

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

**АЛЕКСАНДРОВ АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ**

УДК: 577.112.2:612.128

ДИСЕРТАЦІЯ

**БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ В ОРГАНІЗМІ  
ЩУРІВ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ ПРОГЕСТЕРОН-  
ІНДУКОВАНОГО ОЖИРІННЯ**

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Підпис:           Александров А.В.

Науковий керівник  
доктор біологічних наук, професор  
**Остапченко Людмила Іванівна**

Київ, 2019

## ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ .....	5
ВСТУП .....	6
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	14
РОЗДІЛ 1 .....	14
1.1 Загальна характеристика проблеми ожиріння та супутніх хвороб .....	14
1.2 Основні аспекти та вплив статевих гормонів на функціонування жирової тканини .....	16
1.3 Будова, класифікація та властивості меланінів .....	23
РОЗДІЛ 2 .....	30
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....	30
2.1. Реактиви та матеріали.....	30
2.2. Обладнання .....	30
2.3. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин.....	31
2.4. Умови проведення експерименту.....	31
2.5. Визначення органомеричних параметрів щурів .....	32
2.6. Отримання сироватки крові .....	32
2.7. Визначення концентрацій тригліцеридів у сироватці крові щурів .....	33
2.8. Визначення концентрацій холестеролу у сироватці крові щурів	33
2.9. Визначення концентрацій ліпопротеїнів низької щільності у сироватці крові щурів .....	34
2.10. Визначення концентрацій ліпопротеїнів високої щільності у сироватці крові щурів .....	34

2.11. Визначення триптофан-гідроксилазної активності в гомогенаті мозку щурів.....	35
2.12. Визначення вмісту 5-гідрокситриптофану в гомогенаті мозку щурів.....	35
2.13. Визначення триптофан-декарбоксілазної активності в гомогенаті мозку щурів .....	36
2.14. Визначення вмісту серотоніну в гомогенаті мозку .....	36
2.15. Вимірювання моноаміноксигеназної активності в гомогенаті мозку щурів.....	37
2.16. Визначення активності індоламін 2,3-діоксигенази в гомогенаті мозку щурів.....	37
2.17. Визначення концентрацій амінокислот із розгалуженим бічним радикалом у сироватці крові щурів.....	38
2.18. Визначення концентрацій про- і протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів .....	38
2.19. Визначення концентрацій білка у сироватці крові щурів.....	39
2.20. Отримання та культивування перитонеальних макрофагів щурів	39
2.21. Визначення продукції NO перитонеальними макрофагами щурів .....	40
2.22. Визначення аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів.....	40
2.23. Визначення рівню кисень-залежного метаболізму перитонеальних макрофагів щурів.....	41
2.24. Статистична обробка результатів.....	42
РОЗДІЛ 3 .....	43
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	43

3.1. Вплив довготривалого введення прогестерону на органометричні параметри щурів та їх харчову поведінку .....	44
3.2. Показники ліпідного обміну за умов прогестерон-індукованого ожиріння.....	54
3.3. Стан системи обміну серотоніну у мозку щурів при введенні прогестерону та рівень амінокислот з розгалуженими бічними ланцюгами у сироватці крові щурів .....	56
3.4. Показники запалення у щурів з прогестерон-індукованим ожирінням .....	67
РОЗДІЛ 4.....	81
ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА ОСНОВНІ ОРГАНОМЕТРИЧНІ, БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДОВГОТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ПРОГЕСТЕРОНУ .....	81
4.1. Вплив меланіну на соматометричні показники щурів із ожирінням, яке викликане довготривалим введенням прогестерону.....	82
4.2. Вплив меланіну на харчову поведінку та обмін серотоніну у головному мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону ..	87
4.3. Вплив меланіну на показники запалення у щурів при прогестерон-індукованому ожирінні.....	93
ЗАКЛЮЧЕННЯ.....	108
ВИСНОВКИ.....	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	120

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

5-НТ — серотонін

5-НТР — 5-гідрокситриптофан

5-НІАА — 5-гідроксиіндолоцтова кислота

ВСАА — амінокислоти з розгалуженим ланцюгом

СЕТР — білок-переносник ефіру холестеролу

ІFN — інтерферон

ІL — інтерлейкін

LAT — транспортер великих нейтральних амінокислот

ВКД — висококалорійна дієта

ІДО — індоламін 2,3-диоксигеназа

ІМТ — індекс маси тіла

МАО — моноаміноксидаза

ТрГ — триптофангідроксилаза

ТрД — триптофандекарбоксилаза

ЛПВЩ — ліпопротеїни високої щільності

ЛПДНЩ — ліпопротеїни дуже низької щільності

ЛПНЩ — ліпопротеїни низької щільності

RPMI — Roswell Park Memorial Institute medium, середовище для культивування культур клітин

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Згідно статистики Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВОЗ) у світі існує глобальна епідемія ожиріння. Наявність ожиріння супроводжується важкими побічними захворюваннями такими, як діабет 2 типу, метаболічний синдром, хвороби серцево-судинної системи та розвитком раку стравоходу, підшлункової залози, товстої та прямої кишки, молочної залози, ендометрію, нирок та жовчного міхура [1, 2].

Основними причинами розвитку ожиріння є надмірне споживання їжі, недостатність фізичної активності, гормональні порушення, наявність пухлин [3]. Біохімічні механізми розвитку ожиріння, викликаного дією жіночого статевого гормону прогестерону, який використовується для контрацепції та гормон-замісної терапії, є мало вивченими. Відомо, що нейроактивний стероїд прогестерон може впливати на кількість спожитої їжі [4]. У попередніх дослідженнях було показано вплив змін у рівнях жіночих статевих гормонів (прогестерону та естрогену) під час менструального циклу на харчову поведінку [5]. Відомо, що прогестерон, який потрапляє в жіночий організм штучно, призводить до ефекту накопичення жиру [6]. Незважаючи на велику кількість даних, отриманих на різних моделях ожиріння, механізми розвитку ожиріння, викликаного прогестероном, досі залишають мало вивченими.

Актуальним є детальне вивчення механізмів дії прогестерону на порушення, які виникають при ожирінні. Ожиріння є причиною прогресуючих порушень метаболізму та функціонування серця. Збільшені депо жирової тканини вивільняють більше вільних жирних кислот, що збільшує кількість інсуліну, зменшує чутливість до серотоніну та збільшує продукцію ліпопротеїнів дуже низької щільності гепатоцитами [7]. Проте сучасні дослідження вказують, по перше, на те, що жирова тканина є динамічним органом, який різними шляхами підтримує свій гомеостаз, по друге, що ожиріння призводить до дисфункції жирової тканини та патофізіології всього організму. Ці патофізіологічні процеси опосередковані як із вільними

жирними кислотами і з іншими метаболітами жирової тканини, так і з сигнальними молекулами, що продукують адипоцити – адипокінами, які мають локальну (паракринну) так і ендокринну регуляторну функцію [8]. Крім того, гіпертрофія адипоцитів залучає макрофаги до жирової тканини, які виробляють прозапальні цитокіни та адипокіни, викликаючи запалення [9, 10].

Більшість способів лікування ожиріння усувають наслідки, а не причини цього захворювання. Тому актуальним на сьогодні є дослідження нових перспективних шляхів та методів корекції надмірної ваги та різноманітних ускладнень, які виникають за умов ожиріння, дослідження ефективності різних експериментальних моделей ожиріння. Ожиріння, яке виникає під час розладів ендокринної системи потребує особливих методів лікування. Оскільки, такі види ожиріння виникають не тільки унаслідок надмірного споживання висококалорійної їжі, малорухливого способу життя то цей стан неможливо вилікувати лише застосуванням дієтотерапії та зміною фізичної активності хворих.

Меланін, який виявляє антиоксидантні властивості, привертає особливу увагу, як перспективний інструмент для зменшення окисного стресу і тому може застосовуватись, як препарат при лікуванні ожиріння [11]. Останнім часом спостерігається великий інтерес до вивчення сприятливого впливу поліфенолів, які здатні запобігати розвитку ожиріння та хронічних порушень, пов'язаних з ожирінням. Поліфенолвмісні екстракти зеленого, чорного чаю та чаю улун зменшують рівень запальних процесів у мишей із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою, і зменшують кількість вісцерального жиру [12, 13]. Дослідження впливу меланіну на інші патології показали, що він володіє антиоксидантними, цитопротекторними та стреспротекторними властивостями [14, 15].

Дослідження механізмів впливу прогестерону на розвиток ожиріння дозволить детальніше вивчити основні мішені для терапії цього стану. Так як, меланін є речовиною, яка синтезується людським організмом, має структурні

аналоги з доведеними сприятливими властивостями (ресвератол, катехіни, куркумін), він є дуже перспективним засобом для лікування ожиріння.

**Мета і задачі дослідження.** Метою даної роботи було оцінити біохімічні та імунологічні показники в організмі експериментальних тварин за прогестерон-індукованого ожиріння.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити вплив довготривалого введення прогестерону на органометричні параметри (масу тіла, індекс маси тіла (ІМТ), кількість вісцеральної жирової тканини) та харчову поведінку піддослідних тварин.

2. Вивчити основні показники ліпідного обміну у сироватці крові щурів на моделі прогестерон-індукованого ожиріння.

3. З'ясувати стан системи обміну серотоніну у мозку щурів при введенні прогестерону та виявити її зв'язок із рівнем амінокислот з розгалуженими бічними ланцюгами сироватці крові.

4. Дослідити вплив прогестерону на показники запалення у щурів, такі як рівні прозапальних (IL-1 та IFN- $\gamma$ ) і протизапальних (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) цитокінів та маркери поляризації перитонеальних макрофагів (продукцію NO, рівень АФК й активність аргінази).

5. Вивчити вплив меланіну з дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X1 на вказані вище показники у щурів при його сумісному введенні з прогестероном для виявлення його можливого ефекту як засобу профілактики ожиріння.

Об'єкт дослідження: розвиток ожиріння за умов довготривалого введення прогестерону.

Предмет дослідження: ключові органометричні, біохімічні та імунологічні параметри за умов довготривалого введення прогестерону.

*Методи дослідження:* хроматографічні (визначення концентрацій амінокислот сироватки крові), імуноферментний аналіз (вміст інтерлейкінів), колориметричні (НСТ тест для визначення продукції активних форм кисню перитонеальними макрофагами, аргіназна активність, продукція NO), спектрофотометричні (вміст ліпідів, стан системи обміну серотоніну) та статистичні методи досліджень.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Досліджено та показано вплив жіночого статевого гормону прогестерону на основні метаболічні процеси, що призводять до розвитку ожиріння. Вперше було показано, що прогестерон впливає на шлях обміну серотоніну у головному мозку щурів, який відповідає за харчову поведінку та відповідно на розвиток ожиріння. Показано, що при довготривалому введенні прогестерону порушується баланс ліпідів у сироватці крові щурів, що є свідченням впливу прогестерону на ліпідний обмін. Детально досліджено вплив прогестерону на розвиток хронічного запалення у жировій тканині, про що свідчить поляризація макрофагів по прозапальному M1 типу. Вперше показано, що довготривале введення прогестерону щурам сприяє розвитку системного запального процесу, що проявляється у підвищенні рівня прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- $\gamma$ ) та зниженні рівню протизапальних (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) у сироватці крові щурів. Досліджено вплив меланіну на біохімічні та імунологічні процеси, які зазнають порушень при прогестерон-індукованому ожирінні у щурів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати розкривають біохімічні та імунологічні процеси, які порушуються при ожирінні гормонально генезу. Комплексне вивчення механізмів розвитку ожиріння індукованого введенням прогестерону дозволить визначити основні мішені при профілактиці та лікуванні даних порушень.

Встановлено, що меланін перешкоджає розвитку ожиріння у щурів при сумісному введенні з прогестероном, нормалізуючи органометричні

параметри, усуваючи дисліпідемію та нормалізуючи вміст серотоніну в головному мозку, а також проявляючи протизапальні властивості через усунення дисбалансу між рівнями про- і протизапальних цитокінів та запобігаючи поляризації перитонеальних макрофагів за M1 типом. Меланін може бути перспективним потенційним засобом для профілактики прогестерон-індукованого ожиріння.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертантом особисто проведено пошук та аналіз літературних джерел, виконано експериментальні дослідження, оброблено та теоретично обґрунтовано отримані результати досліджень, сформульовано висновки та підготовлено матеріали для публікацій.

Вибір теми дисертаційної роботи, планування досліджень та інтерпретація отриманих результатів здійснено спільно з науковим керівником.

Автор висловлює глибоку вдячність к.б.н. Конопельнюк В.В. та к.б.н. Компанець І.В. за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи представлена в спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Результати дисертації було представлено на вітчизняних та міжнародних конференціях: «Біологічні дослідження» (Житомир, 2016), «Рівень ефективності та необхідність впливу медичної науки на розвиток медичної практики» (Київ, 2016), XII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016), «Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century» (Kyiv, 2018), FEBS 3+ meeting - XI Parnas Conference «Young scientists forum biochemistry and molecular biology for innovative medicine» (Kyiv, 2018), «Modern aspects of biochemistry and biotechnology-2019» (Kyiv, 2019).

**Публікації.** За темою дисертації було опубліковано 11 наукових праць, з яких: 5 статей у наукових фахових виданнях, з яких 2 статті у наукових

виданнях інших держав, що індексуються наукометричними базами даних. А також 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

*Статті у наукових фахових виданнях*

1. Александров АВ., Конопельнюк ВВ., Остапченко ЛІ. Peripheral serotonin and tryptophan levels in rats under progesterone long-term administration. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 1(20): 5-7.

2. Aleksandrov AV., Konopelniuk VV., Ishchuk TV., Ostapchenko LI. Body weight gain under long-term progesterone administration. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2016;7(6): 2429-2435.

3. Александров АВ., Конопельнюк ВВ., Іщук ТВ., Скопенко ОВ., Остапченко ЛІ. Amino acids level in rats under long-term progesterone administration. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 75-78.

4. Александров АВ., Конопельнюк ВВ., Компанець ІВ., Остапченко ЛІ. Шлях біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів за умов експериментального ожиріння викликаного довготривалим введенням прогестерону. Вісник КНУ імені Тараса Шевченка, Серія: Біологія. 2018; 1(75): 59-63.

5. Aleksandrov AV., Konopelniuk VV., Scopenko OV., Ostapchenko LI. Serum amino acids levels in rats under progesterone long-term administration and melanin treatment. Experimental and clinical physiology and biochemistry. 2018; 4(84): 5-11.

*Тези доповідей*

1. Александров А.В. Вплив довготривалого введення прогестерону на вміст серотоніну та триптофану у сироватці крові щурів / Александров А.В., Конопельнюк В.В., Остапченко Л.І. // Рівень ефективності та необхідність

впливу медичної науки на розвиток медичної практики, 4-5 березня 2016р.: матер. конфер. – Київ, 2016. – С. 6-8.

2. Александров А.В. Основні біохімічні показники сироватки крові щурів при тривалому введенні прогестерону / Александров А.В., Конопельнюк В.В., Остапченко Л.І. // Молодь і поступ біології –XII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, 19-21 квітня 2016 р.: матер. конфер. – Львів, 2016. – С. 19.

3. Aleksandrov A.V. Serum amino acids levels in rats under progesterone long-term administration and melanin treatment / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Ostapchenko L.I. // Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів, 27-28 квітня 2018 р.: матер. конфер. – Львів, 2018. – С. 83-85.

4. Aleksandrov A.V. The of effect melanin on proinflammatory status of peritoneal macrophages of rats with progesterone-induced obesity / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Kompanets I.V., Goloborodko Ie.Ie., Svyatetska V.M., Molozhavaya O.S., Ostapchenko L.I. // Microbiology and immunology – the development outlook in the 21st century Taras Shevchenko National University of Kyiv. 19-20 квітня 2018.: матер.конфер. – Київ, 2018. – С. 122-123.

5. Aleksandrov A.V. The effects of melanin on the level of pro- and anti-inflammatory cytokines in serum of rats with progesterone-induced obesity / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Kompanets I.V., Goloborodko Ie.Ie., Ostapchenko L. I. // FEBS 3+ Meeting - XI Parnas Conference – Young Scientists Forum. Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine. 3-5 вересня 2018р.: матер.конфер. – Київ, 2018. – С. 100.

6. Aleksandrov A.V. Serotonine pathway in rat brains under long-term progesterone administration / Aleksandrov A.V., Konopelniuk V.V., Kompanets I.V, Ostapchenko L.I. // Modern aspects of biochemistry and biotechnology – 2019.

Palladin Institute of Biochemistry. 21-22 березня 2019р.: Ukr. Biochem. J. 91(2) – Київ, 2019. – С. 70.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 141 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел (182 найменувань), містить 2 таблиці та 39 рисунків.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### РОЗДІЛ 1

#### 1.1 Загальна характеристика проблеми ожиріння та супутніх хвороб

Ожиріння - це хвороба при якій в організмі накопичується надмірна кількість жиру. Ожиріння завдає великої шкоди здоров'ю людини. Люди з важкими формами ожиріння частіше мають супутні захворювання ніж люди із відповідною зросту вагою. Прикладами таких захворювань є цукровий діабет 2 типу, високий кров'яний тиск, деякі види раку та ін. У поєднанні з ожирінням ці захворювання можуть призвести до зниження якості здоров'я. У деяких випадках це може призвести до втрати працездатності або ранньої смерті.

Наявність ожиріння найбільше впливає на розвиток діабету 2 типу. У дослідженні 114 000 жінок середнього віку протягом 14 років, ризик розвитку діабету був у 93 рази вищим серед жінок, які мали індекс маси тіла (ІМТ) 35 або вище на початку дослідження, порівняно з жінками з ІМТ нижче 22 [16]. З приводу чоловіків було показано подібну тенденцію [17]. Однак, втрата ваги може скоротити деякі ризики, пов'язані з ожирінням [18]. При зменшенні маси тіла на 5-10% може зменшити показники кров'яного тиску, ліпопротеїнів низької щільності холестеролу, тригліцеридів і зменшення ризику виникнення хвороб серцево-судинної системи [19].

Жирові клітини, особливо в області талії, продукують гормони та інші речовини, що викликають запалення. Хоча запалення є невід'ємним компонентом імунної системи та частиною процесу загоєння, неналежне запалення викликає цілий ряд проблем зі здоров'ям. Запалення може зробити організм менш чутливим до інсуліну і змінити спосіб, у який організм метаболізує жири і вуглеводи, що призводить до підвищення рівня цукру в крові і, зрештою, до діабету та його багатьох ускладнень. Кілька великих

досліджень показали, що помірне зниження ваги може запобігти або затримати початок діабету у людей з високим ризиком[20–22].

Маса тіла безпосередньо впливає на ризик виникнення серцево-судинних захворювань. Паралельно із збільшенням Індексу маси тіла, збільшується кров'яний тиск, концентрація ліпопротеїнів низької щільності(LDL – low density lipoproteins), холестеролу, тригліцеридів, глюкози в крові та запалення. Ці зміни призводять до збільшення ризику виникнення ішемічної хвороби серця, інсульту та інфаркту [23, 24].

Попередні дослідження, показали, що існують переконливі докази асоціації між наявністю ожиріння та розвитком раку стравоходу, підшлункової залози, товстої та прямої кишки, молочної залози, ендометрію, нирок та жовчного міхура . Також було показано, що жінки з надмірною вагою, які ніколи не проходили гормон-замісну терапію, втрачають та утримують нормальну вагу після менопаузи, зменшують ризик виникнення пухлин на 50% [16].

Розвиток ожиріння може бути обумовлений не тільки низькою фізичною активністю та надмірним, несбалансованим харчуванням, але і поєднуватися із спадковою схильністю до інсулінорезистентності, розвитком порушення толерантності до глюкози та порушенням функціонування гормональної системи організму [25].

По всьому світі тяжкі форми ожиріння більш притаманні для жінок ніж чоловіків. Крім того, патофізіологія ожиріння та хвороб, що є наслідками ожиріння відрізняється у чоловіків та у жінок. Механізми цих відмінностей залишаються не до кінця зрозумілими, але відомо важливу роль у цих процесах відіграються статеві гормони [26].

Основним підходом при лікуванні ожиріння є зменшення маси тіла пацієнта. Такий результат може бути досягнуто за допомогою змін у харчуванні і фізичних вправ, застосуванню фармакологічних препаратів, або

хірургічним шляхом. Тим не менше, кожен з цих методів має свої недоліки. Наприклад, більшість з пацієнтів не здатні тривалий час дотримуватися суворої дієти, яка позбавляє їх від можливості вживати улюблену їжу. Також після припинення терапії ожиріння у пацієнтів спостерігається повернення маси до вихідних, і більших значень.

## **1.2 Основні аспекти та вплив статевих гормонів на функціонування жирової тканини**

Застосування лікарських засобів на основі стероїдних гормонів, зокрема прогестерону, може бути одним із численних факторів, що сприяють розвитку ожиріння. Згідно з літературними даними, існує взаємозв'язок між надлишком прогестерону та порушенням харчової поведінки. Відомо, що прогестерон, який потрапляє в жіночий організм штучно, призводить до ефекту накопичення жиру [6].

