 2013; McLauren Dorrance A. et al., 2000].

Експериментальні дані було оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Ст'юдента.

### РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення

#### *Вплив N-стеароїлетаноламіну на показники розвитку інсулінорезистентності, викликаній аліментарним ожирінням.*

В клінічній практиці для підтвердження наявності інсулінорезистентності (IP) використовують стандартні маркери: тест на толерантність до глюкози, вміст глікозильованого гемоглобіну, рівень інсуліну та значення гомеостатичного індексу НОМА-IR.

Результати тесту толерантності до глюкози (рис. 1, а) показали, що у тварин, які отримували жирову дієту, після перорального введення їм розчину глюкози, рівень глюкози в крові залишався на високому рівні довше, ніж в крові контрольних тварин. Отримані результати вказують на зниження толерантності до глюкози у цієї групи щурів, що свідчить про порушення надходження глюкози до клітин та розвиток резистентності до інсуліну. Введення NSE тваринам з порушеною толерантністю до глюкози сприяло її відновленню (рис. 1, а).

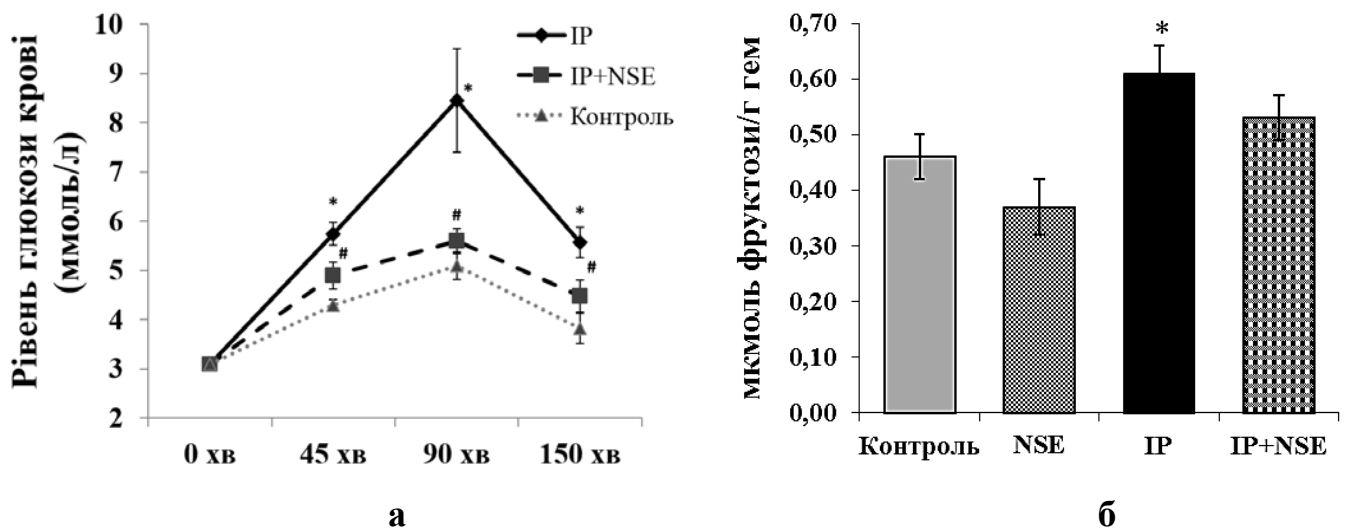


Рис. 1. Толерантність до глюкози у щурів (а) та вміст глікозильованого гемоглобіну у крові щурів (б),  $n = (6-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

З даних, представлених на рис. 1 (б), видно, що у тварин, які споживали надмірну кількість жиру, зростає вміст глікозильованого гемоглобіну, що свідчить про розвиток IP, та, як наслідок, прогресування гіперглікемії. Введення NSE не спричиняє істотних змін цього показника в крові тварин (рис. 1, б). Відомо, що за фізіологічних умов середня тривалість життя еритроцитів складає близько 100-120

діб, тому введення NSE протягом двох тижнів до завершення експерименту не впливає на рівень глікозильованого гемоглобіну.

Оцінка вмісту інсуліну в плазмі крові щурів показала, що за жирового навантаження рівень інсуліну вірогідно зростає майже в 3 рази, порівняно з показниками у щурів, яких утримували на стандартному раціоні (рис. 2, а), що є наслідком розвитку компенсаторної гіперінсулінемії за умов жирового навантаження. Введення NSE сприяло вірогідному зменшенню рівня інсуліну в плазмі крові щурів з розвинутою ІР (рис. 2, а).

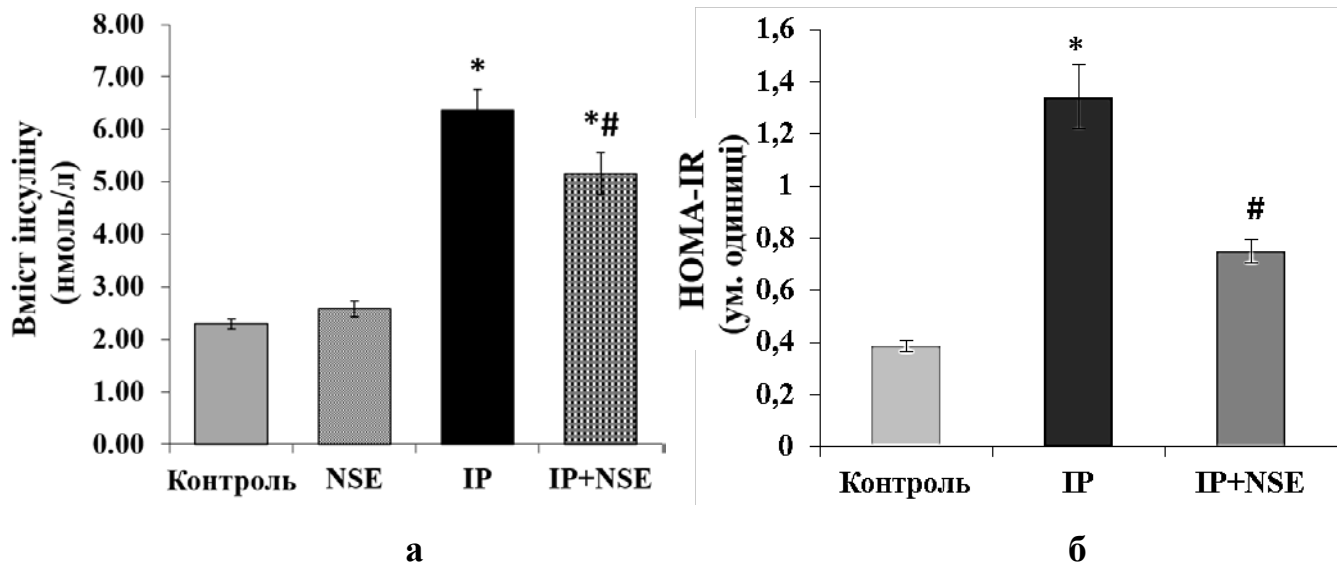


Рис. 2. Вміст інсуліну в плазмі крові (а) та значення індексу HOMA-IR (б) у щурів,  $n = (4-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «ІР».

Відомо, що однією із причин зниження вмісту інсуліну є поліпшення чутливості до нього інсулінозалежних тканин. З метою оцінки ступеня резистентності до інсуліну застосовують обчислення індексу HOMA-IR. В наших дослідженнях було виявлено його вірогідне збільшення більше ніж в три рази у групі IP, порівняно із значеннями у контрольних тварин (рис. 2, б). В групі щурів, яким вводили NSE, значення індексу HOMA-IR були значно нижчими (на 56%) у порівнянні з IP щурами, що вказує на зниження рівня резистентності до інсуліну у тварин за дії NSE.

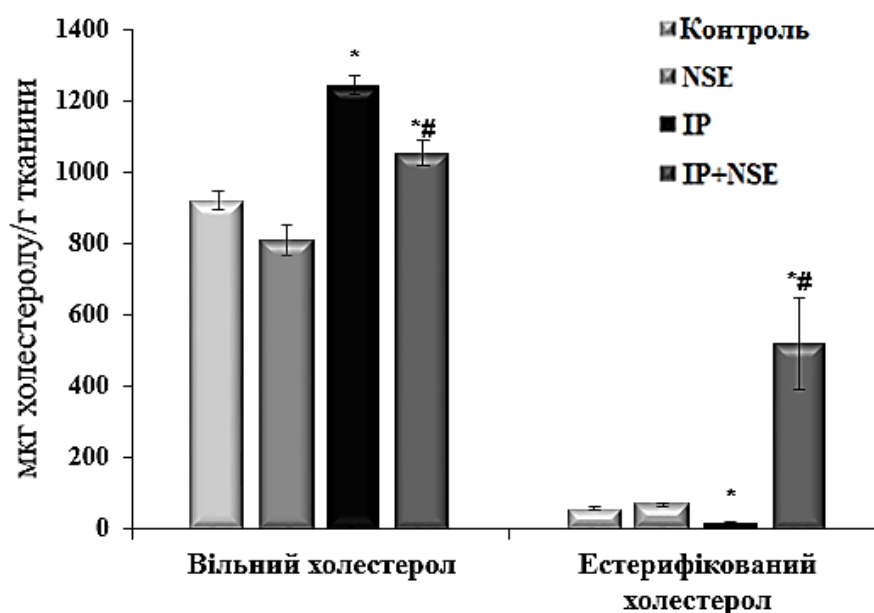
Таким чином, введення NSE щурам з індукованою ожирінням IP сприяє відновленню толерантності до глюкози, зниженню значення індексу HOMA-IR та вмісту інсуліну в плазмі крові, що свідчить про покращення чутливості тканин до інсуліну за дії NSE.

**Біологічна дія N-стеароїлетаноламіну на ліпідний профіль плазми крові, печінки та підшлункової залози щурів з інсулінорезистентністю, викликаною аліментарним ожирінням.**

Дисбаланс ліпідного складу інсулінозалежних тканин за ожиріння призводить до істотних метаболічних змін, зокрема, порушує мембранну плинність, проникність та, як наслідок, активність ензимів, що залучені до інсулінового сигналіngu. Беручи до уваги, що введення NSE інсулінорезистентним щурам призводило до покращення чутливості тканин до інсуліну, наступним етапом роботи було проведення оцінки впливу NSE на ліпідний склад тканин щурів, які залучені до метаболізму ліпідів (печінки та підшлункової залози).

Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад печінки щурів за інсулінорезистентності.

Визначення вмісту холестеролу у печінці щурів за індукованої ожирінням IP, показало значне зростання рівня вільного холестеролу та зниження вмісту його естерифікованої форми (рис. 3), що свідчить про підвищення вмісту холестеролу у складі мембран та можливостей змін жорсткості останніх. Введення NSE сприяє зниженню вмісту вільного холестеролу, водночас збільшуючи рівень його естерів в печінці щурів з IP (рис. 3).



*Рис. 3. Вміст вільного та естерифікованого холестеролу в печінці щурів, n = (4-9). \* P < 0,05 відносно значень у контрольних щурів; # P < 0,05 відносно значень у групі «IP».*

Тривале утримання щурів на жировій дієті спричиняє істотні зміни у фосфоліпідному складі печінки, зокрема показано вірогідне зростання вмісту фосфатидилхоліну (PC), фосфатидилетаноламіну (PE) та значне зниження вмісту решти фосфоліпідів: лізофосфатидилхоліну (LPC), лізофосфатидилетаноламіну (LPE), сфінгомієліну (SM), дифосфатидилгліцеролу (DPG), фосфатидилінозитолу (PI), фосфатидилсерину (PS) (табл. 1). Відповідні зміни рівня індивідуальних фосфоліпідів було виявлено у складі плазматичних мембран адипоцитів людей з ожирінням за умов розвитку гіперінсулінемії [Zeghari N. et al., 2000]. Введення NSE

щурам з ІР сприяло нормалізації вмісту РС, РЕ, РІ та зростанню рівнів SM, DPG, PS та LPC (табл. 1). Так, нормалізація вмісту РС та РЕ у печінці ІР щурів за дії NSE з одного боку скоріше за все обумовлена підвищенням чутливості клітин до інсуліну, з іншого, може бути наслідком активації фосфоліпази А2, на що вказує зростання рівня їх лізоформ. Відомо, що нормалізація рівня лізоформ фосфоліпідів та їх співвідношення з фосфоліпідом РЕ (який розріджує плазматичну мембрану) свідчить про відновлення структури плазматичної мембрани та активності мембранозв'язаних протеїнів [Fuller N. and Rand R. P., 2001].

Таблиця 1

**Вміст індивідуальних фосфоліпідів (мкг Рі /г тканини) в печінці щурів (М ± m, n = 6-10)**

Індивідуальні фосфоліпіди	Контроль	NSE	ІР	ІР+NSE
Фосфатидилхолін	312,8± 11,3	288,6±15,7	365,9±18,1*	299,5±17,0#
Фосфатидилетаноламін	106,7±18,9	140,6±17,1	162,27±8,5*	137,7±6,6#
Дифосфатидилгліцерол	46,9±9,63	51,06±2,7	17,8±1,6*	36,4±5,08#
Сфінгомієлін	48,7±6,2	45,3±4,4	19,65±2,02*	32,66±3,97#
Фосфатидилінозитол	29,8±5,5	35,8±4,8	16,6±1,98*	28,7±3,9#
Фосфатидилсерин	24,83±5,9	27,7±5,9	10,4±1,41*	18,1±3,1#
Лізофосфатидилетаноламін	24,7±4,96	41,04±6,3	12,35±2,9*	29,85±7,6
Лізофосфатидилхолін	19,72±2,69	34,5±2,5	12,18±2,3*	28,27±5,9#

\* P<0,05 відносно значень у контрольних щурів; # P<0,05 відносно значень у групі «ІР».

Зростання рівня PS та РІ, які беруть безпосередню участь у активації атипичних форм протеїнкінази С та РІЗ-кінази, у печінці щурів з ІР за умов введення NSE також вносить свій вклад у відновлення чутливості до інсуліну. Нормалізація вмісту SM за дії NSE може бути наслідком зниження утворення цераміду, який блокує активацію Akt-сигнального шляху, та, як наслідок сприяє відновленню проведення інсулінового сигналу.