Більшість способів лікування ожиріння усувають наслідки, а не причини цього захворювання. Тому актуальним на сьогодні є дослідження нових перспективних шляхів та методів корекції надмірної ваги та різноманітних ускладнень, які виникають за умов ожиріння, дослідження ефективності різних експериментальних моделей ожиріння.

Для вивчення патогенезу ожиріння використовують дієт-індуковані моделі цього стану у тварин, що моделюють розвиток ожиріння у людей внаслідок надмірного споживання калорій. Короткий репродуктивний цикл гризунів (21 день вагітності), їх висока народжуваність, невеликий розмір роблять їх зручними для використання в експерименті. Використання різних моделей дає можливість детально керувати раціоном харчування та фізичною активністю тварин і проводити різні типи досліджень.

За даними літератури основними висококалорійними дієтами, які використовуються для вивчення ожиріння у щурів, є дієти з високим вмістом вуглеводів, дієти з високим вмістом жирів та дієти, що поєднують високий

вміст вуглеводів та жирів. Основними дієтами з високим вмістом вуглеводів є сахарозо-індуковані(використовують  $\geq 30\%$  розчин сахарози) та фруктозо-індуковані моделі(використовують  $\geq 50-70\%$  розчини фруктози) [27]. Дієти, що включають високу концентрацію фруктози та сахарози призводять до розвитку інсулінорезистентності, гіперглікемії, гіперінсулінемії, гіперурікемії, гіпертензії, порушення толерантності до вуглеводів і дисліпідемії [28].

Дієти із високим вмістом жирів розділяють на декілька типів:

1. З низьким вмістом жирів. Дієти, в яких вміст жирів складає 10-30% загальної калорійності дієти (LFD – low fat diet);
2. З високим вмістом жирів. Дієти, в яких жири складають 30-50% від загальної кількості калорій (HFD – high fat diet) ;
3. З дуже високим вмістом жирів. Дієти, в яких споживання жирів перевищує 50 % її калорійності(VHFD – very high fat diet).

Висококалорійні дієти із високим вмістом жирів використовують для моделювання ожиріння із подібною симптоматикою, як у людей. При цьому у експериментальних тварин розвивається гіпертрофія та інфільтрація жировою тканиною внутрішніх органів, спостерігається розвиток резистентності до інсуліну та порушення толерантності до глюкози. Дані моделі легко відтворюються і водночас дають змогу проаналізувати зв'язок між кількістю споживаних жирів, масою тіла та розвитком супутніх ожирінню патологій [29].

Отримана із їжею енергія накопичується і зберігається у формі внутрішньоклітинних краплинок насичених триацилгліцеролом в середині адипоцитів. Попередниками адипоцитів є плюрипотентні клітини, що можуть перетворюватися в білі або бурі адипоцити, макрофаги або клітини попередники м'язів або кісток [8]. Диференціація утворення адипоцитів із клітин-попередників регулюється інсулін-залежним фактором росту,

глюкокортикоїдами та іншими факторами росту та гормонами [30]. Хоча роль статевих гормонів у цих процесах залишається незрозумілою, важлива роль естрогенів була визначена через ефект ендокринних руйнівників естрогенів, таких як бісфенол, що порушує нормальну диференціацію попередників адипоцитів *in vitro* та через їх зв'язок із ожирінням [31, 32].

У традиційному розумінні жирова тканина є пасивним запасуючим депо. Запасання у жировій тканині є насправді довготривалим. Час зберігання окремої молекули триацилгліцеролу у підшкірній жировій тканині здорової людини триває 1,6 року, що є найбільшим показником серед усіх метаболітів енергії [33]. Проте сучасні дослідження вказують, по перше, на те, що жирова тканина є динамічним органом, який різними шляхами підтримує свій гомеостаз, по друге, що ожиріння призводить до дисфункції жирової тканини та патофізіології всього організму. Ці патофізіологічні процеси опосередковані як із вільними жирними кислотами і з іншими метаболітами жирової тканини, так і з сигнальними молекулами, що продукують адипоцити – адипокінами, які мають локальну(паракринну) так і ендокринну регуляторну функцію [34, 35]. Крім того, ендотеліальні та імунні клітини, що знаходяться у жировій тканині також виробляють сигнальні молекули.

За місцем локалізації жирову тканину класифікують на 5 типів:

1) Підшкірна жирова тканина може знаходитись від голови до п'ят. Підшкірна жирова тканинна включає поверхневий та глибокий шар, що розділений фасцією (Scarpa's fascia). Найбільша кількість знаходиться абдомінально та в області сідниць та стегон. Шари підшкірної жирової тканини регулюються по різному.

2) Вісцеральна, або внутрішньочеревна жирова тканина прикріплює полові органи та кишечник до задньої стінки живота. Це депо жиру містить багато лімфатичних вузлів та особливо схильне до інфільтрації макрофагами під час гіпертрофії [34, 35].

3) Ретроперітоніальне та тазове жирове депо класифікують в одну категорію із вісцеральною жировою тканиною.

4) Внутрішньо- та зовнішньо-перикардіальний жир зустрічають навколо серця і великих судин.

5) Внутрішньо- м'язовий жир знаходиться між волокнами м'язів.

Надмірну кількість вісцерального жиру у більшій мірі пов'язують із найбільшим ступенем погіршенням здоров'я, тоді як інші типи жиру меншою мірою шкідливо впливають на здоров'я чи мають захисний ефект [36].

Існує різниця у балансі засвоєння та від'єднання вільних жирних кислот від триацилгліцеридів між різними типами жирової тканини у жінок [35]. Засвоєння жирних кислот та синтез триацилгліцеридів більший, а рівень ліполізу менший в сіднично-стегновій жировій тканині ніж в черевній підшкірній жировій тканині. Це в свою чергу призводить до збільшення розмірів сіднично-стегнової жирової тканини. Ці відмінності спричиненні взаємодією специфічних генів та жіночими статевими гормонами. У попередніх дослідженнях [37]. було показано, що із 284 генів що експресуються відмінно в сіднично-стегновій жировій тканині від черевної підшкірної жирової тканини у людей із надмірною вагою (ІМТ>27), 157 відмінно експресувались тільки у жінок. Багато із цих генів належало до родини NOX, що залучені у процеси диференціації клітин. Відповідно до цих даних, виникла гіпотеза, що збільшення рівнів жіночих статевих гормонів під час статевого дозрівання диференційовано активує NOX-гени, що призводить до різного розподілу жирової тканини в організмі.

Ожиріння є причиною прогресуючих порушень метаболізму та функціонування серця. Збільшені депо жирової тканини вивільняють більше вільних жирних кислот, що збільшує кількість інсуліну, зменшує чутливість до серотоніну та збільшує продукцію ліпопротеїнів дуже низької щільності гепатоцитами. Крім того, гіпертрофія адипоцитів залучає макрофаги до

жирової тканини, які виробляють прозапальні цитокіни та адипокіни, викликаючи запалення. Також при ожирінні порушується васкуляризація судин, що призводить до місцевої гіпоксії та запалення [9, 10].

На ці процеси значно впливають жіночі статеві гормони. Наприклад, у щурів, виключення жіночих статевих гормонів збільшує інфільтрацію жирової тканини імунними клітинами та збільшує резистентність до інсуліну [38].

Різні типи жирової тканини по різному схильні до патологій викликаних ожирінням. Накопичення центрально-локалізованої жирової тканини, особлива вісцеральної, призводить до найбільших ризиків здоров'ю. Це пов'язано з тим, що у вісцеральну жирову тканину найшвидше потрапляють вільні жирні кислоти та медіатори запалення з печінки. На противагу, підшкірна жирова тканина сідниць та стегон (ЖТС) зменшує порушення метаболізму та функціонування серця. Було показано, що у ЖТС також мають більшу активність ліпопротеїніпази у жінок ніж у чоловіків, що означає що у жінок ЖТС більш ефективно розщеплює триацилгліцериди. Більш того, засвоєння вільних жирних кислот із плазми крові, літогенезис та ре-естерифікація триацилгліцеролів у жінок більша у ЖТС ніж у черевній підшкірній жировій тканині. У чоловіків було досліджено зворотні результати. Разом ці характеристики свідчать про те, що у ЖТС триацилгліцероли більш стабільно зберігаються та ЖТС забезпечує низький рівень вільних жирних кислот.

Незважаючи на значний прогрес у вивченні процесів ожиріння, механізм ожиріння, індукованого введенням прогестерону, залишається не повністю дослідженим. Відомо, що нейроактивний стероїд прогестерон може впливати на кількість спожитої їжі. У попередніх дослідженнях було показано вплив змін у рівнях жіночих статевих гормонів(прогестерону та естрогену) під час менструального циклу на харчування жінок [5].

Препарати із застосуванням прогестерону та похідних прогестерону, таких як медроксипрогестерону ацетат, застосовують у якості засобів контрацепції або у гормонзамістній терапії. Застосування прогестерону та похідних прогестерону також стимулює споживання їжі з супутнім накопиченням жиру [4, 39]. У досліджах на мишах було показано прогестерон-індуковану гіперфагію, що призводить до збільшення ваги [40]. Також прогестерон використовують для моделювання ожиріння у щурів [41].

Тяжкі форми, ожиріння можна вважати системним захворюванням, яке впливає на функціонування всього організму. При ожирінні відбувається накопичення надмірної кількості жирової тканини. Відомо, що жирова тканина не є інертним депо ліпідів, а є тканиною з активним метаболізмом. Адипоцити здатні синтезувати та екскретувати багато речовин, гормони, фактори запалення, в тому числі у кров'яне русло. Виходячи з цього процеси, які відбуваються у жировій тканині, охоплюють і інші тканини.

У попередніх дослідженнях із використанням тваринних моделей прогестерон замісної терапії було показано збільшення активності клітин натуральних кіллерів [42]. Також розвиток ожиріння асоціюється із розвитком системного запалення, а не тільки локального запалення у жировій тканині. Макрофаги, що локалізуються у жировій тканині відіграють ключову роль у розвитку запалення при ожирінні, продукуючи прозапальні молекули (цитокіни TNF- $\alpha$ , IL-6 та реактивні форми кисню) та викликаючи збільшення рівня індукцйбельної NO-синтази [43]. У пацієнтів із ожирінням відбувається інфільтрація макрофагами жирової тканини та кількість макрофагів корелює із розмірами адипоцитів [44, 45]. Було показано, що збільшення розмірів підшкірної жирової тканини в області черева спричиняє збільшення кількості макрофагів до жирової тканини та зсув співвідношення протизапальних M2 макрофагів до прозапальних M1 макрофагів [45].

Різноманітність та пластичність є характерними рисами клітин лінії моноцитів-макрофагів. У відповідь на інтерферон, залучення Toll-подібних

рецепторів чи IL4/IL13 сигнального шляху макрофаги можуть піддаватись M1(класичній) або M2(альтернативній) активації. В даний час досягнуто значного прогресу у розумінні шляхів передачі сигналів, транскрипційних мереж та епігенетичних механізмів, що лежать в основі M1, або M2-подібної поляризації макрофагів. Функціональне зміщення мононуклеарних макрофагів відбувається *in vivo* при фізіологічних умовах(наприклад, онтогенез, вагітність) та у разі виникнення патології(алергічне та хронічне запалення, відновлення тканин, інфекція і рак) [44].

M1 макрофаги залучені у реакції запалення та продукують прозапальні цитокіни, оксид азоту та реактивні форми кисню [44, 46]. На противагу цьому, M2 макрофаги проявляють протизапальні властивості і продукують протизапальні цитокіни та експресують аргіназу [47].

Існують припущення, що накопичення макрофагів у внутрішньочеревній жировій тканині відповідає за збільшення рівнів циркулюючих цитокінів та запалення при ожирінні [48]. Не зважаючи на те, що багато досліджень присвячені дослідженню ролі адипоцитів та моноцитів при ожирінні, перитонеальні макрофаги можуть також бути залучені у розвиток запальних процесів при ожирінні. Раніше не було показано ролі макрофагів у розвитку запалення при ожирінні.

Перитонеальні макрофаги є основними макрофагами у перитонеальному просторі селезінки та приймають участь у розвитку імунної відповіді на інфекції та запалення [49]. Перитонеальні макрофаги, як і всі інші макрофаги селезінки, печінки, головного мозку та легень, походять із клітин-попередників [50]. Зміни у співвідношенні субпопуляцій у перитонеальній порожнині при запаленні призводить до зникнення популяції великих макрофагів та збільшення кількості малих перитонеальних макрофагів. Малі перитонеальні макрофаги продукують медіатори запалення такі як IL-12, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , та RANTES [51–53]. При цьому відбувається залучення запальних моноцитів та вважається, що це покращує здатність макрофагів реагувати на

запальні стимули та приймати участь у відновленні імунного статусу. Секреція прозапальних цитокінів, так як і продукція NO показує, що відбувається поляризація макрофагів у M1 тип [44].

Також, процеси перебудови у жировій тканині пацієнтів з ожирінням, які призводять до загибелі адипоцитів викликають інфільтрацію макрофагів, що викликає розвиток хронічного запалення [54]. Ступінь інфільтрації макрофагів у жирову тканину пропорційна ступеню ожиріння. Залучення макрофагів до процесів у жировій тканині приводить до підвищення рівня циркулюючих цитокінів у кров'яному руслі [55], що свідчить про розвиток системного запалення у відповідь на місцеве запалення у жировій тканині.

Гіпертрофія адипоцитів призводить до порушення кровопостачання жирової тканини та адгезії лейкоцитів до кровоносних судин [54, 56]. Тим не менш, значення кровотоку на одиницю поверхні знижується із розвитком ожиріння, при чому порушується надходження кисню і поживних речовин. Низька васкуляризація призводить до гіпоксії і [57, 58], як наслідок, до хронічно підвищеного оксидативного стресу. Також існують дані, що запальний стан, який розвивається у жировій тканині є наслідком гіпоксії [59].

### **1.3 Будова, класифікація та властивості меланінів**

Антиоксиданти привертають особливу увагу як перспективний інструмент для зменшення окисного стресу і тому можуть бути препаратами при лікуванні ожиріння [60]. Останнім часом спостерігається великий інтерес до вивчення сприятливого впливу поліфенолів, які здатні запобігати розвитку ожиріння та хронічних порушень, пов'язаних з ожирінням. Поліфенолвмісні екстракти зеленого, чорного чаю та чаю улун зменшують рівень запальних процесів у мишей із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою, і зменшують кількість вісцерального жиру [61, 62]. Регулярно споживані поліфеноли, такі як катехіни зеленого чаю, епігалокатехінові галати, ресвератрол з червоного винограду і деяких ягід, а також куркумін із спеції *Curcuma longa* впливають на розвиток ожиріння, знижуючи масу людей і

експериментальних тварин, жирову масу через гальмування ліполізу, зменшує показники запалення та інгібує проліферацію адипоцитів [63–68].

Меланін за будовою належить до ряду молекул поліфенолів. Поліфеноли складаються із різної кількості кілець фенолу із двома чи більше гідроксидними групами у складі, іншими хімічними групами та різним ступенем окиснення [69].

Меланіни – це речовини, похідні індолу, що синтезуються у рослинах, тваринах та мікроорганізмах [70, 71]. Слово «меланін» раніше використовували у випадку будь-якого темного пігменту. Основою структури меланінів є ковалентно зв'язані кільця індолу. Крім того у структурі міститься велика кількість полімерів, які складаються із молекул попередників індолу. Домену індолу взаємодіють один з одним з допомогою ван-дер-Ваальсових взаємодій, але невпорядковане розташування інших складових меланіну обумовлює аморфну структуру багатьох регіонів полімеру.

Найбільш загальна класифікація меланінів, що включає меланіни про- та еукаріот, виділяє три класи цих полімерів:

Еумеланіни (чорні або коричневі) – утворюються шляхом окиснення тирозину (та/або фенілаланіну) до *o*-дигідроксіфенілаланіну (DOPA, ДОФА) та допахінону, які в подальшому циклізуються у 5,6-дигідроксиіндол (DHI) чи 5,6-дигідроксиіндол-2-карбонову кислоту (DHICA). Еумеланіни мають зазвичай тваринне походження, але синтезуються і деякими тканинами рослин [72, 73].

Феомеланіни (жовто-червоні) – характеризуються схожими початковими етапами синтезу з еумеланіном, але до молекули DOPA в подальшому додається амінокислотного залишку цистеїну. Додавання амінокислотного залишку цистеїну може відбуватися прямо, або за участю молекули глутатіону. Кінцевий продукт цієї реакції, цистеїніл DOPA, в

подальшому полімеризується в різноманітні похідні бензотіазину. Феомеланіни виявленні у волоссі та пір'ї [74, 75].

Аломеланіни – мають найбільш гетерогенну структуру, що утворюється шляхом окиснення/полімеризації молекул ди- та тетрагідроксинафталену (DHN) з утворенням великої кількості забарвлених полімерів DHN-меланінів, піомеланіну,  $\gamma$ -глутамініл-1,4-гідроксибензену, катехолів, таких як 4-гідроксифенілоцтова кислота. Аломеланіни – це пігменти вищих рослин [76–80].

У зовнішніх покриттях тіла меланіни зазвичай наявні у специфічних клітинах, відомих як меланоцити. В середині цих клітин меланіни можуть бути локалізовані в специфічних органелах меланосомах та в асоціації з білками у вигляді гранул [81].

Так як в утворенні молекули меланінів приймають участь різні по будові мономери без чіткої послідовності їх чергування, структура меланінів є досить складною та різноманітною. Тим не менше при дослідженні складу меланінів різних груп було показано, що меланіни тварин мають у своєму складі азот, а рослинні меланіни, або фітомеланіни, або взагалі не мають у своїй структурі атомів азоту, або мають у невеликих кількостях. В меланінах тварин вміст азоту варіює у межах 5-8%, тоді як у фітомеланінах складає 0,3-0,7% або його взагалі немає.

Меланін володіє багатьма властивостями, найбільш помітною з яких є поглинання широкого спектру світла за рахунок високої кількості зв'язків у структурі меланіну. Темний колір меланіну обумовлений тим, що він здатен поглинати більшу кількість світла видимого спектру, включаючи радіацію з малою квантовою енергією. Більша кількість енергії видимого спектру, що поглинається перетворюється в теплову енергію за допомогою спарювання фотонів. Меланіни із великою кількістю хінонів індолу(еумалінін) стають більш темними за рахунок високої здатності до поглинання в червоній частині

спектру. Ступінь забарвлення молекул меланіну обумовлена кількістю карбонільних груп( а саме подвійними зв'язками між вуглецем та киснем). Меланіни з меншою кількістю карбонільних груп блідніші та синтезуються переважно жовтими або червоними, як у випадку із феомеланіном. Найбільшу здатність поглинати світло проявляє червоний меланін, що містить високу кількість сірки у формі тіазолів.

Меланіни можуть приймати участь в окисно-відновних реакціях із перенесенням одного чи двох електронів. Одним із ефектів поглинання світла є фотоокиснення пігменту, що зі зміною вмісту карбонільних груп, змінює поглинаючі властивості меланіну. Під час реакції фотоокиснення утворюються супероксид радикали [82].

Меланіни також мають високу здатність до зв'язування катіонів за рахунок наявності аніонних властивостей у карбоксильних та депротонованих гідроксильних груп.

Біосинтез меланіну у тварин починається з окиснення амінокислоти L-тирозину до допахінону за участю ферменту тирозинази. Подальші кроки пов'язані з диспропорцією допахінону, що тягне за собою спонтанну циклізацію з утворенням індолен-2-карбонової кислоти-5,6-хінону (допахром), з подальшою таутомеризацією, що каталізується білком, пов'язаним з тирозиназою (TRP-2) – яка називається допахром таутомераза, і подальше окиснення з отриманням 5,6-дигідроксиліндол-3-карбоновою кислотою (каталізується іншим білком, пов'язаним з тирозиназою, TRP-1). В хребетних ці реакції відбуваються на спеціалізованих органелах, пов'язаних із мембраною, меланосомах [83].

Меланосоми містять ферменти, що знаходяться під контролем промотеру тирозинази. Промотер тирозинази активується тільки в спеціалізованих клітинах у яких відбувається меланогенез, до яких

відноситься пігментний епітелій сітківки ока та нервові дендритні клітини – меланоцити [84].

Меланоцити широко розповсюджені по всьому організму та відповідальні за пігментацію поверхневих структур. У ссавців гранули меланіну потрапляють у волосся та епідерміс за допомогою процесу, що має назву цитокриновий транспорт, при якому частина цитоплазми меланоцитів (відростки дендритів), потрапляє шляхом ендоцитозу в епітеліальні клітини [85].

Меланін проявляє механічну жорсткість та може захищати протеїни від деградації. Меланізація стручків у рослин та кутикул комах призводить до збільшення жорсткості (наприклад при пошкодженні фруктів відбувається зміна кольору місць пошкодження на коричневий, як у плодів банану) [86].

Продукція ортохінонів могла мати еволюційне значення через їх реакційну здатність, особливо через їх тіольні (-SH) та аміногрупи (-NH<sub>2</sub>), що надають їм потенційні антимікробні властивості. Прикладами цього є імунна система комах, чорнила цефалоподів та захисні виділення комах.