Аналіз вмісту ЖК, як вільних (ВЖК), так і у складі фосфоліпідів (ФЛ) печінки щурів не показав суттєвих змін рівня насичених ЖК за ІР, тоді як вміст ненасичених ЖК вірогідно змінювався (рис. 4). Так, за ІР у печінці щурів відбувається вірогідне зростання вмісту моноєнових ЖК всіх досліджуваних фракцій. Водночас було показано суттєве зниження рівня поліненасичених ЖК у фракціях ВЖК та їх зростання у складі ФЛ печінки щурів групи «ІР» (рис. 4, а). Серед основних моноєнових ЖК помітно збільшується рівень олеїнової кислоти (ФЛ 11,6±0,4; ВЖК 34,9±0,9; P<0,05) у порівнянні із контролем (ФЛ 9,8±0,6; ВЖК 23,7±0,9), що може бути обумовлено зростанням активності Δ9-десатурази в умовах жирового навантаження. Згідно отриманих даних за ІР спостерігається зростання вмісту арахідонової кислоти (13,98±1,2; P<0,05), порівняно з їх рівнем у тварин контрольної групи (8,3±1,7) у складі ФЛ печінки щурів. Підвищення вмісту поліненасичених ФЛ може бути обумовлено зростанням рівня прозапального

цитокіну TNF- $\alpha$ , а також інтенсифікацією процесів пероксидації та залученням арахідонової кислоти до синтезу прозапальних ейкозаноїдів.

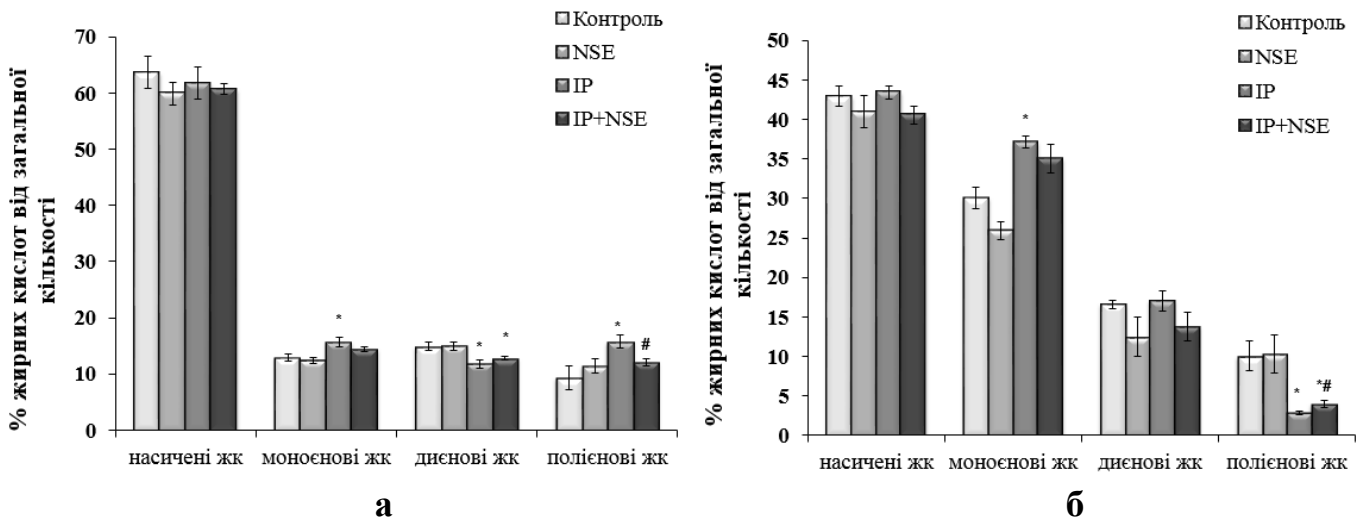


Рис. 4. Вміст ненасичених жирних кислот в різних ліпідних фракціях печінки щурів: фосфоліпідів (а), вільних жирних кислот (б),  $n = (6-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

Виявленні зміни ліпідного складу печінки за ожиріння можуть змінювати функціональну активність мембранозв'язаного інсулінового рецептора та, ймовірно, пост-рецепторну сигнальну трансдукцію, підтвердженням чого є розвиток IP у щурів. За дії NSE відбувається нормалізація вмісту індивідуальних фосфоліпідів та ЖК в печінці щурів за умов IP, що супроводжується відновленням чутливості до інсуліну тканин щурів.

#### Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад підшлункової залози щурів за інсулінорезистентності.

Встановлено, що інсулін-продукуючі  $\beta$ -клітини підшлункової залози виступають мішенями для біологічної дії інсуліну, зокрема, показано його участь у регуляції транскрипції, трансляції, метаболізму глюкози та ліпідів, іонного транспорту, клітинної проліферації та апоптозу  $\beta$ -клітин [Cantley J. et al., 2007]. Тому, важливим є дослідження ліпідного профілю підшлункової залози та взаємозв'язку змін його складу з розвитком IP у щурів.

Аналіз ліпідного складу підшлункової залози щурів показав суттєве зниження загального рівня ФЛ ( $334,21 \pm 33,14$  мкг Рі/г тканини;  $P < 0,001$ ) у щурів групи «IP», порівняно з контрольними тваринами ( $456,52 \pm 24,99$  мкг Рі/г тканини). Зниження рівня загальних ФЛ за ожиріння відбувалось, ймовірно, за рахунок зменшення вмісту основних індивідуальних ФЛ. Зокрема, у щурів групи «IP» виявлено значне зниження вмісту РС на 66%, РЕ майже на 61%, РІ на 29% та PS на 46% порівняно з щурами групи «Контроль». Вміст SM, LPC та LPE у групі «IP» має тенденцію до зниження (табл. 2).

Водночас в наших дослідженнях за аліментарного ожиріння в підшлунковій залозі щурів спостерігається значне зниження вмісту вільного холестеролу, майже в

півтора рази ( $471,6 \pm 43,9$  мкг/г тканини;  $P < 0,05$ ), відносно значень у контрольних тварин ( $781,6 \pm 29,8$  мкг/г тканини).

Таблиця 2

**Вміст індивідуальних фосфоліпідів (мкг Рі /г тканини) в підшлунковій залозі щурів ( $M \pm m$ ,  $n = 6-10$ )**

Індивідуальні фосфоліпіди	Контроль	NSE	IP	IP+NSE
Фосфатидилхолін	$116,29 \pm 8,03$	$38,79 \pm 2,7$	$39,7 \pm 8,04^*$	$66,8 \pm 15,9\#$
Фосфатидилетаноламін	$45,21 \pm 12,6$	$15,4 \pm 1,83$	$17,38 \pm 2,9^*$	$35,7 \pm 6,85\#$
Дифосфатидилгліцерол	$6,03 \pm 0,51$	$3,85 \pm 1,25$	$8,5 \pm 1,7^*$	$7,42 \pm 1,79$
Сфінгомієлін	$11,08 \pm 1,06$	$9,6 \pm 0,42$	$8,6 \pm 1,85$	$11,6 \pm 2,7$
Фосфатидилінозитол	$19,26 \pm 1,28$	$7,8 \pm 1,9$	$13,8 \pm 1,36^*$	$14,1 \pm 2,9$
Фосфатидилсерин	$5,6 \pm 0,7$	$5,06 \pm 0,79$	$3,02 \pm 0,97^*$	$7,9 \pm 1,2\#$
Лізофосфатидилетаноламін	$8,57 \pm 1,44$	$4,41 \pm 1,29$	$5,65 \pm 0,89^*$	$7,01 \pm 1,4$
Лізофосфатидилхолін	$21,33 \pm 1,07$	$7,95 \pm 1,71$	$19,4 \pm 3,5$	$25,87 \pm 4,8$

\*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

Введення NSE щурам з розвинутою IP спричиняє зростання вмісту PC, PE, PS (табл. 2) та нормалізує рівень холестеролу ( $697,9 \pm 28,9$  мкг/г тканини;  $P < 0,05$ ) в підшлунковій залозі щурів. Отриманий ефект NSE може сприяти відновленню структури ліпідного бішару мембран та інсулінового сигнального каскаду, що супроводжується зниженням значення HOMA-IR (рис. 2, б) та вмістом інсуліну плазми крові у щурів групи «IP+NSE» (рис. 2, а).