Світлорозсіювання та поглинання меланіном використовується в есеронуванні фоторецепторами та приймає участь у терморегуляції плазунів. Пігментація шкіри також часто використовується як засіб камуфляжу. У людей меланін є фотозахисним пігментом. Знаходячись у шкірі меланін захищає генетичний матеріал клітин від ультрафіолетових променів.

Меланін має хемопротекторну функцію через його здатність зв'язувати вільні радикали або потенційно токсичні катіони металів.

Показано, що завдяки стабільному вільнорадикальному стану і здатності до оберненого окислювально-відновного потенціалу меланіни забезпечують захист організму в екстремальних умовах, за яких в клітині утворюються активні вільні радикали, що потенційно здатні порушувати процеси її нормального функціонування [87].

Показано, що меланін, продуцентом якого є дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* (штам X1-M), які були висіяні з вертикальних скель острова Галіндез Аргентинського архіпелагу (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»), має цитотоксичні, антистресові, дерматотропні, антиоксидантні та інші властивості [88]. Пошук потенційних методів лікування для запобігання розвитку ожиріння та пригнічення запальних процесів у жировій тканині залишається надзвичайно актуальним. У зв'язку з цим, особливу увагу привертає пігмент меланін, який синтезується у антарктичних чорних дріжджах *Nadsoniella nigra* штаму X-1, завдяки його антиоксидантним, антистресовим, протизапальним та протигрибковим властивостям [89–91]. Також, було показано роль меланіну у пригніченні розвитку пухлин [92].

Широкий спектр досліджень свідчить, що використання препаратів, що містять поліфеноли зменшує рівень запалення при багатьох захворюваннях. Було показано, що багата на поліфеноли фракція, отримана із ягід столового винограду, пригнічує експресію ряду генів, що відповідають за запалення, зменшує ступінь ожиріння, резистентність до інсуліну та відновлює мікробіоту кишечника у мишей, що страждають на ожиріння викликане висококалорійною дієтою [93]. Також екстракт поліфенолів, отриманих із зеленого, чорного та чаю улун, зменшує кількість вісцерального жиру та проявляє протизапальний ефект [62]. Ефект поліфенолів чорного чаю для запобігання ожиріння також був показаний у людей із дієт-індукованим ожирінням [61].

Зважаючи на представлені дослідження, меланін може проявляти сприятливий вплив при ожирінні, що викликане довготривалим введенням прогестерону. Потрібні більш детальні дослідження для ідентифікації молекулярних сигнальних шляхів, які пояснювали б розвиток ожиріння, що викликане довготривалим введенням прогестерону. Виявлення ефекту

меланіну на розвиток запалення було б надзвичайно корисним для затвердження нового засобу терапії та профілактики ожиріння.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Реактиви та матеріали

В роботі були використані наступні реактиви та матеріали: прогестерон (“Біофарма”, Україна), стандартні набори для визначення ліпідів та ліпопротеїнів (“PLIVA-Lachema Diagnostika”), каталаза, бичачий сироватковий альбумін, (“Sigma-Aldrich”, США); специфічні антитіла до цитокінів IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  (“Sigma-Aldrich”, США), вторинні антитіла (“Sigma-Aldrich”, США), середовище RPMI 1640 (“Sigma-Aldrich”, США), гентаміцин (“Sigma-Aldrich”, США),  $\alpha$ -іонітрозопропіофенон ( $\alpha$ -ISPP) (Sigma-Aldrich, США), зимозан А (“Sigma-Aldrich”, США), диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma-Aldrich, США).

Решта хімічних реактивів (солі, кислоти, луги) були вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче ч.д.а.

#### 2.2. Обладнання

Лабораторне пластикове обладнання (мікропланшети для імуноферментного аналізу, еппендорфи) виробництва фірми Nest Biotech Co., Ltd, Китай.

Скляне лабораторне обладнання, включаючи обладнання для об’ємних вимірів (колби, стакани, пробірки, циліндри і т.ін.) та фільтрувальні системи виробництва Kimax і Wheaton, США.

Для визначення вмісту серотоніну використовували спектрофлуорофотометр виробництва фірми Amersham Biosciences. У роботі використовували хроматограф Bio Logic LP та спектрофотометр Smart Spec

Plus виробництва фірми Bio Rad, США, спектофлуориметр для мікропланшетів BioTek Instruments, виробництва фірми BioTek.

Інше лабораторне обладнання (магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати, шейкери та інше) відповідає стандартам ISO 2001.

### **2.3. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин**

Експериментальні роботи з щурами проводили у віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію з дотриманням міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986).

### **2.4. Умови проведення експерименту**

Тварини були розділені на 3 групи: 1 група – інтактні тварини (контроль); 2 група «Прогестерон», яким щоденно вводили розчин прогестерону шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій упродовж 28 діб у дозі 10 мг/кг ваги та 3 група «Прогестерон+меланін», яким щоденно вводили розчин прогестерону шляхом внутрішньом'язових ін'єкцій у дозі 10 мг/кг ваги та розчин меланіну у дозах 1 мг/кг перорально упродовж 28 днів. Як джерело меланіну, у роботі було використано екстракт із дріжджоподібних грибів *Nadsoniella nigra* штаму X1. Вибір дози прогестерону, яку отримували дослідні щури, ґрунтувався на данні попередніх досліджень ефекту нейростероїдів на харчову поведінку, у яких доза прогестерону 10 мг/кг ваги спричиняла

найбільш виражений гіперфагічний ефект у мишей [94] та, відповідно, використовувалась для розвитку експериментальних моделей ожиріння [95, 96]. Протягом експерименту, кожного дня, в однаковий час, відбувалося зважування корму, який залишився після минулої доби, та додавання відомої зваженої кількості корму тваринам. Таким чином шляхом обчислення визначали кількість спожитого за добу корму.

## **2.5. Визначення органомеричних параметрів щурів**

Індекс маси тіла (ІМТ) визначали на першу добу та в подальшому кожні 7 днів проходження експерименту. Індекс маси тіла розраховується за формулою  $ІМТ = \text{маса щурів (г)} / \text{довжину щурів}^2 (\text{см}^2)$ . За довжину тіла щурів приймали показники вимірів довжини тіла від голови до основи хвоста тварин.

Після евтаназування щурів проводили забір та зважування жирової тканини різних типів: абдомінальну підшкірну жирову тканину, вісцеральну жирову тканину та вісцеральну жирову тканину в області сечо-статевої системи (гонадальний жир).

## **2.6. Отримання сироватки крові**

Щурів евтаназували за допомогою двоокису вуглецю. Сироватку крові ссавців отримували з цільної крові. Для відділення фібриногену та інших білків коагуляції, кров залишали при  $37^\circ \text{C}$  на 4 години. Чистою сухою скляною паличкою згусток крові обережно відділяли від стінок пробірки і центрифугували при 2000 g протягом 40 хв. Після чого відбирали супернатант (сироватку) і зберігали при  $-20^\circ \text{C}$ .

## **2.7. Визначення концентрацій тригліцеридів у сироватці крові щурів**

Концентрації тригліцеридів у сироватці крові вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300. У реакціях використовували стандартні набори для визначення вмісту тригліцеридів виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). У ході визначення тригліцериди проб гідролізують сумішшю бактеріальних ліпаз з подальшим утворенням гліцеролу та жирних кислот. Гліцерол фосфорилується гліцеролкіназою з утворенням гліцеро-3- фосфату, який окисляється молекулярним киснем в присутності гліцерофосфатоксидази, утворенням пероксиду водню та дігідроксиацетонфосфату. Надалі відбувається реакція окисного розщеплення п-хлорофенолу і 4-аміноантипірину, які входять до складу реактивів, що каталізується пероксидазою при наявності пероксиду водню, призводить до утворення хромофору. Оптичну щільність хромофору визначають при довжині хвилі 660/800 нм. Отриманні показники абсорбції світла прямо пропорційні концентраціям тригліцеридів у зразках. Значення перераховували і одиницями вимірювання тригліцеридів є ммоль/л [97].

## **2.8. Визначення концентрацій холестеролу у сироватці крові щурів**

Концентрації холестеролу у сироватці крові щурів визначали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300. У реакціях використовували стандартні набори для визначення вмісту холестеролу виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Наявні у пробах ефіри холестерину гідролізувались холестеринестеразою. Утворений вільний холестерин окислювався холестериноксидазою із утворенням пероксиду водню. У присутності пероксидази пероксид водню, з'єднується з

4-амінантіпіріноміфенолом, з утворенням хромофору. Оптичну щільність хромофору визначають при 540/560 нм, і інтенсивність забарвлення прямо пропорційна концентраціям загального холестеролу в пробі [97].

### **2.9. Визначення концентрацій ліпопротеїнів низької щільності у сироватці крові щурів**

Концентрації ЛПНЩ у сироватці крові щурів вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300. У реакціях використовували стандартні набори для визначення вмісту ЛПНЩ виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Метод визначення базується на тому, що ліпопротеїни, які не належать до ЛПНЩ, розщеплюються холестеринестеразою і холестериноксидазою. Утворений під час цієї реакції перекис водню, розщеплюється каталазою, яка міститься в реактиві R1. При додаванні реактиву R2 відбувається звільнення ЛПНЩ та інактивації каталази азидом натрію. Одиницями вимірювання ЛПНЩ є ммоль/л. Оптичну щільність проб вимірювали на довжині хвилі 600 нм за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300 [97].

### **2.10. Визначення концентрацій ліпопротеїнів високої щільності у сироватці крові щурів**

Концентрації ЛПВЩ у сироватці крові вимірювали спектрофотометричним методом за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300. У реакціях використовували стандартні набори для визначення вмісту ЛПВЩ виробництва "PLIVA-Lachema Diagnostika" (Чехія). Метод визначення базується на тому, що специфічні до бета-ліпопротеїду антитіла (які містяться в реагенті R1) зв'язуються з фракціями ліпопротеїнів, окрім ЛПВЩ. Отримані комплекси антиген-антитіло блокують ферментативну

реакцію, ініційовану додаванням реактиву R2. Оптичну щільність проб вимірювали на довжині хвилі 600 нм за допомогою біохімічного аналізатору Microlab 300 [97].

### **2.11. Визначення триптофан-гідроксилазної активності в гомогенаті мозку щурів**

Отриманий після евтаназування мозок щурів зважували і гомогенізували у 50 мМ Тріс-ацетатному буфері, рН 7,4, із 10% сахарозою, 5 мМ ЕДТА. Проби центрифугували протягом 15 хв при 800 g. Відібраний супернатант повторно центрифугували протягом 30 хв при 12000 g. В подальшому використовували отриманий супернатант.

Інкубаційне середовище складалося з 500 мМ тріс-НСІ, рН 7,4, 20 мМ дитіотріетол, 1 мМ СаСІ<sub>2</sub>, 4 мМ триптофану, 400 U каталази. Реакцію запускали додаванням 20 мкл проби та інкубували при 37<sup>0</sup>С протягом 15 хв. Після чого для осадження білків додавали 160 мкл 6 М НСІО<sub>4</sub> та центрифугували 5 хв при 3000 g. До отриманого супернатанту додавали 0,3 мл 11,6 М НСІ. Оптичну щільність проб вимірювали на довжині хвилі збудження 295 нм та довжині хвилі поглинання 540 нм, проти холостої проби [98].

### **2.12. Визначення вмісту 5-гідрокситриптофану в гомогенаті мозку щурів**

Отриманий після евтаназування мозок щурів зважували та гомогенізували у 0,4 М перхлорній кислоті (при співвідношенні 1:5). Після 60 хв при 4<sup>0</sup> С, отриманий гомогенат центрифугували 5 хв при 800 g за 0<sup>0</sup> С. В подальшому із додавання 2 М КОН вирівнювали рН до показників 5-6 і центрифугували 5 хв при 800 g за 0<sup>0</sup> С. До 2,5 мл 1 н перхлорної кислоти додавали 0,5 мл супернатанту та перемішували впродовж 5 хв і

центрифугували 30 хв при 2000 g. Значення рН отриманого супернатанту доводили до значень 9,5-10,5 із використанням 5 М NaOH. Додавали 2,5 мл насиченим NaCl н-гептонол та змішували протягом 15 хв, після чого центрифугували 3 хв при 500 g. До 1 мл супернатанту додавали 0,3 мл 11,6 М HCl. Оптичну щільність проб вимірювали на довжині хвилі збудження 295 нм та довжині хвилі поглинання 545 нм [99].

### **2.13. Визначення триптофан-декарбоксилазної активності в гомогенаті мозку щурів**

Отриманий після етаназування мозок щурів зважували та гомогенізували у 0,4 М перхлорній кислоті (при співвідношенні 1:5). Після 60 хв при 4<sup>0</sup> С, отриманий гомогенат центрифугували 5 хв при 800 g за 0<sup>0</sup> С. В подальшому із додавання 2 М КОН вирівнювали рН до показників 5-6 і центрифугували 5 хв при 800 g за 0<sup>0</sup> С. До 100 мкл супернатанту додавали 900 мкл 100 мМ тріс-HCl буферу, рН 8,0, що містив 5 мМ β-меркаптоетанол, 10% гліцерол та додавали 2 мл 4 мМ NaOH, 5 мл етилацетату і центрифугували протягом 2 хв при 1000 g. У подальшому визначали пряму флуоресценцію утвореного триптаміну.

Оптичну щільність проб вимірювали на довжині хвилі збудження 280 нм та довжині хвилі поглинання 340 нм [100].

### **2.14. Визначення вмісту серотоніну в гомогенаті мозку**

Для визначення вмісту серотоніну в гомогенаті мозку, гомогенат розморожували, центрифугували за 800g, відбирали надосадову рідину та за допомогою 2 М КОН доводили рН до 5-6. Для відділення серотоніну, супернатант наносили на колонку з КМ-сефарозою врівноважену 0,01 М Na-фосфатним буфером, рН 6,2. Елюцію проводили 0,03М натрій-фосфатним

буфером, рН 6,2. До 1 мл отриманої фракції з серотоніном додавали 0,3 мл 11,6 М НСІ.

Вимірювання серотоніну проводили при довжині хвилі збудження 295 нм та довжині хвилі поглинання 550 нм, проти холостої проби [101].

### **2.15. Вимірювання моноаміноксигеназної активності в гомогенаті мозку щурів**

Визначення моноаміноксигеназної активності (МАО) у мозку проводили за рекомендаціями [102]. Про МАО активність судили за кількістю 4-гідроксиквіноліну, який утворився внаслідок окисного дезамінування субстрату (кінураміну).

Інкубаційне середовище для визначення МАО активності в загальному об'ємі 3 мл містило 0,1 М фосфатний буфер, рН 7,4, 100 мкг кінурамін дигідроброміду. Після додавання гомогенату у об'ємі, еквівалентному 3,13 мг мозку. Проби інкубували при 37<sup>0</sup>С протягом 30 хв при постійному перемішуванні. Реакцію зупиняли додаванням 160 мкл 0,6 М розчину перхлорної кислоти. Для осадження білків проби центрифугували при 900 g протягом 10 хв в охолодженому роторі. До супернатанту об'ємом 1 мл додавали 2 мл 1 н NaOH.

Вміст 4-гідроксиквіноліну вимірювали на спектрофлюорофотометрі при довжині хвилі збудження 315 нм та довжині хвилі поглинання 380 нм, проти холостої проби, яка замість дослідної проби містила дистильовану воду.

### **2.16. Визначення активності індоламін 2,3-диоксигенази в гомогенаті мозку щурів**

Інкубаційне середовище об'ємом 0,2 мл складалося з 100 мМ калій фосфатного буферу, рН 7,5, 5 мМ триптофану, 10 мМ аскорбінової кислоти,

0,2 мМ метиленового блакитного та 50 мкг каталази. Реакцію запускали додаванням гомогенату мозку об'ємом 20 мкл та інкубували протягом 30 хв при 37°C. Для зупинки реакції додавали 20 мкл 10% трихлороцтової кислоти і для осадження білків проби центрифугували 15 хв при 2500 г. До 0,2 мл супернатанту додавали 1 мл 1 М тріс-НСІ, рН 7,0. Оптичну щільність проб вимірювали на довжині хвилі 360 нм, проти холостої проби [103].

### **2.17. Визначення концентрацій амінокислот із розгалуженим бічним радикалом у сироватці крові щурів**

Концентрації амінокислот із розгалуженим бічним радикалом визначали на автоматичному амінокислотному аналізаторі Т-339 (Microtekno, Чехія) методом іонообмінної хроматографії у літій-цитратному буфері в одноколунковому циклі. Метод полягає в розділенні суміші амінокислот на іонообмінній колонці, спираючись на кислотно-основні властивості амінокислот [104].

### **2.18. Визначення концентрацій про- і протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів**

Для визначення концентрацій цитокінів (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) був проведений імуноферментний аналіз ELISA із подальшою колориметричною детекцією за загальною методикою для розчинних білків [105]. Зразки сироватки крові щурів були рознесені на 96-лункову плашку та інкубувалися з відповідними первинними антитілами ("Santa Cruz", США). Після відмивання додавались вторинні антитіла кон'юговані з пероксидазою хріна. У подальшому проводили реакцію з додаванням субстрату фенілєндіаміну та пероксидом водню та визначали рівень абсорбції у кожній

лунці при довжині хвилі 492 нм. Значення виражали у вигляді оптичної щільності, щодо загальних білків, визначених методом Бредфорда.

### **2.19. Визначення концентрацій білка у сироватці крові щурів**

Концентрації білка у сироватці крові щурів визначали за методом Бредфорд [106]. До 20 мкл пробки додавали 10 мкл 10% NaOH, 70 мкл дистильованої води та 2 мл робочого розчину. Робочий розчин містив 6 мл стокового розчину (10 мл 95% етанолу, 20 мл 85%  $H_3PO_4$ , 35 мг кумасі) 3 мл 95% етанолу, 6 мл 85%  $H_3PO_4$ . Кінцевий об'єм робочого розчину доводили дистильованою водою до 100 мл.

Концентрацію білка в пробі визначали шляхом вимірювання оптичної щільності проб при довжині хвилі 595 нм проти контрольної пробки. Кількість білка в пробах визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

### **2.20. Отримання та культивування перитонеальних макрофагів щурів**

Після евтаназування щурів, проводився розтин і звільнення від шкірного покриву в черевній області. В область черевної порожнини за допомогою шприца, обережно, не зачіпаючи внутрішні органи, вводили 10 мл фізіологічного розчину. Протягом 2 хвилин проводили масаж черевної області для вивільнення клітин із перитонеальної порожнини в розчин. Після цього, за допомогою стерильного шприца і голки, забирали з перитонеальної порожнини введений розчин і переносили в стерильні пробірки об'ємом 10 мл та відкручували протягом 10 хвилин при 1500 g. Супернатант видаляли і осад ресуспендували в 1 мл середовища RPMI із додаванням 10% бичачого сироваткового альбуміну та 40 мкг/мл гентаміцину. Кількість клітин підраховували за допомогою гемоцитометра. Клітини розводили до концентрації  $5 \cdot 10^6$  у мл середовища [107].

## **2.21. Визначення продукції NO перитонеальними макрофагами щурів**

Виробництво NO перитонеальними макрофагами аналізували шляхом вимірювання накопичення його стабільних продуктів розпаду, таких як нітрити [108]. Перитонеальні макрофаги культивували у середовищі RPMI 1640 із додаванням 10% бичачого сироваткового альбуміну та 1% гентаміцину протягом 18 годин. Супернатант відбирали, розводили середовищем до концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин, переміщали в стерильну 96-лункову плашку та інкубували протягом 18 годин при  $37^\circ\text{C}$  та 5%  $\text{CO}_2$ .

Наступного дня, поживне середовище із досліджуваних лунок було відібране та було визначено наявність нітритів за допомогою реагенту Гріса. Для приготування реагенту Гріса 0,2% N-1-нафтилетиленадіамін дигідрохлорид змішували з відповідним об'ємом 2% сульфаніламід у розчиненні в 10% ортофосфатній кислоті.

До 100 мкл реагенту Гріса додавали 100 мкл поживного середовища та інкубували в чотирьох повторах у 96-лунковій плашці 30 хв. при кімнатній температурі в темноті. Абсорбція розчину визначалась при довжині хвилі 550 нм за допомогою автоматичного аналізатору (Bio-Rad, США). Рівень нітритів визначався з використанням стандартного калібрувального графіку  $\text{NaNO}_2$ . Вміст NO виражався у ммоль на  $10^6$  клітин [107].

## **2.22. Визначення аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів**

Перитонеальні макрофаги розводили середовищем до концентрації  $2 \cdot 10^5$  клітин, переміщали в стерильну 96-лункову плашку та інкубували протягом 18 годин при  $37^\circ\text{C}$  та 5%  $\text{CO}_2$  [107]. Наступного дня клітини відмивали додаючи 200 мкл фосфатного буферу та лізували за допомогою 100

мкл 0.1% Triton X-100. Для стимулювання аргіназної активності клітин додавали 50 мМ Tris-HCl, 1.0  $\mu$ М MnCl<sub>2</sub> та 0.5 М аргініну, рН 9.7 та інкубували 3 години при 37°C. У якості стандартних розчинів використовували розчини сечовини із концентраціями 7.5, 15, 30, 46, 60 мкг у 100 мкл води. Реакцію зупиняли додаванням 800 мкл суміші кислот, яка містила H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, та H<sub>2</sub>O у співвідношенні 1:3:7. Також 900 мкл цієї суміші додавали до стандартних розчинів. Для колориметричного визначення у кожен лунку додавали 6%  $\alpha$ -іонітрозопропіофенон ( $\alpha$ -ISPP) (Sigma-Aldrich, США), розчиненого в 9% етанолі. Суміш інкубували 30 хвилин при 95°C та, потім, 30 хвилин при 4°C. Абсорбція розчину визначалась при довжині хвилі 540 нм за допомогою автоматичного аналізатору (Bio-Rad, США). Аргіназну активність підраховували використовуючи стандартну криву концентрації сечовини.

Данні підраховували із застосуванням формули:

*мкг сечовини / 60 \* 50 / час інкубації із аргініном (у хвилинах) = одиниці активності аргінази на кожні  $1 \cdot 10^6$  клітин.*

Рівень аргіназної активності виражався в одиницях активності (кількість ферменту, яка необхідна для гідролізу 1  $\mu$ М аргініну за хвилину).

### **2.23. Визначення рівню кисень-залежного метаболізму перитонеальних макрофагів щурів**

Рівень кисень-залежного метаболізму перитонеальних макрофагів щурів оцінювали за продукцією активних форм кисню (АФК). Перитонеальні макрофаги відмивали у середовищі Хенка та центрифугували протягом 10 хвилин при 1500 g. Відмиті клітини ресуспендували у середовищі Хенка до концентрації  $1 \cdot 10^6$  клітин / мл.

100 мкл суспензії клітин переносили у 96-лункову плашку та інкубували 30 хвилин при 37°C. Після цього у кожен лунку додавали 100 мкл 0,1% нітросиній тетразолій хлорид (НСТ реагент). Після 15 хвилинного культивування перитонеальних макрофагів з НСТ реагентом, проводили активацію продукції активних форм кисню із додаванням 600 мкг/мл Зимозану А (з *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich, США). Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2 М КОН та утворений внутрішньоклітинний диформазан розчиняли у 100 мкл 50% диметил сульфоксиді (DMSO, Sigma-Aldrich, США) із подальшим спектрофотометричним визначенням. Абсорбція розчину визначалась при довжині хвилі 630 нм за допомогою автоматичного аналізатору (Bio-Rad, США) [107].

#### **2.24. Статистична обробка результатів**

Експериментальні дані оброблялись загальноприйнятими методами варіаційної статистики на основі 10 повторів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ) з вирахуванням середнього значення ( $M$ ), середнього квадратичного відхилення ( $\delta$ ) і середньої квадратичної похибки ( $m$ ). Для розрахунку результатів досліджень і побудови графіків використовували пакет статистичних програм “Origin 8.0” та стандартний пакет прикладних програм “STATISTICA 7.0” та “Microsoft Office 2013”.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Ожиріння та його наслідки є одними з найбільш поширених світових проблем, пов'язаних зі здоров'ям людини у 21 столітті. Стан здоров'я людей, що страждають на ожиріння гірше, ніж у людей з вагою у межах норми [109]. Супутніми захворюваннями, пов'язаними з надмірною вагою і ожирінням є рак (рак молочної залози, ендометрію, яєчників, колоректальний, рак стравоходу, нирок, підшлункової залози, простати), цукровий діабет 2 типу, гіпертонія, інсульт, хвороба коронарної артерії, хронічна серцева недостатність, астма, остеоартрит, легенева емболія, захворювання жовчного міхура, а також підвищений ризик інвалідності. Все це призводить до більш ніж трьох мільйонів смертельних випадків щорічно [110, 111].

Відомо, що гормони прямо та опосередковано регулюють метаболізм та впливають на загальну масу тварин. Будь-які зміни у секреції гормонів, у тому числі статевих, можуть призводити до появи та розвитку небажаних ознак та симптомів. Наприклад, прогестерон є необхідним для протікання вагітності у жінок гормоном. Існує декілька сценаріїв при котрих рівень прогестерону збільшується. Коли у жіночому організмі протікає стадія овуляції чи вагітність, рівень прогестерону природно стає більшим. Крім того, збільшений рівень прогестерону може бути спричинений неправильним харчуванням, недостатністю фізичної активності та вживанням прогестерон-вмістних засобів контрацепції. Однією з найпомітніших ознак збільшеного рівня прогестерону в організмі є відчуття слабкості, втомленості у м'язовій тканині, поява надмірної маси тіла. Також з'являються вугри, жирна шкіра, періодично підвищується температура тіла, головні болі, інфекції сечовивідних шляхів. При відсутності змін у харчуванні, фізичній активності, стан хронічного високого синтезу прогестерону може призводити до ожиріння.

### 3.1. Вплив довготривалого введення прогестерону на органометричні параметри щурів та їх харчову поведінку

Для вивчення процесу розвитку ожиріння викликаного високою концентрацією прогестерону у крові, у даній роботі використовували модель щурів, яким протягом 28 діб вводили прогестерон концентрацією 10 мг/кг.

На рисунку 3.1 показано динаміку зростання маси тіла щурів яким щодня протягом 4 тижнів вводили прогестерон. Контрольна група тварин аналогічним чином отримувала корм та воду.

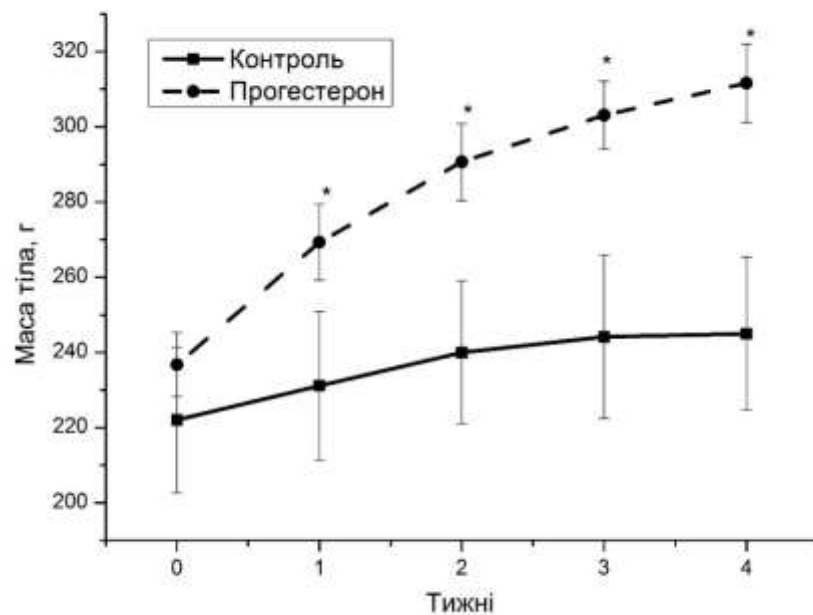


Рис. 3.1. Маса тіла щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* -  $p < 0.05$  різниці достовірні по відношенню до контролю

Початкова вага тварин контрольної групи становила  $222 \pm 19$ г (рис. 3.1.). Вага щурів контрольної групи наприкінці експерименту становила  $245 \pm 20$ г, що на 23г вище порівняно з вихідною масою тварин. Було встановлено, що вага щурів після довготривалого щоденного введення прогестерону була

більшою ніж у щурів контрольної групи (початкова вага –  $236\pm 8$ г, вага на кінець експерименту –  $311\pm 11$ г ( $p < 0,05$ )).

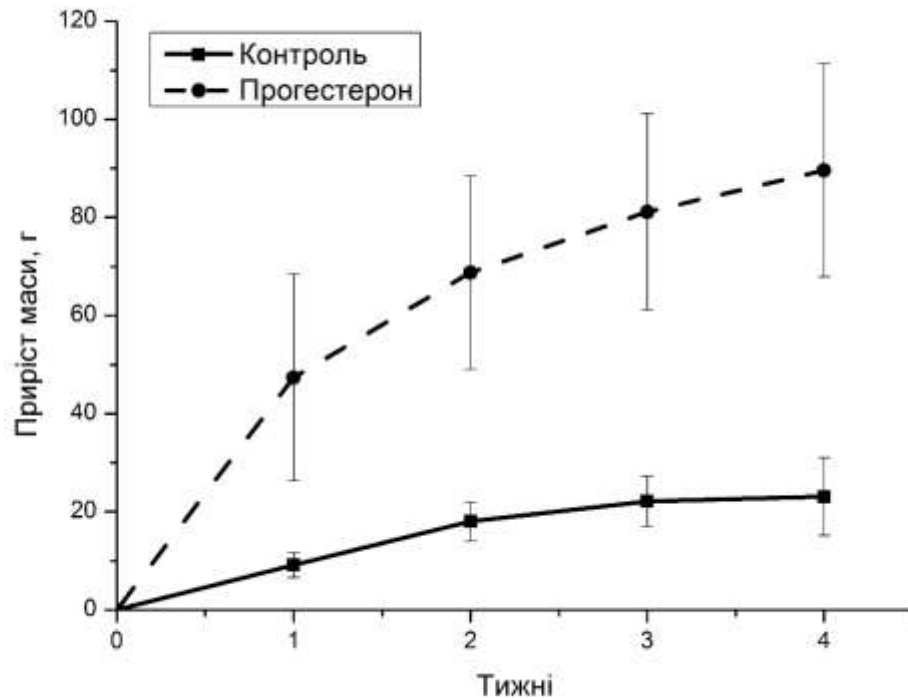


Рис. 3.2. Приріст маси тіла у щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням ( $M\pm m$ ,  $n=10$ ).

У групі щурів після довготривалого введення прогестерону спостерігали зростання маси тіла на 75г. Тобто показник маси тіла у щурів з модельованим ожирінням в 3 рази перевищує середній показник приросту маси тіла у щурів контрольної групи (рис 3.2.).

У відсотковому співвідношенні зміна маси тіла щурів контрольної групи становила 11% від початкової маси тіла після 4 тижнів експерименту. Маса тіла щурів під час довготривалого введення прогестерону після закінчення експерименту збільшилась значніше у порівнянні з показниками контрольної групи. У групі щурів після 4 тижнів введення прогестерону тіла у відсотковому співвідношенні збільшилась на 32% ( $p < 0,05$ ) від початкової маси тіла (рис 3.3.). Тобто маса тіла у щурів після довготривалого введення

прогестерону є на 20% більшою за масу тіла щурів контрольної групи на час закінчення експерименту.

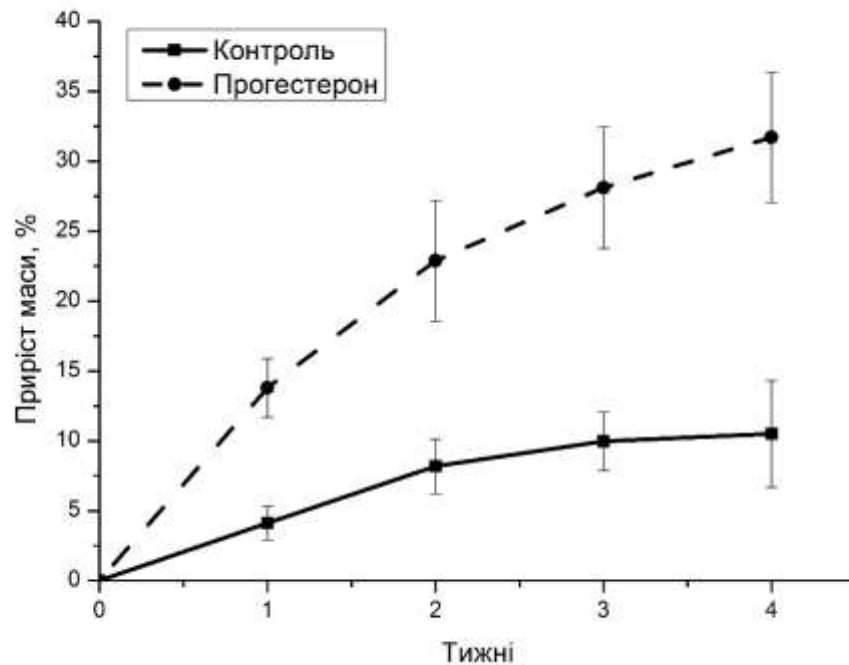


Рис. 3.3. Порівняння відсоткових співвідношень приросту маси тіла від початкової маси тіла у щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Отримані нами результати свідчать, що тривале введення прогестерону супроводжується збільшенням маси тіла. Ці результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, про те, що тривале введення прогестерону супроводжується збільшенням маси тіла. Попередні дослідження продемонстрували, що прогестерон проявляє максимальний ефект при дозі 10 мг / кг [40, 112]. Наші результати показують, що середня маса тіла щурів при тривалому застосуванні прогестерону на 27% більша, ніж у контрольній групі тварин.

Отриманні данні пояснюються тим, що прогестерон впливає на розвиток адипоцитів, через стимуляцію синтази жирних кислот. Синтаза жирних кислот - це мультиферментний комплекс, який складається із двох гомологічних

субодиниць, кожна з яких може каталізувати сім різноманітних реакцій, що забезпечує утворення довголанцюгових жирних кислот [113]. Дієта із високим вмістом вуглеводів стимулює експресію синтази жирних кислот, а глодання та високий вміст ліпідів у раціоні – інгібує. Інсулін, глюкоза, вільні жирні кислоти, цАМФ є прямими ефекторами гену синтази жирних кислот.

За контроль транскрипції синтази жирних кислот відповідає ADD1/SREBP1c (adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c), який у свою чергу стимулюється інсуліном [114]. У попередніх дослідженнях було показано, що прогестерон регулює експресію ADD1/SREBP1c у клітинах раку молочної залози MSF7 та у культивованих клітинах преадипоцитів отриманих з жирової тканини щурів. Тож прогестерон, як і інсулін, стимулює роботу синтази жирних кислот, що є потенційним механізмом його впливу на ріст адипоцитів.

Розподілення жирової тканини по організму є важливим та незалежним фактором ризику серцево-судинних захворювань у чоловіків та жінок. Залежно від ступеню тяжкості ожиріння відбувається переважно збільшення кількості вісцерального жиру та окружність талії. Уже при переході нормальної кількості вісцерального жиру в надлишкову відбувається ряд метаболічних перебудов – збільшення кількості підшкірного жиру, жирової маси тіла, холестеролу у складі ліпопротеїнів низької щільності, глікемія.

При проведенні лапоротомії дослідних тварин ми виявили, що щури, за умов довготривалого введення прогестерону мають значно більшу кількість вісцеральної жирової тканини саме в області сечо-статевої системи (гонадальний жир) у порівнянні із показниками щурів контрольної групи. Отримані результати пояснюються впливом жіночого статевого гормону прогестерону. У результаті проведених вимірів, маса гонадального жиру щурів після довготривалого введення прогестерону становила  $19 \pm 5$  г ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з показниками контрольної групи після 28 днів проведення експерименту, які становили  $11 \pm 2$  г (рис 3.4.). Можна зробити висновок, що

хронічне збільшення кількості прогестерону призводить до збільшення маси тварин, у тому числі за рахунок акумуляції жирової тканини.

Важливим фактом є те, що розподілення жирової тканини залежить від статті. У дослідженнях розподілення жирової маси людей із надлишковою вагою було показано, що жінки мають більшу кількість підшкірного жиру і меншу кількість вісцерального жиру ніж чоловіки. При цьому параметри, які характеризують метаболічні зміни не відрізнялися залежно від статті, що передбачає відмінності у метаболічній активності вісцерального жиру у жінок та чоловіків. Такі особливості характерні і для людей із масою тіла у межах норми [115].

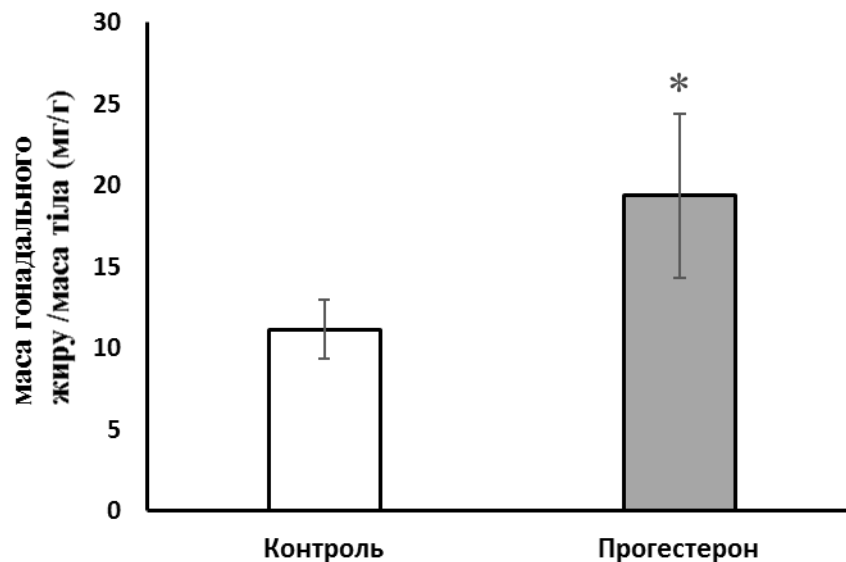


Рис 3.4. Маса гонадального жиру у щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* -  $p < 0,05$  різниці достовірні по відношенню до контролю

Було показано, що вісцеральний жир продукує у кров'яне русло ретинол-зв'язуючий білок 4, який підвищує резистентність до інсуліну, що призводить до розвитку діабету 2 типу та ожиріння [116]. Також, накопичення в організмі жирової тканини призводить до активації ліполізу, транспорту вільних жирних кислот у кров'яне русло. Вільні жирні кислоти у свою чергу

знижують утилізацію глюкози печінкою, що спричиняє збільшення секреції інсуліну та розвитку компенсаторної гіперінсулінемії.

Підсумовуючи отримані данні, можна зробити висновок, що довготривале введення прогестерону призводить до акумуляції жиру, імовірно, через активацію синтази жирних кислот. У свою чергу це призводить до того, що надлишкова кількість вісцеральної жирової тканини, призводить до секреції ретинол-зв'язуючого білку 4, який спричиняє інсулінорезистентність інших тканин та посилює наслідки ожиріння на організм і розвитку перед діабетичного стану.

Для аналізу змін у композиції тіла було проведено вимірювання показника індексу маси тіла (ІМТ). Індекс маси тіла – це система вимірювання, що базується на відношенні показників маси та його довжини тіла. Базуючись на значення ІМТ можна стверджувати про дефіцит маси тіла, нормальний індекс маси тіла, надлишок маси тіла, ожиріння I, II, III, IV ступенів. ІМТ також широко застосовують для оцінки факторів ризику розвитку чи схильності у ряді проблем здоров'я (хронічні, системні захворювання). Крім того, показники ІМТ використовують для дослідження статистичних тенденцій маси тіла у межах локальних територій, країн. Завдяки показникам ІМТ можна стверджувати про загальний відсоток жиру в організмі. Важливим є те, що за допомогою ІМТ не визначають інформацію про кількість жиру у різних частинах тіла. Класифікація, що використовує показник ІМТ залежить від статі, віку, етнічної групи, довжин кінцівок.

Гендерним особливостям ожиріння привертається дуже мала увага. Приблизно вдвічі більше жінок ніж чоловіків страждають від тяжких форм ожиріння (1 та 2 ступенів –  $ІМТ \geq 35$  та  $40$   $кг/м^2$  відповідно). Крім біологічних і соціальні фактори, такі як гендерна нерівність, сприяють різноманітності перебігу ожиріння у чоловіків та у жінок. Попередні дослідження показали що жіночі статеві гормони впливають на кількість їжі, що споживалась та на кількість енергії, що витрачалась жінками у ході досліджень [117]. Також

авторами було показано, що жіночі статеві гормони залучені у регуляцію метаболізму жирової тканини.

Крім того, визначення ІМТ, навіть без урахування інших антропометричних показників (наприклад, окружність талії, співвідношення талії та стегон), є вагомим фактором при аналізі загальної смертності. Надмірна вага та ожиріння людини визначаються при значеннях ІМТ вище 23-25 кг / м<sup>2</sup>. В діапазоні значень ІМТ 30-35 кг / м<sup>2</sup> середня тривалість життя, переважно, знижується на 2-4 роки; при ІМТ 40-45 кг / м<sup>2</sup> вона зменшується на 8-10 років [118]. Поступове збільшення смертності пов'язане в основному із розвитком серцево-судинних захворювань.