До основних факторів, які впливають на фізико-хімічні властивості ліпідного бішару мембран, належить співвідношення насичених/ненасичених ЖК. Так, за IP у складі ФЛ підшлункової залози щурів зафіксовано зниження вмісту насичених ЖК та зростання рівня моно- та поліненасичених ЖК (рис. 5, а). Зростання рівня ненасичених ФЛ на фоні зниження їх загального рівня та вмісту вільного холестеролу може сприяти збільшенню плинності плазматичної мембрани та спричиняти порушення механізмів сигнальної трансдукції. Водночас, у фракції триацилгліцеролів (ТАГ) «IP» групи щурів виявлено зростання вмісту насичених ЖК, в першу чергу стеаринової кислоти, яка є субстратом для синтезу ТАГ, що свідчить про розвиток стеатозу підшлункової залози (рис. 5, б).

В підшлунковій залозі щурів з IP, яким вводили NSE, рівень мононенасичених ЖК істотно не змінювався (рис. 5, а), що по-перше, пов'язано з коротким часом введення NSE, а також токсичною дією надлишку стеаринової кислоти на  $\beta$ -клітини. Водночас за дії NSE відбувається нормалізація вмісту насичених ЖК у складі ТАГ та поліненасичених ЖК (арахідонової кислоти) у складі ФЛ, що може бути пов'язано зі зменшення вмісту ТАГ та зниженням процесів ПОЛ в підшлунковій залозі IP щурів.

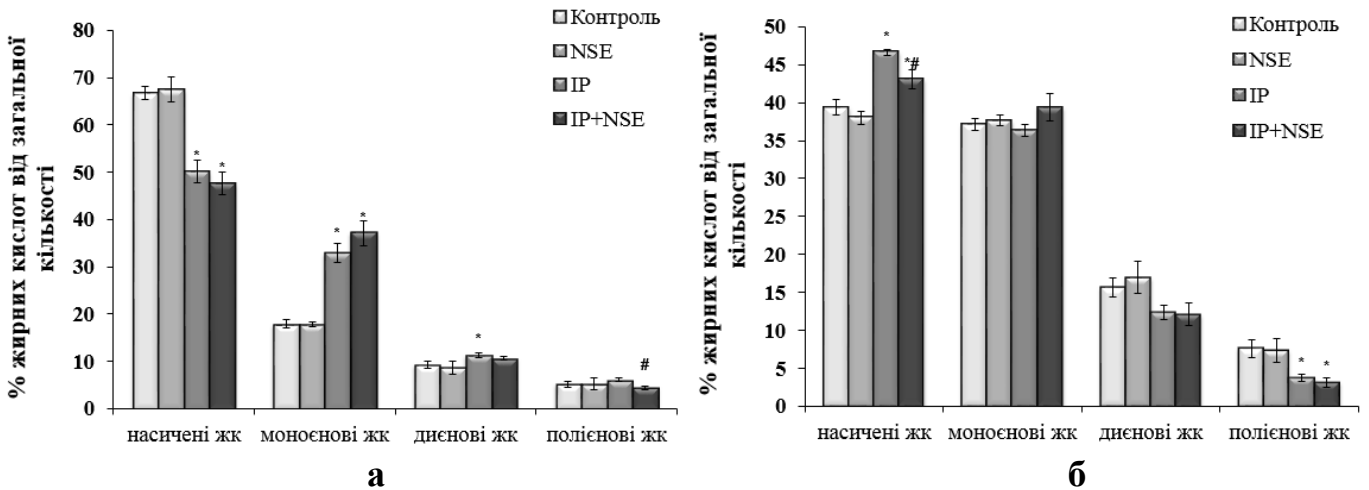


Рис. 5. Вміст ненасичених жирних кислот в різних ліпідних фракціях підшлункової залози щурів: фосфоліпідів (а), триацилгліцеролів (б),  $n = (6-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

Таким чином, введення NSE сприяє відновленню ліпідного складу підшлункової залози щурів за жирового навантаження, а саме, зростанню вмісту основних ФЛ, рівня холестеролу та нормалізації розподілу ЖК.

#### Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний профіль плазми крові щурів за інсулінорезистентності.

В клінічній та експериментальній практиці оцінка функціонального стану інсулінозалежних тканин, в першу чергу печінки, проводиться за показниками ліпідного профілю плазми крові. Вважається, що в основі порушень обміну ліпідів за умов розвитку системної дисліпідемії та IP є зростання продукції печінкою ТАГ-насичених ЛПДНЩ, що спричиняє зниження вмісту холестеролу ЛПВЩ та накопичення ЛПНЩ [Goldberg I. J., 2001].

Результати досліджень ліпідного спектру плазми щурів групи «IP» показали значне зростання рівня ТАГ майже на 45% (рис. 6, а), що є однією з причин збільшення вмісту загальних ліпідів більш ніж вдвічі, порівняно з контрольними тваринами (рис 6, б). Застосування NSE щурам з IP сприяло нормалізації цих показників (рис. 6).

Відомо, що основними транспортерами ТАГ є ЛПДНЩ, які утворюються в печінці, та хіломікрони, які ресинтезуються зі складових харчового жиру в лімфатичній системі кишкових ворсинок [Ginsberg H. N. et al., 2005]. Беручи до уваги те, що протягом 2 тижнів до завершення експерименту всі тварини були переведені на стандартний раціон, підвищення рівня ТАГ у щурів групи «IP» може відбуватися саме у складі ЛПДНЩ, що пов'язано з розвитком дисліпідемії та IP тканини печінки.

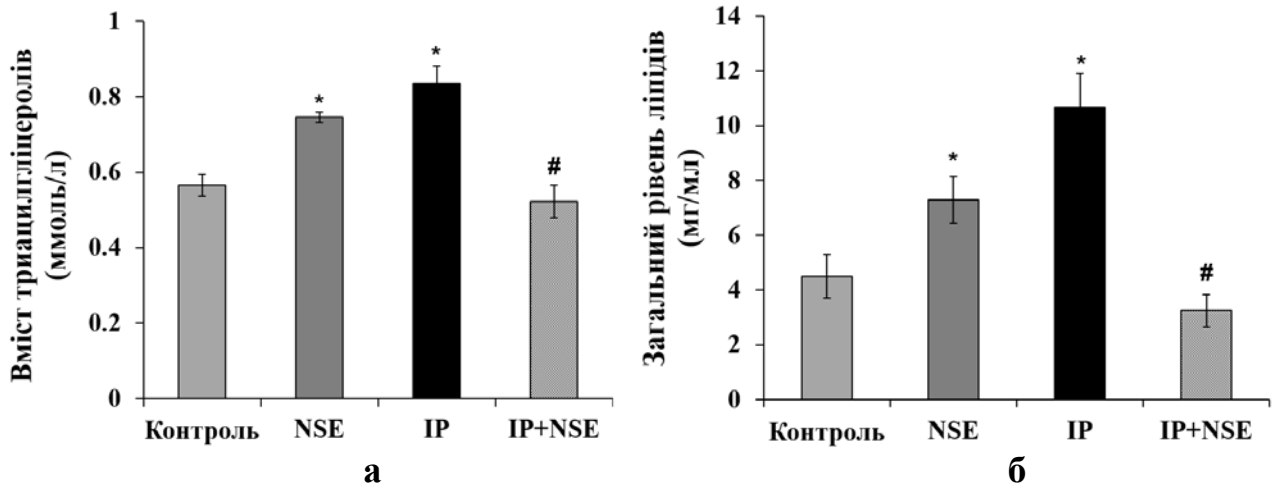


Рис. 6. Вміст триацилгліцеролів (а) та загальний рівень ліпідів (б) в плазмі крові щурів,  $n = (5-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

Підтвердженням цього є результати ліпопротеїнового аналізу, де спостерігалось зростання вмісту холестеролу ЛПДНЦ та ЛПНЦ з одночасним зниженням ЛПВЦ (табл. 3). Введення NSE щурам з IP сприяло відновленню вмісту холестеролу у складі ліпопротеїнів, що може свідчити про поліпшення чутливості до інсуліну тканини печінки (табл. 3).