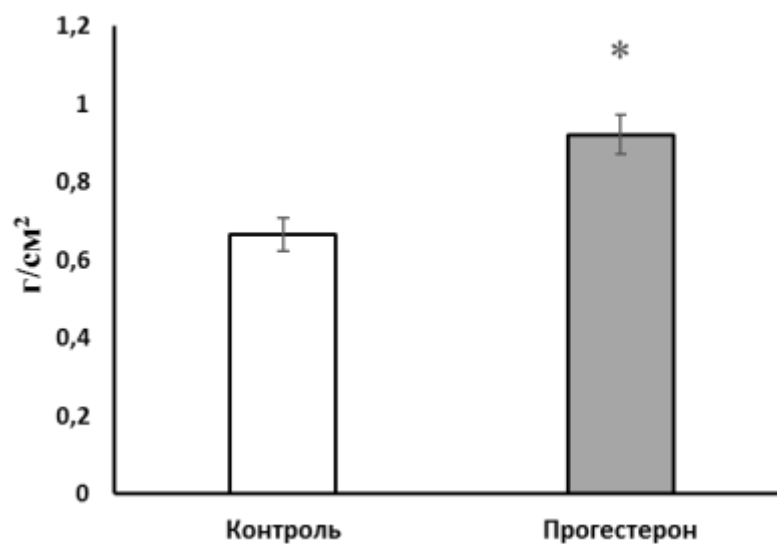


Рис. 3.5. Показники індексу маси тіла (ІМТ) у щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* -  $p < 0,05$  різниці достовірні по відношенню до контролю

В результаті досліджень показано, що індекс маси тіла у щурів контрольної групи тварин після 4 тижнів експерименту становив  $0,67 \pm 0,04$  г/см<sup>2</sup> (рис 3.5.). Ці данні корелюють з ІМТ відповідного віку у попередніх дослідженнях ожиріння [119]. ІМТ щурів з модельованим ожирінням після 4 тижнів введення прогестерону збільшився до  $0,92 \pm 0,05$  г/см<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ). Тобто

показник ІМТ у щурів з ожирінням був на 27% рази більшим за показники контрольної групи тварин.

Так як, у даній роботі при дослідженні ожиріння використовували модель тварин, яким протягом тривалого часу вводили гормон прогестерон, важливо було дослідити його вплив на харчову поведінку. Тварини контрольної та експериментальної групи споживали однаковий стандартний корм. Для дослідження харчової поведінки тварин під час проведення експерименту проводили підрахунок кількості спожитого корму.

Для дослідження кількості спожитого корму ми вимірювали такі параметри – щоденне споживання корму, середнє щоденне споживання корму та загальна кількість спожитого корму щурами за умов довготривалого введення прогестерону в порівнянні з контрольною групою.

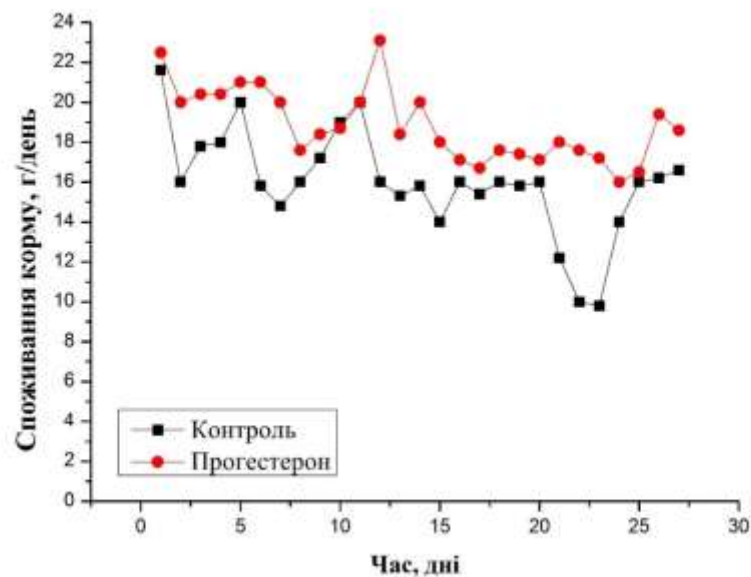


Рис 3.6. Графік щоденного споживання корму щурами за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

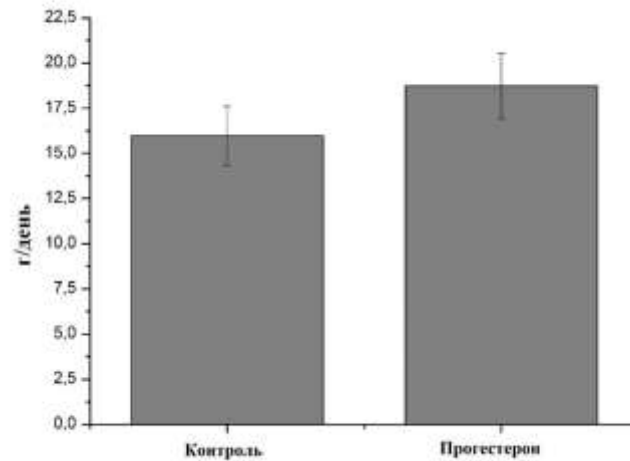


Рис 3.7. Середньодобове споживання корму щурами за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Як показано на рис 3.7. , щури контрольної групи споживали в середньому  $15,97 \pm 1,637$ г, а група щурів при введенні прогестерону споживала  $18,72 \pm 1,819$ г ( $p < 0,05$ ) стандартного корму на добу. Загальна кількість спожитого корму щурами за умов довготривалого введення прогестерону в порівнянні з контрольною групою показана на Рис.3.8. Наприкінці експерименту загальна кількість спожитого корму в контрольній групі та у групі за умов довготривалого введення прогестерону становило  $431,3 \pm 21,7$ г та  $505,4 \pm 21,8$ г ( $p < 0,05$ ) відповідно.

Загальна кількість спожитого корму протягом 28 днів щурами експериментальної групи на 17% ( $p < 0,05$ ) вище, ніж у контрольній групі тварин. Відомо, що порушення рівнів жіночих статевих гормонів може схилити жінок до порушень харчової поведінки, що обумовлене змінами рівня серотоніну або серотонінергічних рецепторів [41]. Але механізм зв'язку між прогестероном, серотоніном і харчовою поведінкою не зовсім зрозумілий.

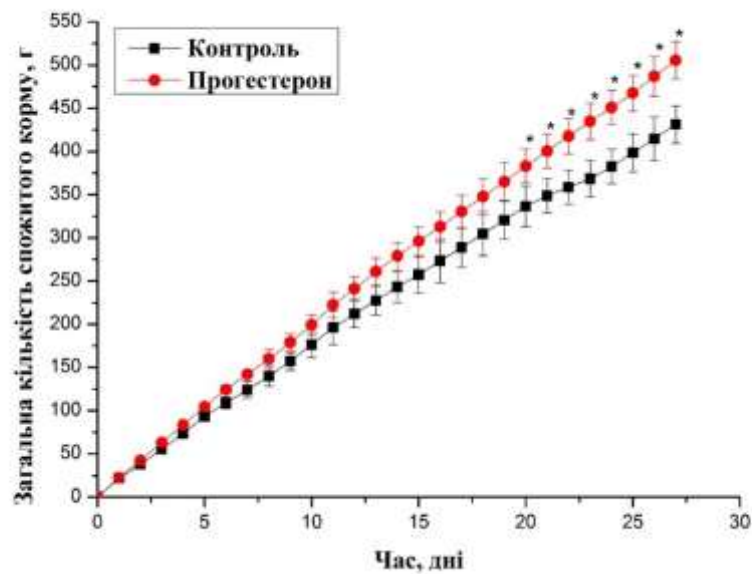


Рис 3.8. Загальна кількість спожитого корму щурами за умов довготривалого введення прогестерону в порівнянні з контрольною групою.

Розглядаючи отримані результати, можна припустити, що довготривале введення прогестерону впливає на центри ситості у дослідних тварин. Збільшене споживання корму вказує на ймовірний вплив прогестерону на відсутність відчуття насичення і, як наслідок, до збільшення вживання їжі. За такі наслідки в організмі відповідає серотонінергічна сигнальна система [120]. Крім того, при переїданні центр ситості (вентромедіальне ядро гіпоталамуса) адаптується до більш високих рівнів глюкози, інсуліну і лептину. Результатом є те, що знижується його чутливість і при споживанні надмірної кількості їжі відбувається недостатнє гальмування центру голоду. Відомо, що жирова тканина синтезує гормон лептин, який відповідає за регуляцію апетиту і енергетичного метаболізму. При зв'язуванні лептину з відповідним рецептором відбувається внутрішньоклітинний сигналінг та виділення серотоніну в центрі насичення, який, у свою чергу, сигналізує мозку про споживання достатньої кількості їжі, після чого знижується апетит [121].

### 3.2. Показники ліпідного обміну за умов прогестерон-індукованого ожиріння

Відомо, що такі стани, як ожиріння, метаболічний синдром, атеросклероз та діабет супроводжуються порушенням обміну поживних речовин, зокрема ліпідів. Продовжуючи вивчення параметрів функціонування жирової тканини при ожирінні, яке виникає за умов довготривалого введення прогестерону є доцільним вивчити стан ліпідного обміну.

Для дослідження ліпідного обміну ми проводили вимірювання рівнів циркулюючих у крові вільного холестеролу, тригліцеридів, ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) та ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ).

	<b>Холестерол</b> (ммоль/л)	<b>Тригліцериди</b> (ммоль/л)	<b>ЛПНЩ</b> (ммоль/л)	<b>ЛПВЩ</b> (ммоль/л)	<b>ЛПДНЩ</b> (ммоль/л)
<b>Контроль</b>	2,12±0,21	1,06±0,24	0,15±0,02	2,2±0,31	0,20±0,04
<b>Прогестерон</b>	3,12±0,51*	2,12±0,47*	0,23±0,10*	1,51±0,2*	0,45±0,01*

Таблиця 1. Вміст ліпідів у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Результати досліджень представлені у Таблиці 1. У щурів за умов довготривалого введення прогестерону спостерігали підвищення рівнів вільного холестеролу – у 1,5 разів, тригліцеридів – у 2 рази, ЛПНЩ – у 1,5 разів та ЛПДНЩ у 2,2 разів, у порівнянні із показниками контрольної групи тварин ( $p < 0,05$ ). При цьому рівень ЛПВЩ був у 1,5 рази меншим за показники контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Отримані данні свідчать про розвиток дисліпідемії при довготривалому введенні прогестерону. Згідно класифікації Всесвітньої організації охорони здоров'я існують дисліпідемії різного ступеню тяжкості. Отримані результати підвищеного рівня тригліцеридів та ЛПНЩ свідчать про високий ризик розвитку атеросклерозу. Низький показник ЛПВЩ є фактором ризику розвитку ішемічної хвороби серця [122].

Дані порушення можуть пояснюватись надмірним споживанням їжі, і відповідно, ліпідів в її складі. Відомо, що розщеплення ліпідів до вільних жирних кислот та інших складових, синтез хіломікронів і тригліцеридів відбувається у тонкому кишечнику, після чого вже у печінці відбувається синтез ліпопротеїнів. Підвищений рівень тригліцеридів призводить до зниження синтезу ЛПВЩ і стимулює утворення ЛПНЩ та ЛПДНЩ. За умов надлишку тригліцеридів стимулюється синтез аполіпопротеїну apoB у печінці. При цьому apoB у комплексі із тригліцидами формують ЛПДНЩ, які потім екскретуються у кров'яне русло. Підвищений рівень ЛПДНЩ посилює їх взаємодію із корисними ЛПВЩ. При цій взаємодії відбувається обмін ефірів холестеролу, які знаходяться у складі ЛПВЩ на тригліциди у складі ЛПДНЩ. Данні процеси відбуваються за участю білка CETP (білка-переносника ефіру холестеролу). Результатом таких процесів є зниження рівнів ЛПВЩ та перетворення ЛПДНЩ на ЛПНЩ [123, 124]. Крім цього понижений рівень ЛПВЩ під час ожиріння підтримується за рахунок посилення виведення аполіпопротеїну apoA1, який знаходиться у їх складі [125].

Також у ході досліджень ми отримали результати про підвищений рівень вільного холестеролу у щурів із ожирінням індукованим довготривалим введенням прогестерону. Вільний холестерол відіграє важливу роль при синтезі ліпопротеїнів різного ступеню щільності, є основою для синтезу стероїдних гормонів, жовчних кислот, вітамінів [126]. Підвищений рівень синтезу холестеролу може бути спричинений збільшеним споживанням їжі

щурами із ожирінням та розладами його обміну, які виникають у печінці, що спричинене порушенням вуглеводного (інсулінорезистентність, глюкозотолерантність) та ліпідного метаболізму.

Таким чином аналіз концентрацій ліпопротеїнів різного ступеню щільності у сироватці крові щурів за умов довготривалого введення прогестерону показав значні порушення у метаболізмі цих речовин, що у комплексі із отриманими даними про збільшення маси тіла, ІМТ, кількості гонадального жиру, спожитого корму свідчить про наявність ожиріння у експериментальних щурів.

### **3.3. Стан системи обміну серотоніну у мозку щурів при введенні прогестерону та рівень амінокислот з розгалуженими бічними ланцюгами у сироватці крові щурів**

Потреба у споживанні їжі та підтримка балансу між витратою та зберіганням енергії знаходяться під контролем ряду нервових систем, визначну роль в функціонуванні яких відіграє серотонін. Серотонін (5-гідрокси-триптамін, 5-НТ) синтезується в центральній нервовій системі і в ентерохромафінних клітинах епітелію кишечника. Серотонін формується із амінокислоти L-триптофану, завдяки 5-гідроксилюванню триптофану, з формуванням 5-гідрокси-триптофану (5-НТР) (рис. 3.9.), та швидкому декарбоксілюванню 5-НТР до серотоніну. Перша та лімітуюча реакція гідроксилювання каталізується триптофан-5-монооксигеназою (або гідроксилазою) (ЕС 1.14.16.4). Другий фермент у синтезі серотоніну це декарбоксилаза ичних L-амінокислот, або триптофан-декарбоксилаза (ЕС 4.1.1.28) [127]. Синтезований у серотонінергічних нейронах серотонін зберігається у везикулах до свого вивільнення. Серотонін який швидко не

вивільняється з клітин перетворюється у 5-гідроксиіндолоцтову кислоту за допомогою ферменту моноаміноксидази (MAO).

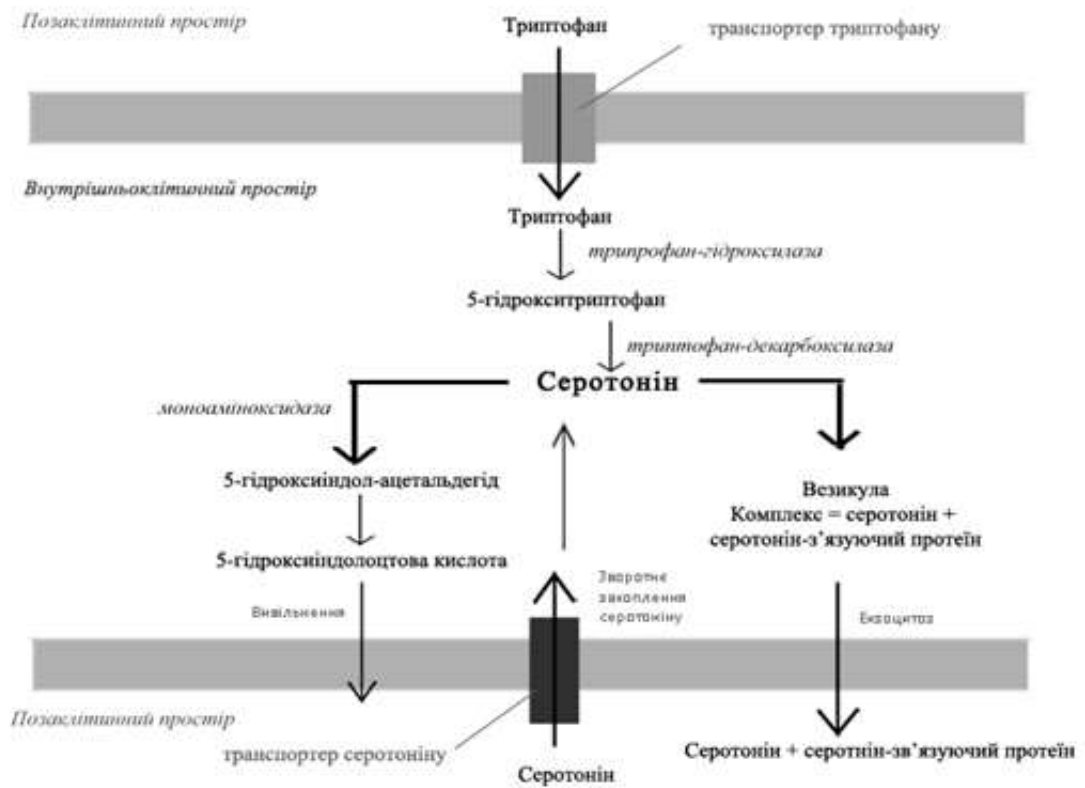


Рис. 3.9. Шляхи метаболізму серотоніну.

Відомо, що жіночий статевий гормон прогестерон може впливати на метаболізм серотоніну [128]. Крім того, прогестерон є попередником андрогенів та естрогенів. Основним джерелом ендогенного продукування прогестерону є жовте тіло та плацента під час вагітності [129–131]. Синтез прогестерону збільшується під час пізніх етапів менструального циклу і контролює рівень секреції ендометрієм. Під час вагітності прогестерон викликає збільшення кількості жирової тканини. Крім того, було показано, що при проходженні гормон замісної терапії чи довготривалому застосуванні контрацептивів, що містять прогестерон, значно збільшується маса тіла за рахунок накопичення жиру [6]. Згідно з попередніми дослідженнями прогестерон викликає такі наслідки за рахунок впливу на нейротрансмітер серотонін.

Тому метою даного наступного етапу нашого дослідження було дослідити вплив довгострокового введення прогестерону на стан функціонування шляху біосинтезу серотоніну.

Оскільки попередником для синтезу серотоніну виступає триптофан, то першим етапом нашого дослідження було визначення вмісту даного показника в головному мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону. Як видно з рисунку, спостерігається збільшення вмісту триптофану у 2,2 рази ( $p < 0,05$ ) у групі тварин з експериментальним ожирінням, в порівнянні з контрольною групою щурів (рис.3.10). Згідно з літературними даними лише 1% триптофану окислюється по серотонінергічному шляху [6]. Проте, значення серотонінового шляху дуже велике і його порушення призводить до численних захворювань [127]. Крім шляху перетворення триптофану в серотонін, існує ще два шляхи метаболізму триптофану – шлях перетворення в індол та кінуренін [132].

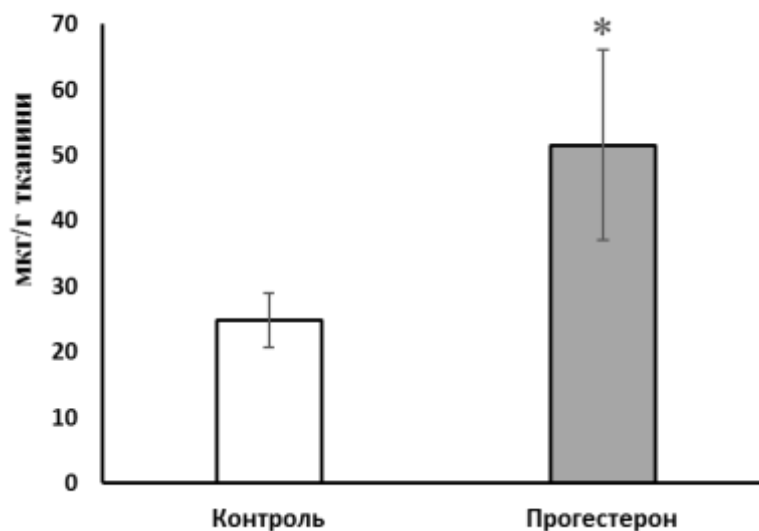


Рис. 3.10. Вміст триптофану у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

На вміст триптофану у мозку може впливати вміст даного показника у сироватці крові. Транспорт триптофану з крові у клітини мозку проходить через гематоенцефалічний бар'єр та плазматичну мембрану нейронів або клітин глії. За транспорт амінокислот через гематоенцефалічний бар'єр відповідає мембранний глікопротеїн CD98, який утворює транспортер великих нейтральних амінокислот (LAT1) [133]. Показане нами зростання вмісту триптофану може бути обумовлене конкуренцією даної амінокислоти з іншими амінокислотами (валіном, ізолейцином, лейцином) за транспорт через LAT1 для проходження гематоенцефалічного бар'єру.

Триптофан в крові знаходиться в двох формах: вільній та зв'язаній з альбуміном [134, 135]. Лише вільний триптофан здатний перетинати гематоенцефалічний бар'єр та потрапляти в мозок. Співвідношення триптофану до комплексу з альбуміном залежить від концентрації в сироватці крові вільних жирних кислот, які також здатні зв'язуватися з альбуміном і тим самим витіснити триптофан із комплексу з альбуміном. У наших попередніх дослідженнях встановлено підвищення концентрацій триптофану та серотоніну у сироватці крові у щурів за умов довготривалого введення прогестерону у порівнянні з контрольною групою тварин [136]. Таким чином, витіснення триптофану з комплексу триптофан-альбумін вільними жирними кислотами може розглядатися як ще одна причина збільшення вмісту вільного триптофану в крові щурів та у мозку за умов довготривалого введення прогестерону.

Першим етапом біосинтезу серотоніну є гідроксилювання триптофану в 5 положенні інольного кільця з утворенням проміжного метаболіту - 5-гідрокситриптофана (5-НТР) (Рис. 3.11.). Цю реакцію каталізує фермент триптофан-гідроксилаза (ТрГ). Даний фермент є лімітуючим у регуляції шляху синтезу серотоніну. Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення активності триптофан-гідроксилази в гомогенізаті головного мозку щурів.

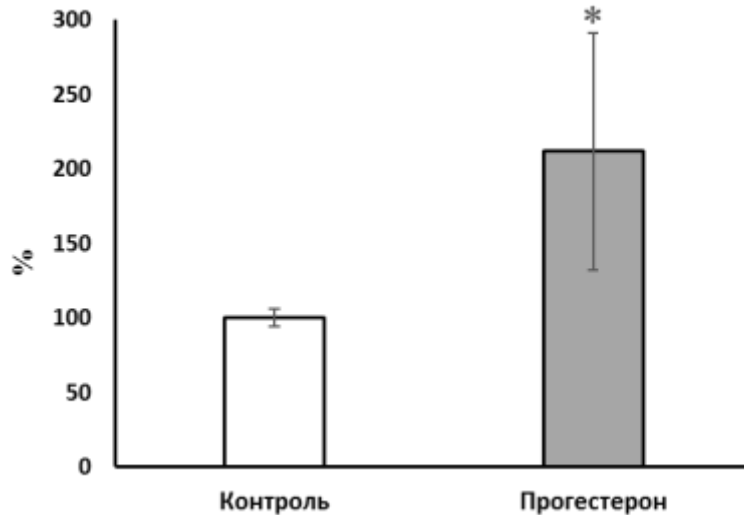


Рис. 3.11. Відносний вміст 5-гідрокситриптофану у гомогенаті головного мозку мозку щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

У результаті досліджень, нами було встановлено зниження триптофан-гідроксилазної активності в мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону на 25% ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з показниками контрольної групи тварин (рис. 3.12.). Можливою причиною такого зниження активності ТрГ є зниження біодоступності кофактора даного фермента - тетрагідробіоптерина (ВН4), біосинтез якого знижений внаслідок розвитку оксидативного стресу у хворих на ожиріння [135].

Показник відносного вмісту продукту триптофан-гідроксилазної реакції, проміжного метаболіту синтезу серотоніну - 5-гідрокситриптофану збільшилась в групі з моделлю прогестерон-індукованого ожиріння у 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з контрольною групою щурів (рис. 3.11.). Ці данні можна пояснити підвищеною концентрацією субстрату реакції утворення 5-гідрокситриптофану - триптофану.

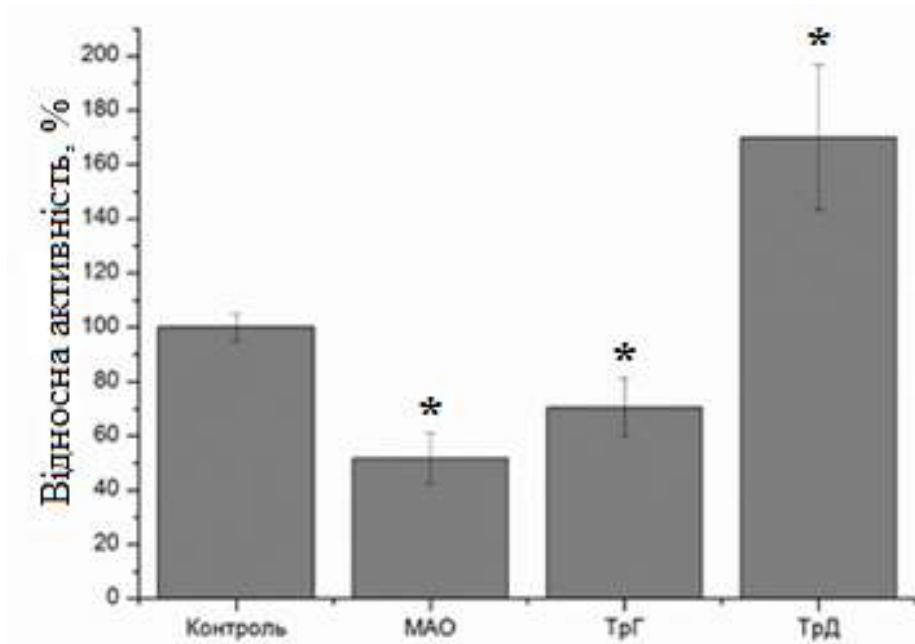


Рис. 3.12. Відносна активність моноаміноксидази (MAO), триптофан-5-гідроксилази (TrpH) та триптофан-декарбоксилази (TrpD) у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментального ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Наступним етапом окислення триптофану по серотоніновому шляху є процес декарбоксилювання 5-НТР до серотоніну. Цю реакцію каталізує фермент декарбоксилаза ароматичних L-амінокислот (триптофан-декарбоксилаза). Тому наступним етапом нашої роботи було вивчення триптофан-декарбоксилазної активності в тканинах головного мозку щурів. Згідно з отриманими результатами активність триптофан-декарбоксилази збільшилась і була у 1,7 рази більшою ( $p < 0,05$ ) від активності щурів контрольної групи (рис. 3.12).

Продуктом декарбоксилювання 5-НТР є біологічно активна речовина серотонін. Особливості організації серотонінергічної системи мозку і його широкі зв'язки з іншими відділами мозку обумовлюють участь цієї системи в регуляції багатьох функцій організму. У зв'язку з цим наступним етапом нашого дослідження було визначення вмісту серотоніну в головному мозку

щурів. В результаті досліджень, нами було встановлено зростання вмісту серотоніну в групі щурів з довгостроковим введенням прогестерону у 3 рази в порівнянні з контрольною групою щурів ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.13).

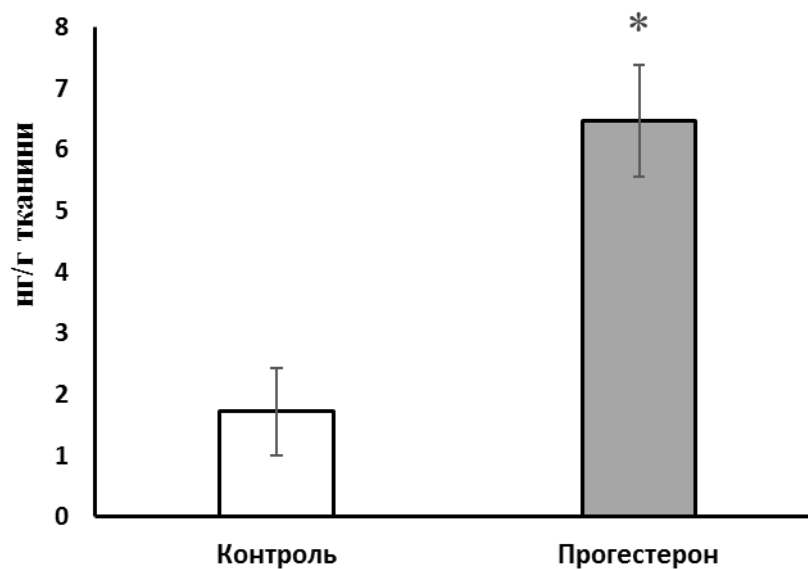


Рис 3.13. Вміст серотоніну у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Отримані данні по вмісту серотоніну можуть бути пояснені підвищеною концентрацією триптофану – початкового метаболіту серотонінергічної системи, підвищеною активністю триптофан-декарбоксилази та зменшенням активності MAO.

Так як зростання вмісту серотоніну в мозку щурів з прогестерон-індукованим ожирінням може бути пов'язано не тільки зі збільшенням продукції цього нейромедіатора, а й з зниженням процесів його катаболізму, наступним етапом нашого дослідження було визначення активності ферменту моноамінооксидази (MAO), який забезпечує деградацію серотоніну, за допомогою окисного дезамінування до 5-гідроксиіндолоцтової кислоти.

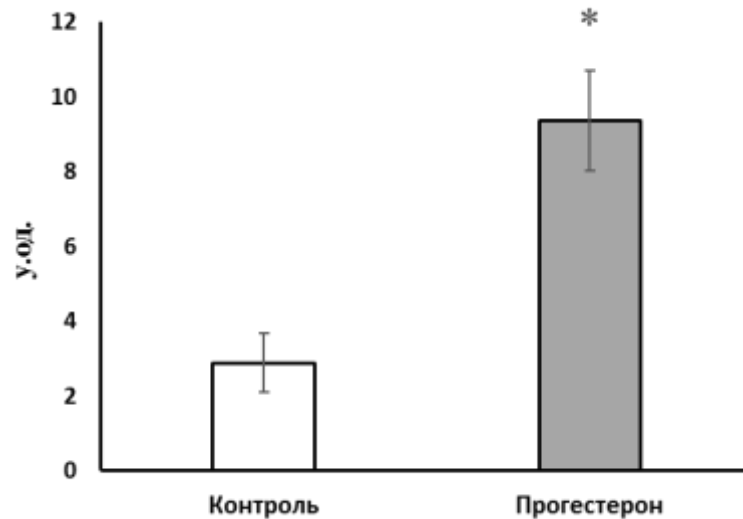


Рис 3.14. Вміст 5-гідроксиіндолоцтової кислоти у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Активність MAO зменшилась і становила 52% ( $p < 0,05$ ) від активності у щурів контрольної групи (рис.3.12.), а концентрація 5-гідроксиіндолоцтової кислоти збільшилась у 3 рази ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контрольною групою щурів (рис 3.14.). Зафіксоване нами зниження активності MAO може бути пов'язано з деактивацією даного ферменту, що, в свою чергу, може привести до зростання пулу біогенних амінів, зокрема серотоніну.

Таким чином, у результаті проведених досліджень нами встановлено дисбаланс у шляху метаболізму серотоніну в головному мозку щурів, при розвитку гормонального ожиріння, індукованого довготривалим введенням прогестерону, що свідчить про залучення функціонування серотонінергічної нейротрансмітерної системи в механізми розвитку ожиріння гормонального генезу. На основі отриманих даних, можна зробити висновок, що система метаболізму серотоніну може бути використана як потенційна мішень для корекції метаболічного дисбалансу при розвитку гормонально-індукованого ожиріння.

Так як, показане нами зростання вмісту триптофану може бути обумовлене конкуренцією даної амінокислоти з іншими амінокислотами (валіном, ізолейцином, лейцином) за проходження через гематоенцефалічний бар'єр, наступним етапом наших досліджень було визначення рівнів цих амінокислот у сироватці крові.

Амінокислоти, особливо амінокислоти з розгалуженими бічними ланцюгами (АРБЛ), є важливими речовинами, що прямо чи опосередковано впливають на метаболізм. До амінокислот із розгалуженими бічними ланцюгами належать валін, лейцин та ізолейцин. Раніше було показано, що раціон, який містить великий рівень АРБЛ, впливає на збільшення маси тіла, синтез білків м'язів та гомеостаз глюкози. Відомо, що атлети споживають суміші із високим вмістом АРБЛ для збільшення об'єму м'язової тканини.

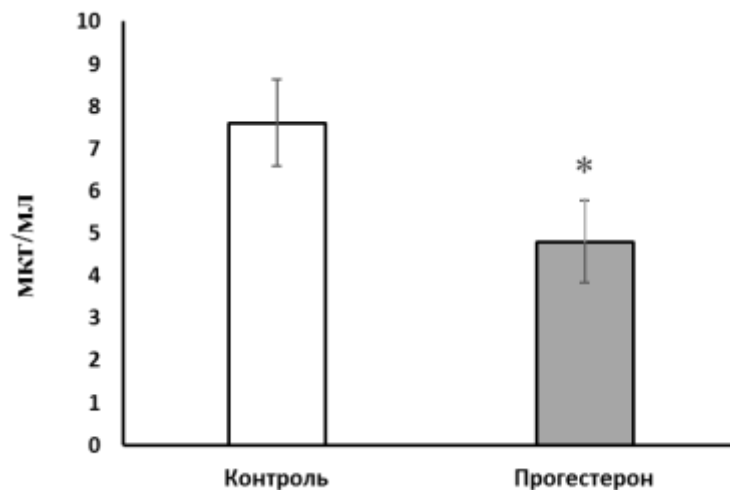


Рис 3.15. Концентрація валіну у сироватці крові контрольних щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

АРБЛ становлять близько 40% незамінних амінокислот організму та 35% у складі всіх білків м'язів. Показана, важлива роль АРБЛ у процесах гормональної регуляції. Ці амінокислоти впливають на збільшення секреції інсуліну панкреатичними  $\beta$ -клітинами та активують сигнальний шлях mTOR.

Не зважаючи на це, підвищення рівня АРБЛ корелює зі збільшенням ризику розвитку інсулінорезистентності та цукрового діабету 2 типу у людей та у моделях з використанням щурів [137].

Встановлено, що рівні валіну та лейцину були, відповідно, у 1,6 та 1,5 разів ( $p < 0,05$ ) нижчими у щурів за умов прогестерон-індукованого, ніж у щурів контрольної групи (рис. 3.15, 3.16.).

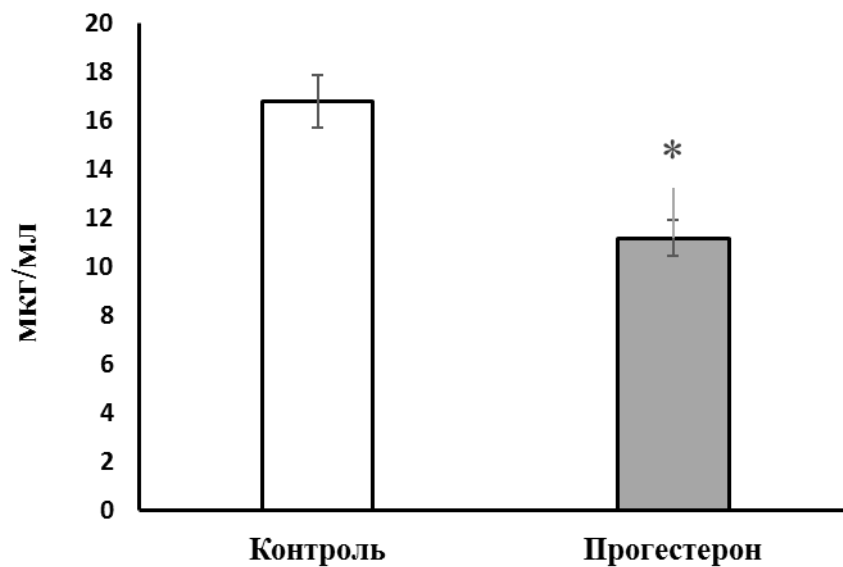


Рис 3.16. Концентрація лейцину у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Не дивлячись на те, що рівні валіну та лейцину були меншими у щурів із ожирінням, ми не спостерігали значну зміну у рівні ізолейцину (рис. 3.17.).

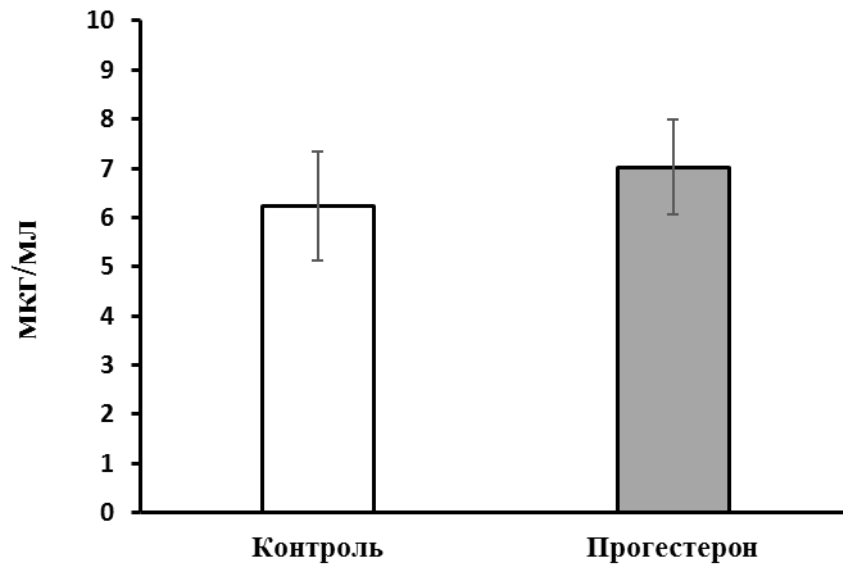


Рис 3.17. Концентрація ізолейцину у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Отримані данні свідчать, що концентрації амінокислот із розгалуженим бічним радикалом піддаються прямому, або опосередкованому впливу під час хронічного довготривалого введення прогестерону. Результатами цього впливу є зменшення рівнів циркулюючих у крові амінокислот валіну та лейцину. Також, наші попередні дослідження показали, що рівень триптофану у мозку був підвищений у щурів із ожирінням індукованим прогестероном. Таким чином, отримані результати досліджень можуть пояснюватись тим, що знижений рівень валіну та лейцину, які конкурують із триптофаном за транспорт через гематоенцефалічний бар'єр, призводить до підвищеного рівня триптофану у мозку. Гіпотетичним наслідком, або причиною таких результатів є вплив стану ожиріння на опорно-руховий апарат тварин, так як амінокислоти із розгалуженим бічним радикалом є основними амінокислотами у білках м'язів.

### 3.4. Показники запалення у щурів з прогестерон-індукованим ожирінням

У попередніх дослідженнях встановлено, що в організмі щурів, яким вводили прогестерон, збільшується маса тіла, ІМТ та кількість статевого жиру, що дозволило стверджувати про розвиток ожиріння. Також було виявлено, що перитонеальні макрофаги зазнають поляризації за М1-прозапальним типом. Це дозволило припустити, що зростання маси жирової тканини викликає запальний процес не тільки локальний (саме в жировій тканині), а й і системний. Дане припущення узгоджувалося з даними, отриманими на інших моделях ожиріння, згідно яких локальний запальний процес у жировій тканині переходить у системний.

Наслідком підвищення рівнів прозапальних цитокінів у крові людей та тварин з ожирінням є розвиток запалення в органах і тканинах організму [138, 139].

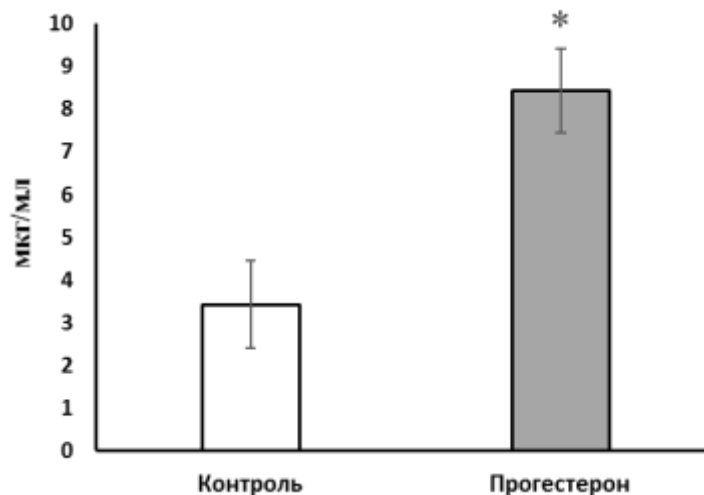


Рис. 3.18. Концентрація прозапального цитокіну ІЛ-1 у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Оскільки підвищення рівню циркулюючих цитокінів відображає вираженість системного запального процесу, для того, щоб оцінити ймовірність виникнення системного запалення в організмі на моделі прогестерон-індукованого ожиріння, необхідно визначити дані показники. Нами було визначено рівні таких протизапальних цитокінів, як IL-1 та IFN- $\gamma$ , у сироватці крові щурів, яким вводили прогестерон упродовж 28 діб.

Концентрації прозапальних цитокінів IL-1 та IFN- $\gamma$  у сироватці крові щурів із ожирінням, індукованим введенням прогестерону були підвищенні у 2,5 та 2 рази ( $p < 0,05$ ), відповідно у порівнянні із щурами контрольної групи. Це свідчить про розвиток системного запалення у відповідь на прогестерон-індуковане збільшення ваги (рис 3.18., 3.19.).

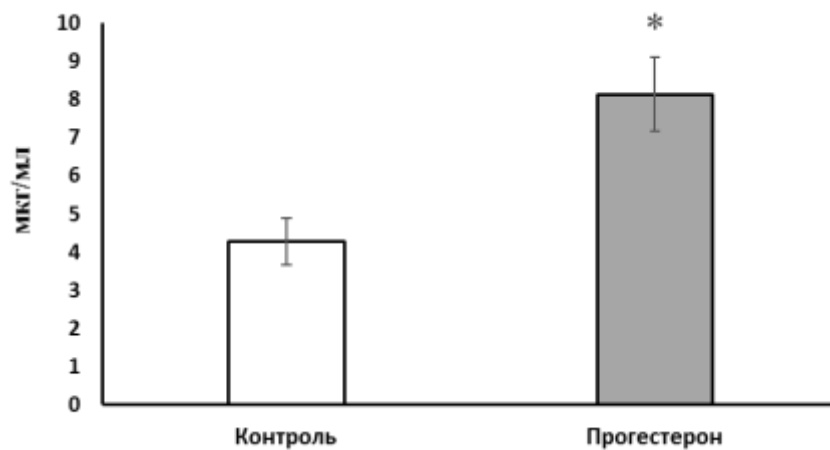


Рис. 3.19. Концентрація прозапального цитокіну IFN- $\gamma$  у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Очевидно, що зниження рівнів протизапальних цитокінів сироватки крові (IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ ) корелювало з підвищенням рівнів прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- $\gamma$ ), що також вказує на розвиток системного запального процесу.