Таблиця 3

**Вміст холестеролу загального та у складі ліпопротеїнів плазми крові щурів (M ± m; n = 4-10)**

Параметр	Групи тварин			
	Контроль	NSE	IP	IP+NSE
Загальний холестерол, ммоль/л	0,88±0,032	0,72±0,049	1,21±0,14*	1,14±0,058*
ЛПВЦ, ммоль холестеролу/л	0,08±0,007	0,08±0,026	0,06±0,006	0,1±0,007#
ЛПНЦ, ммоль холестеролу/л	0,09±0,015	0,06±0,008	0,14±0,01*	0,11±0,004#
ЛПДНЦ+ЛППЦ, ммоль холестеролу/л	0,79±0,004	0,064±0,04	1,06±0,106	0,79±0,106

\*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

З даних літератури відомо, що саме підвищення секреції TNF- $\alpha$  за гіпертрофії жирової тканини індукує ліполіз, спричиняючи зростання пулу ВЖК та їх надмірне надходження до тканини печінки, де вони залучаються до синтезу ТАГ [Chen X. et al, 2009; Browning J. D. and Horton J. D., 2004]. Так, за жирового навантаження в



сироватці крові щурів було виявлено зростання рівня TNF- $\alpha$  більш ніж в три рази ( $291,27 \pm 20,9$  пг/мл;  $P < 0,05$ ), відносно показників у контрольних тварин ( $88,7 \pm 36,3$  пг/мл). Введення NSE щурам з IP сприяло нормалізації його вмісту ( $79,6 \pm 32,4$  пг/мл;  $P < 0,05$ ). Таким чином, одним із механізмів зниження вмісту ТАГ та ЛПДНЩ за умов введення NSE щурам із жировим навантаженням є пригнічення утворення TNF- $\alpha$ .

За IP, індукованої ожирінням, відбуваються значні зміни у складі індивідуальних ВЖК плазми крові щурів (рис. 7). Зокрема, спостерігається зростання вмісту моноєнових ВЖК, в першу чергу олеїнової кислоти (18:1n-9) в

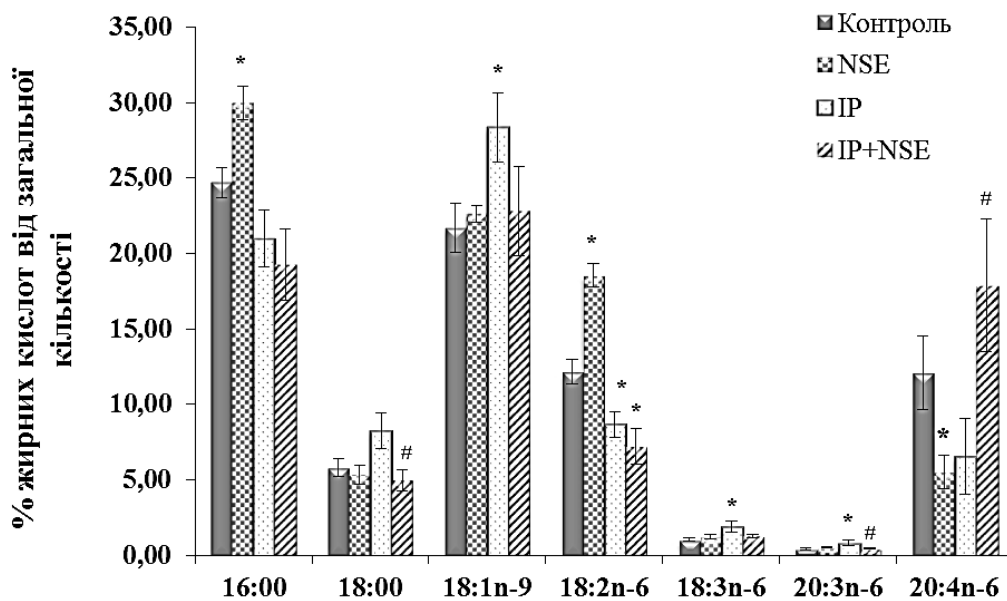


Рис. 7. Вміст вільних жирних кислот в плазмі крові щурів,  $n = (7-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

плазмі крові щурів групи «IP». На рис. 6 показано зниження вмісту пальмітинової (16:0) та зростання стеаринової (18:0) ВЖК, прекурсору для синтезу 18:1n-9, що свідчить про активацію n-9 шляху синтезу ЖК у щурів з жировим навантаженням. Введення NSE щурам з експериментальною IP сприяє нормалізації вмісту 18:0 та 18:1n-9 ВЖК в плазмі крові (рис. 7). Відомо, що зростання пулу 18:1n-9 ВЖК, субстрату для синтезу ТАГ, супроводжується збільшенням продукції TNF- $\alpha$ , що корелює з активацією процесів ПОЛ та апоптозу в клітинах гепатоцитів [Cui W. et al., 2010]. Враховуючи провідну роль перерахованих ВЖК у синтезі ТАГ, зниження їх пулу за дії NSE може свідчити про його протекторний вплив на інсулінозалежні тканини щурів за умов дисліпідемії.

Дослідження вмісту полієнових ВЖК в плазмі крові щурів показало зниження вмісту арахідонової (20:4n-6) ВЖК в групі «IP» (рис. 7). Введення NSE щурам з IP сприяє вірогідному зростанню рівня 20:4n-6, що ймовірно, пов'язано з його антиоксидантними властивостями та опосередкованим впливом на метаболізм ЖК. Відомо, що зниження 20:4n-6 є наслідком розвитку IP, оскільки активність ензиму  $\Delta 5$ -десатурази, який бере участь у синтезі 20:4n-6, регулюється інсуліном [Galgani J. E. et al., 2007]. Тому, зростання вмісту 20:4n-6 за дії NSE, може свідчити про зростання чутливості до інсуліну та нормалізацію біосинтезу 20:4n-6. З іншого боку

відновлюючий вплив NSE на вміст 20:4n-6 є можливим наслідком пригнічення процесів ПОЛ за умов експериментальної ІР.

Отже, отриманні результати підтверджують здатність NSE компенсувати ліпідний дисбаланс за ІР, що, на нашу думку, опосередковано його здатністю впливати на процеси перетворення, а, можливо, і утворення основних ЖК. Так, зниження пулу мононенасичених ВЖК в плазмі крові щурів за дії NSE супроводжується зменшенням вмісту загальних ліпідів та ТАГ плазми крові, сприяє відновленню розподілу холестеролу у складі ліпопротеїнових фракцій плазми крові, що може відігравати значну роль у попередженні ускладнень, пов'язаних з розвитком ІР.

### ***Вплив N-стеароїлетаноламіну на про/антиоксидантний баланс печінки щурів за експериментальної інсулінорезистентності.***

Надходження надлишку насичених та мононенасичених ВЖК до інсулінозалежних тканин сприяє інтенсифікації процесів окиснення ЖК з утворенням АФК. Крім того, за інсулінорезистентності відбувається активація неензиматичного окиснення глюкози, що також призводить до зростання вмісту АФК. В результаті гіперпродукції АФК запускаються процеси вільнорадикального окиснення ненасичених зв'язків ліпідів, протеїнів та нуклеотидів, що призводить до порушення їх біологічної функції та активації оксидативного стресу [Nakamura S., 2009]. Оскільки, за дії NSE спостерігалось відновлення ФЛ та ЖК складу тканин щурів, наступним етапом було дослідити його вплив на вміст продуктів пероксидації ліпідів та протеїнів, а також активність ензимів антиоксидантного захисту.

#### Вплив N-стеароїлетаноламіну на процеси пероксидного окислення ліпідів та окисної модифікації протеїнів в печінці щурів

Відомо, що за оксидативного стресу подвійні зв'язки жирнокислотних радикалів ФЛ, де близько 50% складають поліненасичені залишки ЖК мембран клітин, піддаються окисненню АФК. Дослідження вмісту ТБК-реагуючих продуктів в печінці щурів групи «ІР» показало вірогідне зростання цього показника, порівняно з контрольною групою тварин (рис. 8, а).

Окрім ліпідів, протеїни виступають мішенями для вільних радикалів кисню та зв'язують 50 – 75% генерованих АФК. Тому, оцінка вмісту карбонільних груп у складі протеїнів є важливим маркером розвитку оксидативного стресу за метаболічного синдрому [Norps E. and Caimi G., 2013]. З рис. 8 (б) видно, що за індукованої ожирінням ІР вміст 2,4-ДНФГ вірогідно вищий, ніж в контрольних тварин, що свідчить про посилення процесів окисної модифікації протеїнів.

Введення шурам з ІР NSE викликало зменшення вмісту ТБК-реагуючих продуктів у печінці (рис. 8, а) та зниження рівня 2,4-ДНФГ в плазмі та печінці (рис. 8, б).

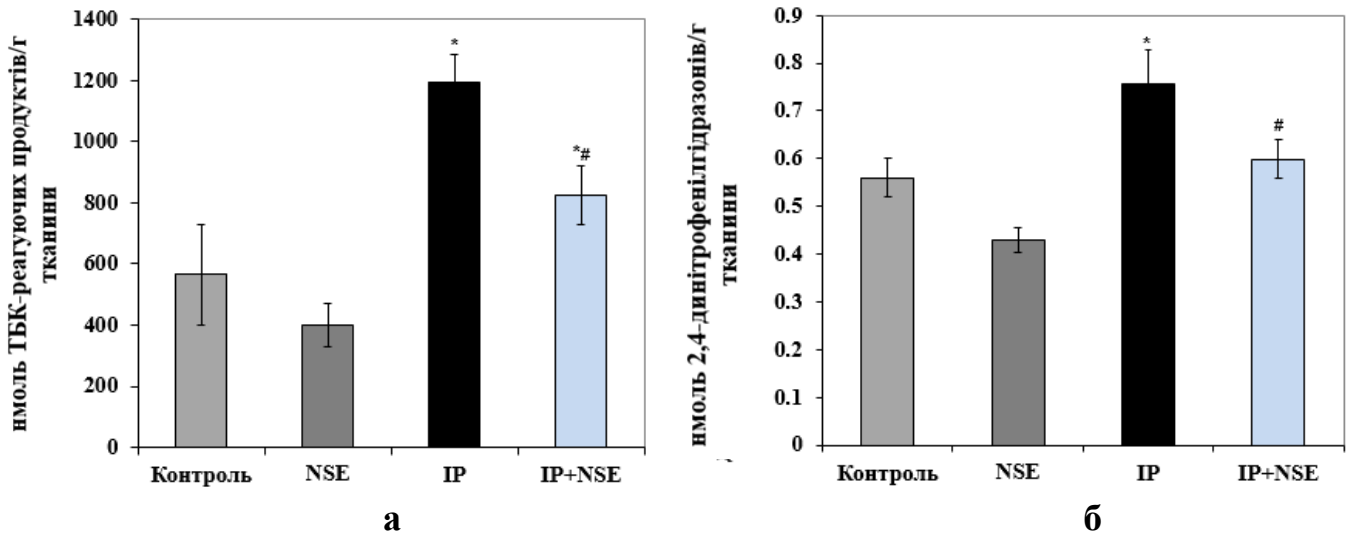


Рис. 8. Вміст ТБК-реагуючих продуктів (а) та 2,4-ДНФГ (б) в печінці щурів,  $n = (4-10)$ . \*  $P < 0,05$  відносно значень у контрольних щурів; #  $P < 0,05$  відносно значень у групі «IP».

Враховуючи все вище зазначене, зниження вмісту продуктів ПОЛ та окисної модифікації протеїнів у печінці щурів за дії NSE є свідченням його мембранопротекторних властивостей, які можуть мати місце у відновленні толерантності до глюкози та чутливості до інсуліну у щурів з IP, індукованої аліментарним ожирінням.

#### Вплив N-стеароїлетаноламіну на активність ензимів антиоксидантної системи печінки щурів

Однією із причин накопичення значної кількості продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів за IP є пригнічення активності основних ензимів антиоксидантної системи організму.

Так, за інсулінорезистентності в печінці щурів спостерігалось зниження активності супероксиддисмутази (СОД), каталази та компенсаторне зростання активності глутатіонпероксидази (ГП) (табл. 4). Відомо, що зниження активності СОД, яка каталізує реакцію перетворення супероксид-аніону на гідроген пероксид, єдиний субстрат каталази, спричиняє зниження активності останнього. В той час як за низьких концентрації  $H_2O_2$  більш ефективно працює ГП.

Введення NSE щурам з індукованою IP сприяє зростанню активності СОД, каталази та ГП в печінці щурів (табл. 4). Отриманий ефект NSE може бути пов'язаний, по-перше, зі зниженням утворення АФК, що супроводжується активацією ензимної ланки антиоксидантного захисту, по-друге, з відновленням активності цитозольної Cu-SOD за рахунок здатності NSE нормалізувати структуру ліпідного бішару мембран клітин. З іншого боку, активація досліджуваних ензимів може бути обумовлена інтенсифікацією окиснення ЖК у пероксисомах клітин за дії NSE.

**Активність ензимів антиоксидантного захисту в печінці щурів (M ± m; n= 6 – 10)**

Параметр	Групи тварин			
	Контроль	NSE	IP	IP+NSE
Активність СОД, ум.од./хв·мг протеїну	837,2±94,3	956,6±75,9	601,8±42,7*	804,9±47,07#
Активність каталази, розкладений H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мкмоль/хв·мг протеїну	484,0±24,8	446,5±22,8	338,6±48,1*	485,2±25,1*#
Активність ГП, окислений глутатіон, нмоль/хв·мг протеїну	153,8±6,26	177,9±10,4*	182,8±5,73*	211,2±10,2*#

\* P<0,05 відносно значень у контрольних щурів; # P<0,05 відносно значень у групі «IP».

Таким чином, активація ензимної ланки антиоксидантного захисту за умов введення NSE супроводжується зниженням інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів на фоні збільшення чутливості до інсуліну у щурів з експериментальної IP.

## ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень вперше встановлено нормалізуючий вплив насиченого представника NAE – N-стеароїлетаноламіну (NSE) на ліпідний склад печінки та підшлункової залози за умов розвитку інсулінорезистентності, викликаного аліментарним ожирінням.