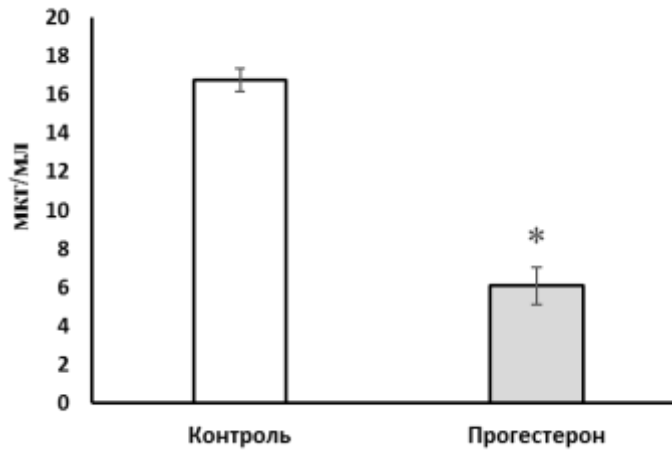


Рис. 3.20. Концентрація протизапального цитокіну ІЛ-4 у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Введення прогестерону щурам знижувало концентрації протизапальних цитокінів ІЛ-4, ІЛ-10, TGF- $\beta$  у сироватці крові щурів у 2.26, 2.2 та 2 рази ( $p < 0,05$ ), відповідно, у порівнянні з результатами контрольної групи щурів (рис 3.18.-3.20.).

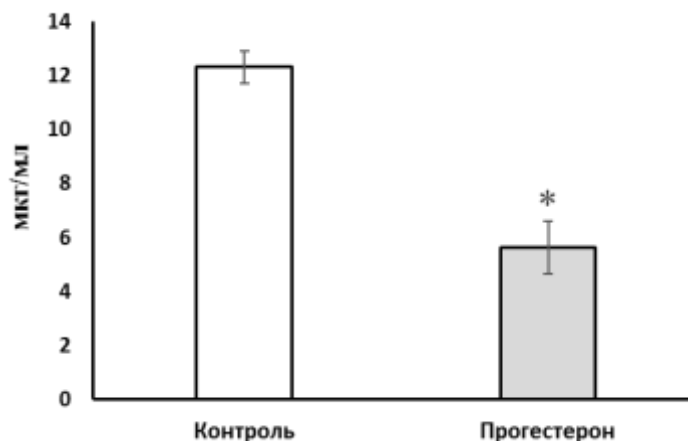


Рис. 3.21. Концентрація протизапального цитокіну ІЛ-10 у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними: підвищення рівня циркулюючих цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) спостерігалось у людей та у тварин із ожирінням, а також у осіб, які страждали на супутні при ожирінні хвороби. При цьому запалення при ожирінні супроводжується підвищенням рівнів інших маркерів запалення, таких як С-реактивний білок [139], альбумін, фібриноген, а також рецепторів до TNF та лептину [138]. Однак, попередні дані свідчать, що підвищення рівнів прозапальних цитокінів сироватки крові не корелює із їх рівнями у периферійних мононуклеарних клітинах крові, що означає, що ці клітини не могли бути джерелом цитокінів у осіб із ожирінням [140].

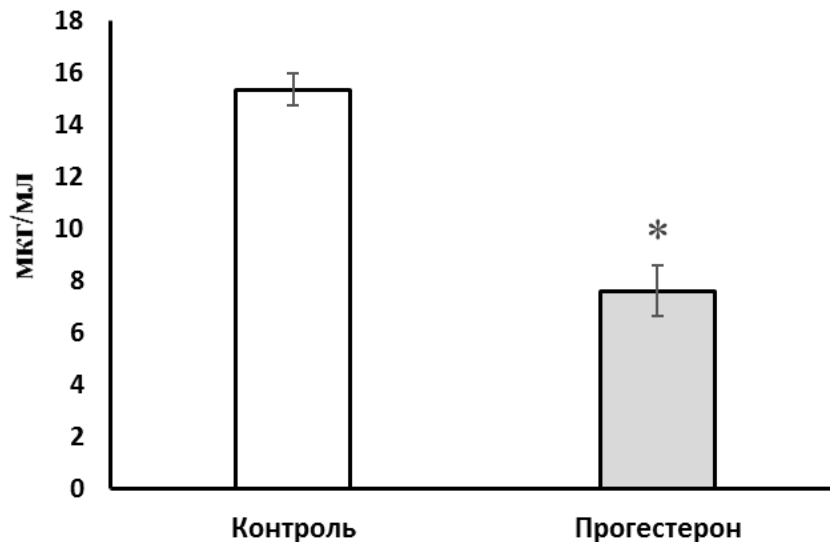


Рис. 3.22. Рівень протизапального цитокіну TGF- $\beta$  у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

У даному дослідженні ми продемонстрували підвищення концентрацій прозапальних цитокінів IL-1 та IFN- $\gamma$  у щурів, яким вводили прогестерон, що може відображати зв'язок із розвитком системної запальної реакції. При цьому рівні протизапальних цитокінів IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  значно знизилися. Отримані нами результати співставні з даними досліджень на інших моделях ожиріння,

які демонструють зростання рівнів сироваткових прозапальних цитокінів, які описані вище. Отже, наші дані підтверджують гіпотезу про те, що місцеве запалення у жировій тканині при ожирінні призводить до розвитку системного запалення, пов'язаного з прогресуванням захворювання.

Таким чином, наші дані свідчать, що прогестерон-індуковане ожиріння у щурів пов'язане з розвитком системної запальної реакції, викликаной, вірогідно, розвитком хронічного запалення у жировій тканині, що впливає на порушення балансу про- та протизапальних цитокінів. Збільшення продукції у жировій тканині прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IFN- $\gamma$ , сприяє підвищенню рівнів цих цитокінів у крові.

У відповідь на різні стимули, макрофаги піддаються M1 або M2 поляризації. Така активація асоціюється з аутоіммунними захворюваннями та запальними процесами, інфекціями, вірусами, алергією, пухлинами, атеросклерозом, гломерулонефритом і діабетом [44, 46]. M1 або «класично активовані» макрофаги активуються мікробними агентами або прозапальними цитокінами, такими як IFN- $\gamma$ , що виробляється Th1 лімфоцитами, та TNF- $\alpha$ . Вони залучені у запальні реакції і продукують IL-12 та IL-23, оксид азоту(NO) та реактивні форми кисню(АФК), що полегшує інфільтрацію моноцитів у місце запалення. M1 макрофаги також продукують інші прозапальні цитокіни, такі як TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12 [44].

Було показано, що M2, або «альтернативно активовані» макрофаги активуються іншими прозапальними цитокінами, такими як IL-4 та IL-13. У той час як M1 макрофаги беруть участь у Th1 опосередкованій імунній відповіді, M2 макрофаги залучені у Th2 імунну відповідь, що вважається протизапальною. Th2 лімфоцити залучені до гуморального імунітету, перебудови та репарації тканин, що страждають від запалення, загоєння ран, відповіді на паразитарні захворювання [46]. Активна аргіназа, що гідролізує аргінін до орнітину та сечової кислоти, є маркером M2 фенотипу макрофагів. Тому M2 поляризовані макрофаги виробляють орнітин та поліаміни [47, 141].

Ці клітини секретують протизапальні цитокіни IL-10, TGF- $\beta$  та невелику кількість IL-12 [142].

Існує ряд доказів, що поляризація макрофагів відіграє важливу роль у запальних процесах при ожирінні. У попередніх дослідженнях спостерігали кореляцію між зменшенням M1 макрофагів і збільшенням M2 макрофагів у жировій тканині у людському організмі та на моделях ожиріння із використанням мишей [143]. Спостерігали збільшення кількості M2 макрофагів у жировій тканині мишей, які піддавалися дієті з високим вмістом жирів. Крім того, виявили підвищену експресію цитокіну IL-10 у цій тканині [144].

Встановлено, що макрофаги жирової тканини, у щурів із ожирінням виділяють прозапальні фактори, такі як TNF- $\alpha$  [43]. Запаленні у периферійних органах і тканинах є головною причиною цих подій. Необхідні додаткові дослідження для визначення ролі перитонеальних макрофагів, які є резидентними макрофагами перитонеальної порожнини у розвитку слабо вираженого хронічного запалення при ожирінні.

Перитонеальні макрофаги є добре вивченим типом макрофагів. Вони можуть бути легко виділені з перитонеальної порожнини дослідних тварин та культивуватись *in vitro* [43]. У перитонеальних макрофагах було досліджено відміну у метаболізмі аргініну у макрофагах з M1 та M2 типом поляризації [46]. Перитонеальні макрофаги відіграють ключову роль у контролі протіканні інфекції і запальних патологій, а також у підтримці стійкості імунної відповіді [53]. Вважається, що перитонеальні макрофаги і моноцити, що потрапляють із кровообігу в органи та перетворюються у макрофаги запалення, є окремими популяціями моноклеарних фагоцитів [145]. Такі інфільтровані в органи та тканини макрофаги експресують iNOS (індуцибельна NO синтаза) та продукують NO.

У даному дослідженні ми зосередилися на дослідженні поляризації перитонеальних макрофагів на моделі щурів із ожирінням, що індуковане тривалим введенням прогестерону. Дослідження здатності макрофагів поляризуватися по M1 або M2 фенотипу при ожирінні без екзогенних стимулюючих факторів є важливим для підтвердження того, чи локальне запалення у жировій тканині впливає на функціонування інших органів та з'ясування перебігу системного запалення при ожирінні.

Було продемонстровано, що індекс ожиріння збільшується у щурів, які отримували прогестерон, що пов'язано з підвищенням маси тіла. Отримані дані узгоджуються із результатами про збільшення маси жирової тканини у щурів, що страждають на ожиріння [55]. Також наявні дані про зв'язок між накопиченням макрофагів у жировій тканині та зростанням маси жирової тканини у відповідь на не тільки місцеве запалення, але і на системне [146]. Ми показали, що щури, які отримували прогестерон мають більш високу кількість статевого жиру в організмі (рис 3.3.), що позитивно корелює зі збільшенням продукції NO перитонеальними макрофагами та стимуляцією оксиген-залежного метаболізму, який оцінювали за допомогою NST-тест. Подібна кореляція між кількістю вісцерального жиру та деякими показниками метаболізму та запалення була показана у пацієнтів з надмірною вагою та пацієнтів з ожирінням з синдромом полікістозних яєчників [147]. Ідентифікація механізмів і молекул, що пов'язані із пластичністю макрофагів та активації шляхом поляризації макрофагів забезпечує основу для розробки діагностичних та терапевтичних стратегій.

Данні отриманні у результаті експериментів проведених на тваринних моделях свідчать про те, що процеси поляризації макрофагів залучені у механізми запалення тканин та резистентності до інсуліну при ожирінні. Також, існують припущення, що макрофаги які локалізовані не у жировій тканині створюють прозапальне середовище, яке виникає при ожирінні [148]. Також було встановлено, що ожиріння викликане висококалорійною дієтою

індукує розвиток запальних процесів ,не тільки у вісцеральних жирових клітинах молодих та старих мишей, а також у перитонеальних макрофагах молодих мишей, що свідчить про прискорення старіння [149]. міРНК miR-130b стимулює поляризацію по типу M1 та інгібує M2 поляризацію перитонеальних макрофагів при ожирінні, що викликане висококалорійною дієтою [150]. Проте, специфічну роль поляризації перитонеальних макрофагів при ожирінні, що викликане довготривалим введенням прогестерону, не було показано.

Для виявлення впливу довготривалого введення прогестерону на поляризацію макрофагів були проведені дослідження продукції прозапального медіатора монооксиду азоту (NO), аргіназну активність, продукцію активних форм кисню перитонеальними макрофагами.

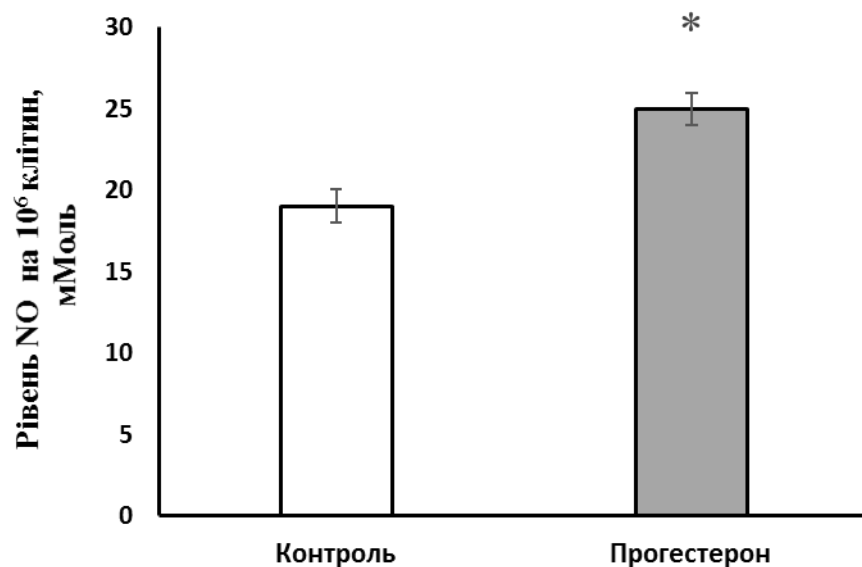


Рис. 3.23. Рівень продукції монооксиду азоту (NO) перитонеальними макрофагами щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\*-різниця достовірна у порівнянні із контролем,  $p < 0,05$

У ході досліджень спостерігали 45% ( $p < 0,05$ ) зростання рівня NO у щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів (рис 3.23.).

Ці данні показують, що перитонеальні макрофаги щурів після довготривалого введення прогестерону, із надмірною масою тіла, піддаються M1 поляризації, продукуючи більшу кількість NO. Таким чином, отримані результати узгоджуються із результатами попередніх досліджень під час яких було показано, що M1 поляризація макрофагів жирової тканини пояснює запалення низького ступеню при ожирінні [151].

Наступним етапом досліджень процесу запалення у щурів було визначення аргіназної активності перитонеальних макрофагів. Аргіназна активність є маркером M2 поляризації макрофагів. Збільшення її активності відображає поляризацію цих клітин у бік протизапального фенотипу [47].

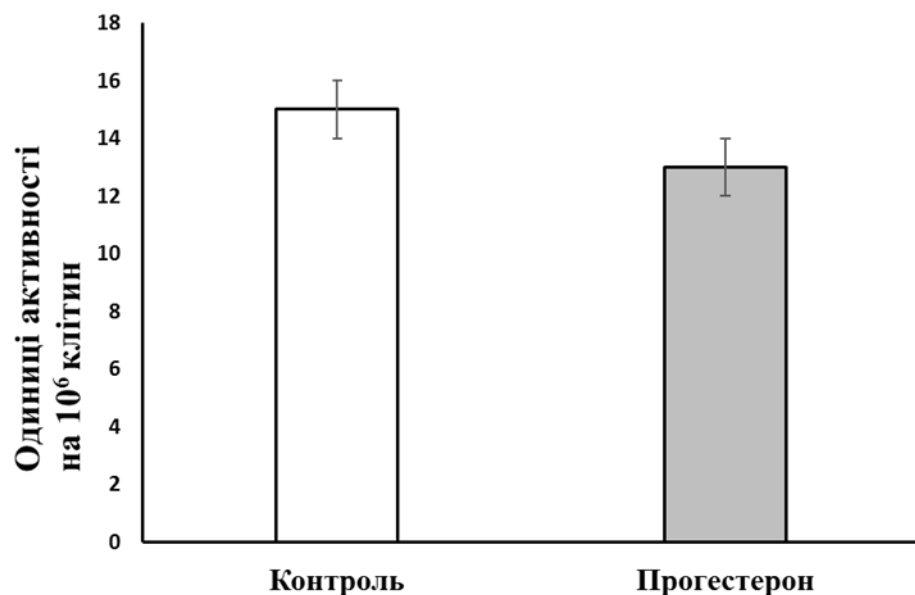


Рис 3.24. Аргіназна активність перитонеальних макрофагів щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

У результаті досліджень спостерігали зменшення на 12% аргіназної активності ( $p < 0,05$ ) перитонеальних макрофагів щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів (рис 3.24.).

Зниження активності аргінази перитонеальних макрофагів щурів, після введення прогестерону, можна порівняти із показниками збільшення продукції NO, що свідчить про розвиток запалення не тільки у жировій тканині, а у перитонеальній порожнині. Отримані дані узгоджуються з результатами, які свідчать про те, що запальна реакція при ожирінні супроводжується збільшенням M1 типу поляризації та зменшенням M2 типу поляризації макрофагів жирової тканини і перитонеальних макрофагів [49, 150, 151].

У цьому дослідженні було показано зміни у продукції маркерів поляризації макрофагів M1 типу(рівень NO) та M2 типу(активність аргінази) на моделі щурів із ожирінням, індукованим введенням прогестерону. Ми показали, що збільшення продукції NO перитонеальними макрофагами щурів, що отримували прогестерон, що свідчить про те, що ці макрофаги поляризуються по M1 типу(прозапальний тип). Збільшення продукції NO макрофагами жирової тканини спостерігається на тваринних моделях із ожирінням, що індуковане дієтою із високим вмістом жиру [152] та у дослідженнях людей [153]. Підвищена продукція NO спостерігалася а периваскулярній жировій тканині мишей із ожирінням, індукованим дієтою і передбачала адаптивну реакцію для збереження функціонування судин. Докази ролі NO при перебігу ожиріння можна отримати із декількох досліджень [154, 155]. Хронічне інгібування роботи NO-синтази полегшує симптоматику ожиріння у мишей із ожирінням, індукованим дієтою із високим вмістом жирів та зменшує запалення у жировій тканині [152]. Слабко виражене хронічне запалення пов'язане з підвищеною експресією NO-синтази білими кров'яними клітинами у дітей, які хворіють на ожиріння [153].

Широко відомо, що у запальній реакції при ожирінні беруть участь макрофаги не тільки жирової тканини, а і резидентні макрофаги [148]. Ми припускаємо, що системне запалення, яке викликане посиленням вивільненням у кров'яне русло факторів, які синтезуються адипоцитами, та цитокінів, впливає на поляризацію моноцитів та на резидентні макрофаги інших органів, таких як перитонеальна порожнина. Індукція запального статусу у перитонеальних макрофагах мишей із ожирінням, індукованим дієтою із високим вмістом жирів [149], а також стимуляція поляризації M1, пов'язані із ослаблення поляризації макрофагів по M2 типу [150].

Проте передбачається, що запалення у жировій тканині є специфічним, що підтверджується повідомленнями про відсутність у кількості макрофагів у інших метаболічно активних тканинах, таких як печінка і м'язи [146].

Отримані дані свідчать про незначне зниження аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів із ожирінням, яке індуковане введенням прогестерону, що супроводжується зниженням продукції NO макрофагами. Цей ефект можна пояснити роллю яку виконує шлях перетворення аргініну в імунній системі. Аргінін має широкий спектр функцій в імунних клітинах і метаболізується за двома шляхами: під час синтезу оксиду азоту NO-синтазою, перетворюючи аргінін у NO та цитрулін, або перетворення аргініну аргіназою, гідролізуючи його до орнітину та сечової кислоти. Ці метаболічні шляхи залучені до різних типів імунної відповіді [46, 47].

Попередні дослідження продемонстрували, що макрофаги, які експресують аргіназу, відіграють вирішальну роль у процесі загоєння ран на відміну від макрофагів, які продукують NO, які залучені у запалення, що виникає у відповідь на інфекцію [156]. Також було показано, що M1 макрофаги (експресують iNOS/NO) та M2 макрофаги (експресують аргіназу/орнітин) залученні у боротьбу із розвитком пухлин та у ріст пухлин, відповідно. Ряд досліджень, підкреслює протизапальні властивості аргінази та

вивчали її роль у перебігу запалення, яке виникає у відповідь на інфекцію, пригнічення протипухлинного імунітету [56, 157, 158].

Оскільки було продемонстровано зниження активності аргінази і підвищення продукції NO перитонеальними макрофагами щурів із ожирінням, яке індуковане введенням прогестерону, можливо ці макрофаги поляризуються по M1 типу. Оскільки макрофаги поляризуються по M1 або M2 типу у відповідь на їх локальне мікро оточення, гіпотетична M1 поляризація перитонеальних макрофагів може бути результатом їх реакції на запальні молекули (наприклад, цитокіни), що виділяються із жирової тканини. В даний час широко визнано, що місцеве запалення і наступний розвиток системного запалення є обов'язковим результатом ожиріння, що корелює зі зменшенням макрофагів M2 у жировій тканині [48].

Зниження активності аргінази також свідчить про інгібування здатності макрофагів поляризуватися у напрямку протизапального фенотипу M2. Більш того, макрофаги M2 типу не можуть бути залучені до імунної відповіді під час ожиріння, яке індуковане введенням прогестерону. Докази вказують на те, що макрофаги M2 типу не залучені до розвитку системного запалення і ці клітини переважають у худих осіб, що було показано у досліджах на мишах [151].