1. Вперше показано, що введення щурам суспензії NSE (50 мг/кг маси тіла) протягом двох тижнів після довготривалого навантаження жирною дієтою, спричиняє зниження рівня інсуліну плазми крові, значення індексу HOMA-IR та відновлення толерантності до глюкози, що сприяє відновленню чутливості до інсуліну периферійних тканин.

2. Встановлено, що за аліментарного ожиріння в печінці щурів відбувається суттєве зниження вмісту аніонних фосфоліпідів, сфінгомієліну, кардіоліпіну та зростання рівня фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, що корелює з показниками вмісту інсуліну плазми крові та величиною індексу HOMA-IR.

3. Розвиток ожиріння у щурів супроводжується збільшенням вмісту олеїнової та арахідонової кислоти у складі фосфоліпідів, а також зростанням розрахункового індексу активності Δ9-десатурази в печінці.

4. За умов введення NSE виявлено нормалізацію ліпідного складу печінки щурів з інсулінорезистентністю. Зокрема, показано, що відновлення вмісту основних фосфоліпідів печінки щурів за дії NSE корелює зі зниженням рівня інсуліну у плазмі крові та відновленням чутливості до нього.

5. Встановлено, що надмірне жирове навантаження спричиняє зниження вмісту індивідуальних фосфоліпідів та вільного холестеролу в підшлунковій залозі щурів, а також сприяє зростанню рівня мононенасичених жирних кислот, що свідчить про розвиток стеатозу досліджуваної тканини.

6. Застосування NSE щурам з інсулінорезистентністю сприяє відновленню вмісту основних фосфоліпідів та холестеролу в підшлунковій залозі щурів.

7. Виявлено, що введення NSE щурам з розвинутою інсулінорезистентністю призводить до зниження вмісту вільних мононенасичених жирних кислот та триацилгліцеролів в плазмі крові, а також відновлює розподіл холестеролу у складі ліпопротеїнових фракцій плазми крові.

8. За умов введення NSE встановлено нормалізацію рівня прозапального цитокіну TNF $\alpha$  в сироватці крові інсулінорезистентних щурів, зростання вмісту якого обумовлено розвитком аліментарного ожиріння.

9. Показано, що застосування NSE за інсулінорезистентності сприяє зниженню вмісту продуктів пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів в печінці щурів, а також відновленню активності ензимів антиоксидантного захисту та нормалізації рівня нітрит-аніону у плазмі крові та печінці щурів.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вплив N-стеароїлетаноламіну на активність антиоксидантного захисту, вміст продуктів ПОЛ та нітрит-аніона в плазмі крові та печінці щурів з індукованою інсулінорезистентністю / О. В. Онопченко, Г. В. Косякова, Т. М. Горідько, А. Г. Бердишев, О. Ф. Мегедь, Н. М. Гула // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, №5. – С. 88 – 96. *(Особистий внесок здобувача – створення моделі інсулінорезистентності у щурів, визначення маркерів розвитку інсулінорезистентності, написання статті).*
2. Вплив N-стеароїлетаноламіну на фосфоліпідний склад печінки щурів з інсулінорезистентністю, спричиненою аліментарним ожирінням / О. В. Онопченко, Г. В. Косякова, Т. М. Горідько, В. М. Клімашевський, Н. М. Гула. // Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, №1. – С. 102 – 111. *(Особистий внесок здобувача – проведення фосфоліпідного аналізу, дослідження вмісту жирних кислот у складі фосфоліпідів печінки щурів, статистичний аналіз, написання статті).*
3. The effect of N-stearoylethanolamine on cholesterol content, fatty acid composition and protein carbonylation level in rats with alimentary obesity-induced insulin resistance / O. V. Onopchenko, G. V. Kosiakova, E. F. Meged, V. M. Klimashevsky, N. M. Gula // Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, №6. – С. 119 – 128. *(Особистий внесок здобувача – визначення складу вільних жирних кислот, холестеролу в печінці щурів, та статистичний аналіз, написання статті).*
4. N-Stearoylethanolamine restores pancreas lipid composition in obesity-induced insulin resistant rats / O. V. Onopchenko, G. V. Kosiakova, M. Oz, V. M. Klimashevsky, N. M. Gula // Lipids. – 2015. – 50, №1. – P. 13 – 21. *(Особистий внесок здобувача – проведення жирнокислотного та фосфоліпідного складу підшлункової залози щурів, визначення вмісту тригліцеридів у плазмі крові щурів, оцінка розрахункової активності десатураз, написання статті).*

5. The effect of N-stearoylethanolamine on plasma lipid composition in rats with experimental insulin resistance / O. V. Onopchenko, G. V. Kosiakova, V. M. Klimashevsky, N. M. Hula // Укр. біохім. журн. – 2015. – 87, №1. – С. 46 – 54. (*Особистий внесок здобувача – визначення вмісту індивідуальних вільних жирних кислот, вмісту загального холестеролу у плазмі крові щурів, рівня прозапальних цитокінів у сироватці щурів, написання статті*).
6. Вплив N-стеароїлетаноламіну на фосфоліпідний склад печінки щурів з індукованим інсулінорезистентним станом / О. В. Онопченко // Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2013», (Київ, 6-7 червня 2013 р.): Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, №4. – С. 143.
7. The effect of N-stearoylethanolamine on fatty acid content of liver in rats with insulin resistance state / O.V. Onopchenko, G.V. Kosiakova, N.M. Gula // Abstract book XVIII Lipid Meeting, (Leipzig, December 5-7, 2013): 2013. – P. 82 – 83.
8. The influence of N-stearoylethanolamine on fatty acid composition in rat pancreas under alimentary obesity-induced insulin resistance / O. Onopchenko, G. Kosiakova, N. Gula // Abstract eBook FEBS EMBO 2014 Conference, (Paris, 30 august – 4 september 2014): FEBS Journal. – 2014. – 281 (Suppl. 1). – P. 607.
9. Compensatory effect of N-stearoylethanolamine on rat plasma lipid profile under obesity-induced insulin resistance / O. V. Onopchenko, G. V. Kosiakova, N. M. Gula // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, (Київ, 6-10 жовтня 2014 р.): Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, №4 (Suppl. 2.). – С. 115 – 116.
10. Протизапальний ефект N-стеароїлетаноламіну при експериментальному інсулінорезистентному стані у щурів / Н. М. Гула, Г. В. Косякова, А. Г. Бердишев, О. В. Онопченко, О. Ф. Мегедь, В. М. Клімашевський // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, (Київ, 6-10 жовтня 2014 р.): Укр. біохім. журн. – 2014. – 86, №4 (Suppl. 2.). – С. 13.
11. N-stearoylethanolamine restores plasma cholesterol content in the lipoprotein fractions of insulin resistant rats / O. V. Onopchenko, G. V. Kosiakova, N. M. Gula // Book of abstracts 5th European workshop on Lipid Mediators, (Istanbul, October 23-24, 2014): 2014. – P. 42.
12. N-stearoylethanolamine improves indicators of insulin resistance development under high-fat diet overload / O.V. Onopchenko, G.V. Kosiakova, N.M. Gula // Atherosclerosis. – 2015. – 241, №1. – e226.
13. Corrective effect of N-stearoylethanolamine on pancreas phospholipid imbalance in rats with obesity-induced insulin resistance / O. Onopchenko, G. Kosiakova, N. Gula // FEBS Journal. – 2015. – 282(Suppl. 1). – P12-009.

## АНОТАЦІЯ

**Онопченко О.В. Нормалізація ліпідного профілю та відновлення чутливості до інсуліну у тканинах інсулінорезистентних щурів за дії N-стеароїлетаноламіну. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю – 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2015.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу насиченого NAE 18:0 – N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад плазми крові, тканин печінки та підшлункової залози щурів за умов розвитку інсулінорезистентності (ІР), спричиненої аліментарним ожирінням.

Експериментально встановлено, що жирове навантаження спричиняє істотні порушення ліпідного складу досліджуваних тканин, що супроводжується розвитком ІР у щурів. Зокрема, в печінці щурів виявлено зростання вмісту вільного холестеролу, фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну та зниження рівня аніонних фосфоліпідів, зафіксовано зростання вмісту мононенасичених та поліненасичених фосфоліпідів. Показано суттєве зниження рівня основних фосфоліпідів та вільного холестеролу, зростання рівня стеаринової кислоти у фракції триацилгліцеролів підшлункової залози щурів, що обумовлено розвитком стеатозу досліджуваної тканини. Також показано збільшення рівня мононенасичених вільних жирних кислот, триацилгліцеролів, вмісту холестеролу у складі ліпопротеїнів низької та дуже низької щільності в плазмі крові щурів за ІР.

Введення NSE щурам з розвинутою ІР сприяє нормалізації ліпідного складу печінки та підшлункової залози щурів, в наслідок чого відбувається відновлення чутливості до інсуліну та толерантності до глюкози. Зокрема, встановлено, що введення NSE сприяє нормалізації рівня індивідуальних фосфоліпідів в печінці щурів з ІР, що корелює зі зниженням вмісту інсуліну плазми крові та значенням індексу HOMA-IR. Доведено, що застосування NSE спричиняє зростання вмісту холестеролу та рівня основних фосфоліпідів підшлункової залози щурів за ІР. Крім того, показана коригуюча дія NSE на співвідношення основних мононенасичених та поліненасичених жирних кислот в досліджуваних тканинах.

Встановлено, що NSE запобігає зниженню поліненасичених вільних жирних кислот, відновлює вміст холестеролу в ліпопротеїдах різних фракцій, знижує рівень мононенасичених вільних жирних кислот та триацилгліцеролів в плазмі крові ІР щурів.

Введення NSE сприяє зростанню активності ензимів антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази), пригнічує утворення продуктів пероксидації ліпідів та окисної модифікації протеїнів в печінці щурів, а також знижує рівень TNF $\alpha$  в сироватці крові щурів з експериментальною ІР.

**Ключові слова:** N-стеароїлетаноламін, ліпідний склад, аліментарне ожиріння, інсулінорезистентність

## АНОТАЦИЯ

**Онопченко А.В. Нормализация липидного профиля и восстановление чувствительности к инсулину в тканях инсулинорезистентных крыс при введении N-стеароилэтанолamina. – Рукопись.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности – 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии имени А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 2015.

Диссертация посвящена исследованию влияния насыщенного NAE 18:0 – N-стеароилэтанолamina на липидный состав плазмы крови, печени, поджелудочной железы крыс при инсулинорезистентности (ИР), вызванной алиментарным ожирением.

Экспериментально было показано, что жировая нагрузка вызывает существенные изменения липидного состава исследуемых тканей, что сопровождается увеличением уровня инсулина, гликозилированного гемоглобина, значения индекса НОМА-IR, а также снижением глюкозотолерантности у крыс. В печени крыс обнаружено увеличение содержания свободного холестерина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтанолamina и снижение уровня анионных фосфолипидов, зафиксировано увеличение содержания мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов. Показано, что в поджелудочной железе ИР крыс происходит значительное снижение уровня основных фосфолипидов и свободного холестерина. Кроме того, во фракции триацилглицеролов зафиксировано увеличение содержания стеариновой кислоты, что обусловлено развитием стеатоза исследуемой ткани. Также обнаружено увеличение уровня свободных мононенасыщенных жирных кислот, триацилглицеролов, холестерина в составе липопротеинов низкой и очень низкой плотности в плазме крови крыс при ИР.

Введение NSE крысам с развитой ИР способствует нормализации липидного состава печени и поджелудочной железы, что приводит к восстановлению чувствительности к инсулину и толерантности к глюкозе. В частности, установлено, что введение NSE приводит к нормализации уровня индивидуальных фосфолипидов в печени инсулинорезистентных крыс, что коррелирует со снижением содержания уровня инсулина плазмы крови и значения индекса НОМА-IR. Доказано, что применение NSE способствует увеличению содержания холестерина и уровня основных фосфолипидов поджелудочной железы крыс при ИР. Кроме того, показано корректирующее действие NSE на соотношение основных мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот исследуемых тканей.

Введение NSE крысам с ИР способствует восстановлению уровня моно- и полиненасыщенных свободных жирных кислот, увеличению содержания холестерина липопротеинов высокой плотности и снижению холестерина липопротеинов низкой плотности. Кроме того, у ИР крыс, которые получали NSE, показана нормализация уровня TNF $\alpha$  в сыворотке крови.



Введение NSE способствует увеличению активности энзимов антиоксидантной защиты (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы), подавляет образование продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации протеинов в печени крыс с экспериментальной ИР.

**Ключевые слова:** N-стеароилэтаноламин, липидный состав, алиментарное ожирение, инсулинорезистентность

## ABSTRACT

**Onopchenko O.V. The normalization of lipid profile and the improvement of insulin sensitivity in tissues of insulin resistant rats under N-stearoylethanolamine treatment. – Manuscript.**

Thesis for PhD's degree by speciality – 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis is devoted to investigate the influence of saturated 18:0 NAE – N-stearoylethanolamine (NSE) on the lipid composition of plasma, liver and pancreas of rats with alimentary obesity-induced insulin resistance (IR).

It was experimentally detected that fat overload induces significant changes in the lipid profile of rats' studied tissues that was associated with the enhanced insulin and glycosylated hemoglobin level, HOMA-IR value and reduced glucose tolerance. In livers of IR rats, the content of free cholesterol, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine was increased, while the level of anionic phospholipids was decreased. Moreover, we found the increase in percentage of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in phospholipids. It has been shown that in the pancreas of rats with IR the level of main phospholipids and free cholesterol content were considerably reduced. The percentage of stearic acid in the triacylglycerol fraction was increased, which is due to the development of steatosis in the pancreas under fat overload conditions. Besides, we found the enhanced level of monounsaturated free fatty acids, triacylglycerol, low and very low density lipoproteins' cholesterol content in IR rats' plasma.

The NSE administration to IR rats caused normalization of liver and pancreas lipid composition that was followed by the improvement of insulin sensitivity and glucose tolerance. Particularly, we showed that the NSE treatment contributes to the normalization of individual phospholipids level in the liver from IR rats that was correlated with the reduction of plasma insulin level and HOMA-IR value. It has been detected that the cholesterol level and the main pancreas phospholipids' content under the NSE action increases significantly in IR rats. In addition, we showed the corrective effect of NSE on the ratio of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in studied tissues.

The NSE administration to obese rats with IR restored the content of mono- and polyunsaturated fatty acids, increased high density lipoprotein cholesterol content and reduced low density lipoprotein cholesterol. In addition, the IR rats treated with NSE showed normalization in the serum TNF $\alpha$  level.

The NSE treatment triggered the increase of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase) activity, the inhibition of lipid and protein peroxidation products formation in the liver and the reduction of serum TNF $\alpha$  level in rats with experimental IR.

**Keywords:** N-stearoylethanolamine, lipid composition, alimentary obesity, insulin resistance