В даний час ожиріння визнається як фактор ризику розвитку раку. Ріст аденокарциноми протоків підшлункової залози у мишей із ожирінням, індукованим дієтою із високим вмістом жирів, пов'язаний із стимуляцією шляхів, що регулюють метаболізм азоту(таких як індукція мітохондріальної форми аргінази – ARG2). Також ризик розвитку аденокарциноми протоків шлункової залози корелює із індексом маси тіла [159]. Крім того, вважається, що макрофаги, які експресують аргіназу, беруть участь у рості пухлини [160]. На противагу цьому, у даній роботі показано, що активність аргінази знижується, що може свідчити про пригнічення поляризації макрофагів у напрямку фенотипу M2.

Оксидативний стрес який проходить у жировій тканині відіграє важливу роль у розвитку запалення слабкого ступеню при ожирінні. Так як, активні форми кисню (АФК) є широко визнаними маркерами оксидативного стресу, є важливим їх дослідження при розвитку ожиріння після введення прогестерону.

Після проведення досліджень не спостерігали різниці між показниками продукції активних форм кисню перитонеальними макрофагами щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів.

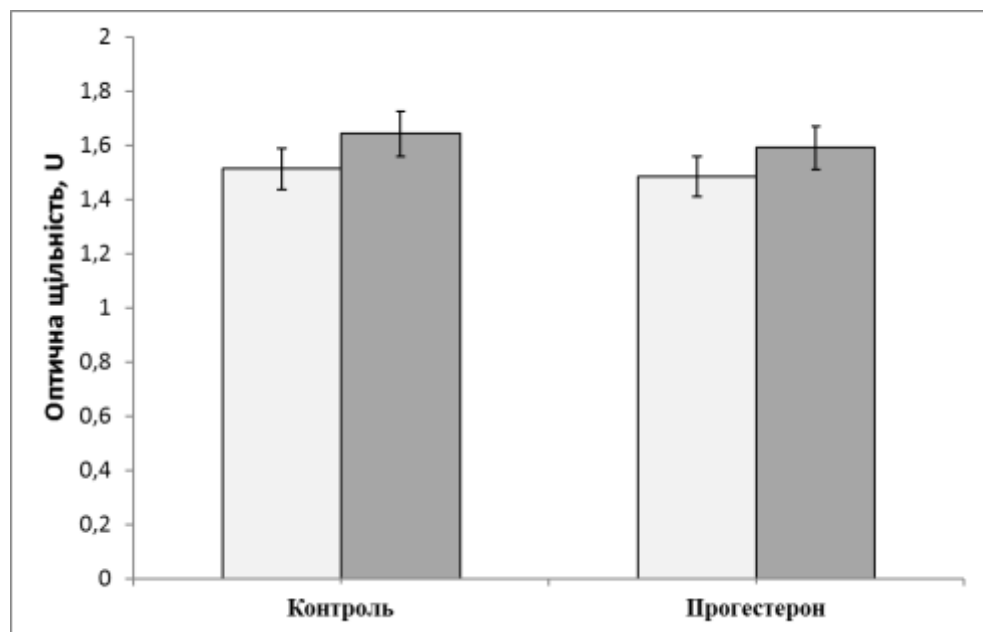


Рис 3.25. Рівень кисень-залежного метаболізму перитонеальних макрофагів щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Оскільки продукція АФК не була помітно збільшена у відповідь на введення прогестерону, ми припускаємо, що перитонеальні макрофаги не залучені у розвиток оксидативного стресу, який спостерігається під час запальної реакції при ожирінні (рис 3.25). Навпаки, стверджується, що окислювальний стрес у жировій тканині керує запаленням низького ступеню шляхом інфільтрації моноцитів крові [55].

У даній роботі спостерігали, що перитонеальні макрофаги щурів із ожирінням, яке індуковане введенням прогестерону, не проявляли підвищених рівнів активних форм кисню (АФК) та окисний стрес не бере участь у реакцію цих клітин на запалення при ожирінні. Тому ми припускаємо, що перитонеальні макрофаги сприяли проходженню запалення при ожирінні більшою мірою за рахунок синтезу молекул запалення NO внаслідок їх поляризації по M1 фенотипу, ніж при генерації АФК за рахунок окисного стресу.

## РОЗДІЛ 4

### **ВПЛИВ МЕЛАНІНУ НА ОСНОВНІ ОРГАНОМЕТРИЧНІ, БІОХІМІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДОВГОТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ ПРОГЕСТЕРОНУ**

Ожиріння у мільйонів людей збільшує ризики виникнення побічних захворювань, наприклад, метаболічного синдрому, цукрового діабету 2 типу, неалкогольної жирової хвороби печінки, м'язово-скелетних розладів та деяких форм раку [161].

В залежності від ступеню тяжкості ожиріння, при лікуванні ожиріння використовують декілька методів: контроль харчування(дієтотерапія), режиму фізичної активності, психологічну терапію та фармакологічні препарати. Принцип дії фармакологічних препаратів може спиратися на їх анорексогенну дію, блокування гідролізу та всмоктування ліпідів. Крім того, існують випадки, що при тяжких формах ожиріння не можливо обійтись без оперативного втручання у жирову тканину хворого, або у структуру шлунково-кишкового тракту.

Ожиріння, яке виникає під час розладів ендокринної системи та супутньої гормон-замісної терапії, чи при вживанні засобів контрацепції, які спираються на дію гормонів, потребує особливих методів лікування. Так як, такі види ожиріння виникають не тільки у наслідок надмірного споживання висококалорійної їжі, малорухливого способу життя то цей стан неможливо вилікувати лише застосуванням дієтотерапії та зміною фізичної активності хворих. Тим не менш, невід'ємним та обов'язковим етапом лікування ожиріння будь-якого генезу є спрямування хворого до споживання нормальної кількості калорій та до фізичної активності, яка забезпечить зміцнення серцево-судинної та опорної систем.

Антиоксиданти привертають особливу увагу як перспективний інструмент для зменшення окисного стресу і тому можуть бути препаратами при лікуванні ожиріння [11]. Останнім часом спостерігається великий інтерес до вивчення сприятливого впливу поліфенолів, які здатні запобігати розвитку ожиріння та хронічних порушень, пов'язаних з ожирінням. Поліфенолвмісні екстракти зеленого, чорного чаю та чаю улун зменшують рівень запальних процесів у мишей із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою, і зменшують кількість вісцерального жиру [13, 61]. Регулярно споживані поліфеноли, такі як катехіни зеленого чаю, епігалокатехінові галати, ресвератрол з червоного винограду і деяких ягід, а також куркумін із спеції *Curcuma longa* впливають на розвиток ожиріння, знижуючи масу людей і експериментальних тварин, жирову масу через гальмування ліполізу, зменшують показники запалення та інгібує проліферацію адипоцитів [63, 65, 67, 68].

Останні данні свідчать про те, що еумеланін із *Nadsoniella nigra* має виражений ефект проти проявів ожиріння, знижуючи кількість вісцерального жиру у щурів із безалкогольною хворобою печінки, індукованою глутаматом натрію. Меланін також впливає на відновлення рівню протизапального цитокіну IL-1 $\beta$  та на зменшення рівнів прозапальних цитокінів IL-10, TGF- $\beta$ , що свідчить про інгібування запальної реакції [162].

#### **4.1. Вплив меланіну на соматометричні показники щурів із ожирінням, яке викликане довготривалим введенням прогестерону**

Для визначення ефективності меланіну при лікуванні ожиріння в щурів оцінювали соматометричні показники (маса тіла), ІМТ та масу гонадального жиру у щурів яким одночасно вводили прогестерон та меланін.

Початкова вага тварин контрольної групи становила  $222 \pm 19,3$ г. Протягом 28 днів спостерігали зміни маси щурів. Вага щурів контрольної групи

наприкінці експерименту становила  $245 \pm 20,3\text{г}$ , що на 23г вище порівняно з вихідною масою тварин. Як було встановлено раніше, вага щурів після довготривалого введення прогестерону була набагато більшою ніж у щурів контрольної групи (початкова вага –  $236,7 \pm 8\text{г}$ , вага на кінець експерименту –  $311,6 \pm 11,4\text{г}$ ) ( $p < 0,05$ ). Початкова вага щурів, яким вводили прогестерон та меланін становила  $224 \pm 17,12\text{г}$ , та після 4 тижнів експерименту зросла до  $271,625 \pm 20,22\text{г}$  ( $p < 0,05$ ), а приріст маси тіла за цей час становив 47г (рис 4.1.).

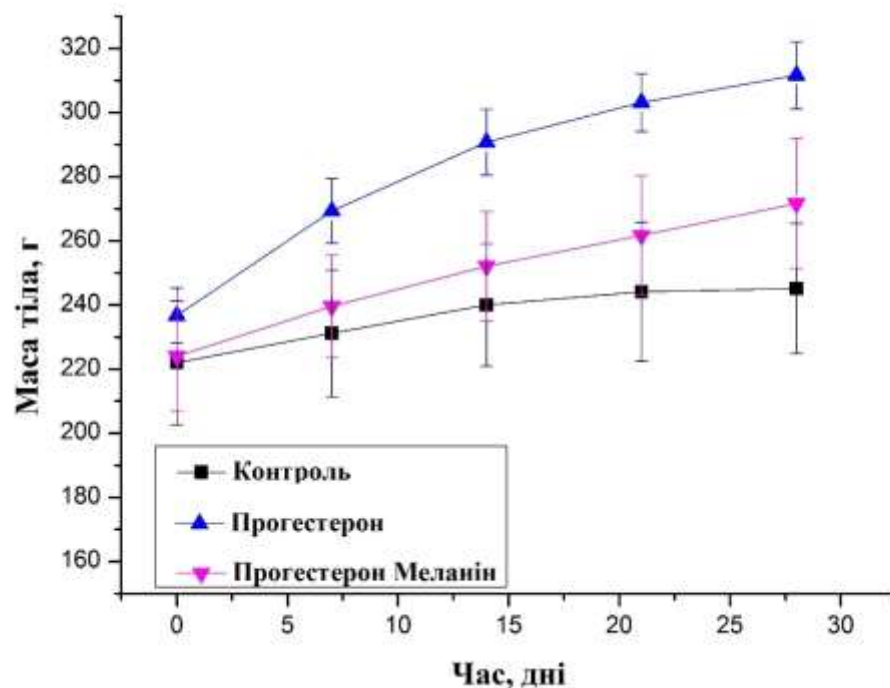


Рис. 4.1. Маса тіла щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Спостерігали, що збільшення маси тіла щурів, які отримували меланін, набагато нижче, ніж збільшення маси тіла щурів, які отримували тільки прогестерон (рис. 4.1.). Маса тіла у цих щурів після 28-денного введення меланіну та прогестерону була зменшена на 16%, ніж у групі, що одержувала тільки прогестерон ( $p < 0,05$ ). Слід зауважити, що маса тіла цих щурів була лише на 11% вищою відносно контрольних щурів ( $p < 0,05$ ), тоді як у щурів,

які отримували тільки прогестерон, вона була на 27% вищою ( $p < 0,05$ ). Наші дані показують, що профілактика меланіном може запобігти зростанню маси тварин, яке викликане довготривалим введенням прогестерону.

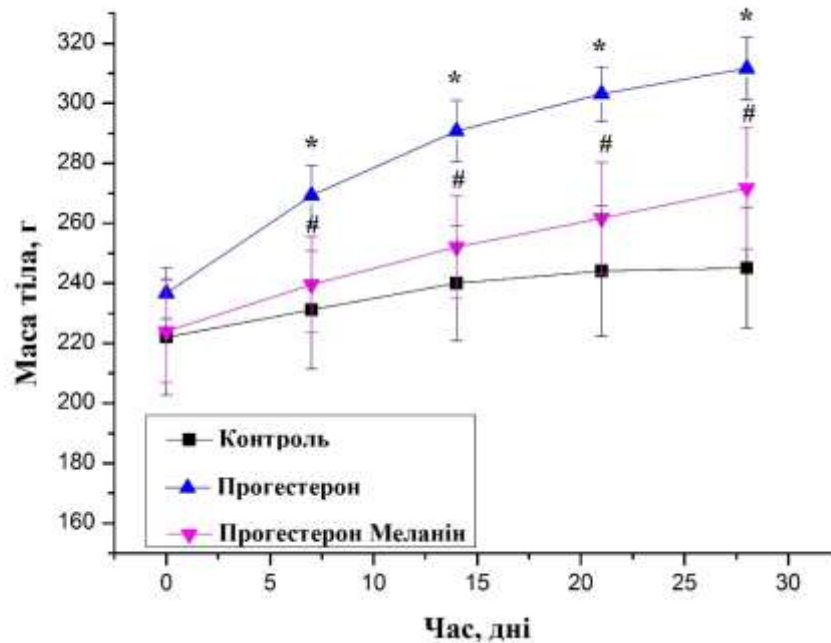


Рис. 4.2. Приріст маси тіла щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

У групі щурів після довготривалого введення прогестерону спостерігали зростання маси тіла на 74,8г. Порівнюючи цей показник із результатами отриманими при одночасному введенні меланіну та прогестерону, можна побачити, що введення меланіну зменшує приріст маси тіла у 1,57 рази ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, можна зробити висновок, що маса тіла у щурів, яким вводили прогестерон значно зростала у порівнянні із щурами контрольної групи тварин. При цьому профілактика ожиріння введенням меланіну, або

одночасне введення прогестерону та меланіну, зменшувало загальну масу тіла та приріст маси тіла після 4 тижнів проведення експерименту.

Для дослідження змін у відповідності ваги до зросту було проведено вимірювання індексу маси тіла. Індекс маси тіла щурів після 4 тижнів одночасного введення прогестерону та меланіну становив  $0,6 \pm 0,03$ . Показники ІМТ у тварин при введенні меланіну змінились до показників контрольної групи тварин. При цьому довготривале введення прогестерону призвело до підвищення ІМТ до  $0,92 \pm 0,05$  г/см<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ), що на 27% більше за показники контрольної групи тварин та групи тварин, яким вводили одночасно прогестерон та меланін (рис 4.3).

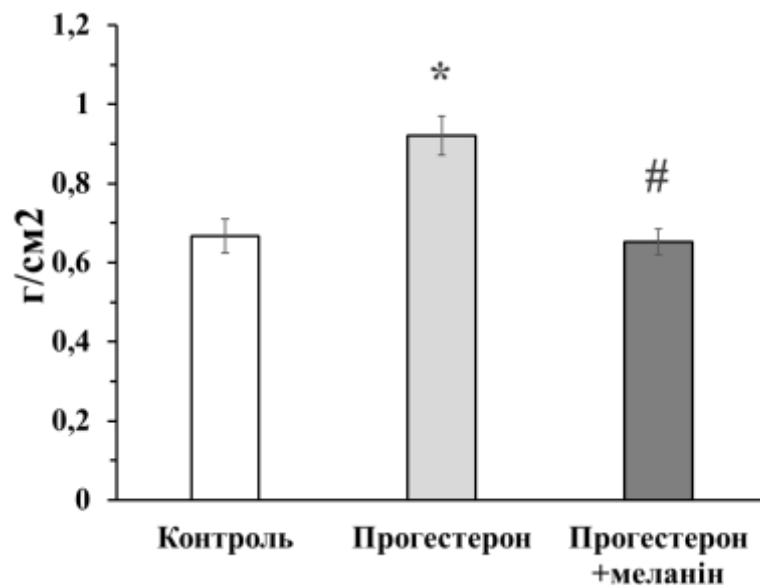


Рис. 4.3. Індекс маси тіла (г/см<sup>2</sup>) щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

Спираючись на отримані нами данні, ми можемо стверджувати, що профілактика меланіном прогестерон індукованого ожиріння нормалізує відповідність ваги до зросту у досліджуваних тварин у порівнянні з групою тварин за умов введення тільки прогестерону.

При корекції стану ожиріння обов'язковим фактором є зниження кількості вісцерального жиру у пацієнтів. У результаті вимірювань вісцеральної жирової тканини в області сечостатевої системи щурів було показано, що при одночасному введенні прогестерону та меланіну кількість жирової тканини щурів значно зменшувалась у 1,8 рази ( $p < 0,05$ ) і порівнянні із показниками щурів яким вводили тільки прогестерон (рис 4.4). При введенні прогестерону спостерігали відновлення значень цього показника до значень щурів контрольної групи.

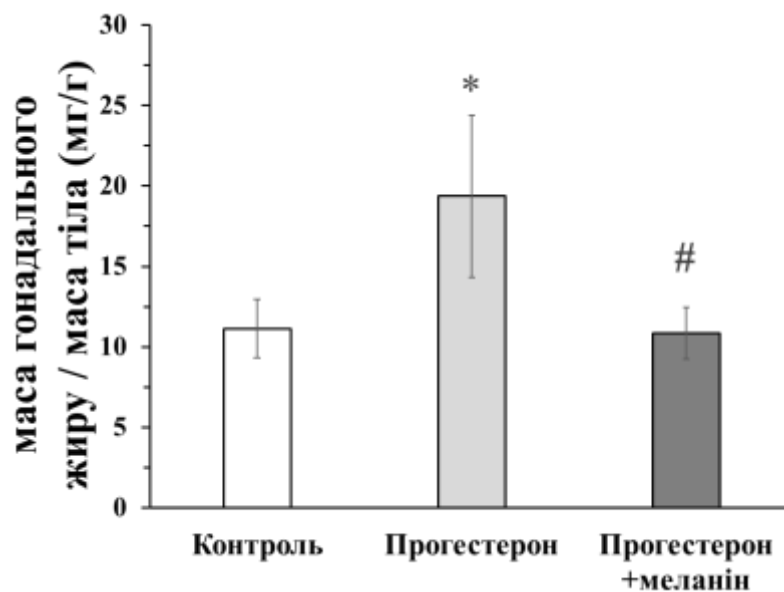


Рис. 4.4. Маса гонадального жиру щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

Як раніше було описано, вісцеральний жир екскретує у кров'яне русло ретинол-зв'язуючий білок 4, який підвищує резистентність до інсуліну, що призводить до розвитку діабету 2 типу та ожиріння [116]. Також, накопичення в організмі жирової тканини призводить до активації ліполізу, транспорту вільних жирних кислот у кров'яне русло. Вільні жирні кислоти у свою чергу знижують утилізацію глюкози печінкою, що спричиняє збільшення секреції інсуліну та розвитку компенсаторної гіперінсулінемії.

#### **4.2. Вплив меланіну на харчову поведінку та обмін серотоніну у головному мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону**

Під час попередніх етапів досліджень ми побачили, що довготривале введення прогестерону значно вплинуло на харчову поведінку щурів. Надмірне споживання висококалорійної їжі та недостатній рівень фізичної активності є основними причинами розвитку ожиріння [163]. Як було описано раніше, надлишок прогестерону в організмі призводить до збільшення маси тіла, збільшення кількості вісцерального жиру, особливо у районі сечостатевої системи тварин. Таким чином у результаті впливу на кількість споживаної їжі та на ріст жирової тканини довготривале введення прогестерону є потужним індуктором розвитку ожиріння. В результаті цього є важливим дослідження методів корекції такого впливу прогестерону на організм. Так як меланін значно вплинув на корекцію маси тіла щурів яким вводили прогестерон, то важливим етапом вивчення механізмів дії меланіну на корекцію ваги є дослідження його дії на харчову поведінку.

Для дослідження харчової поведінки було проведено щоденні зважування спожитого корму щурами дослідних груп.

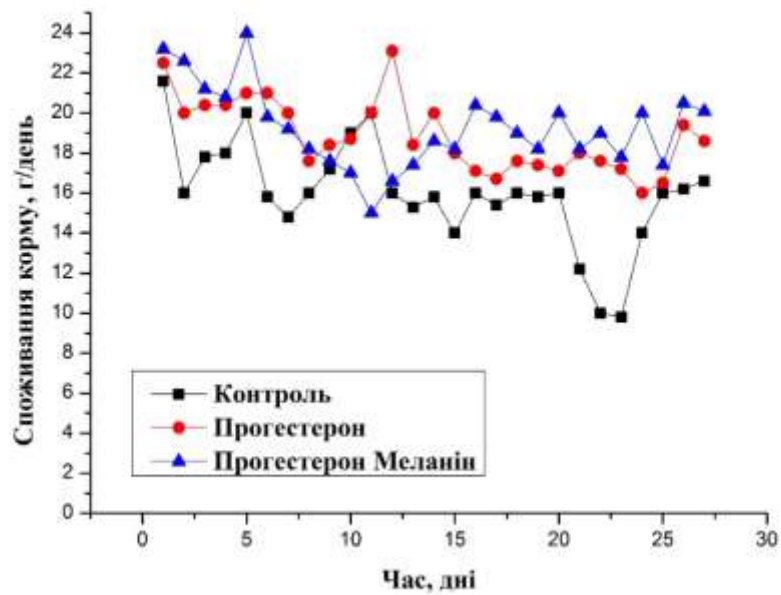


Рис. 4.5. Споживання корму на добу щурами за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

У результаті досліджень встановили, що середнє споживання корму щурами груп яким вводили прогестерон та меланін були більшими за показники контрольної групи тварин, які споживали 16г на добу (рис 4.5). Щури групи за умов довготривалого введення прогестерону споживали в середньому 19г корму щоденно, а щури групи за умов одночасного введення прогестерону та меланіну споживали в середньому 19г відповідно ( $p < 0,05$ ).

Спираючись на отриманні результати, можна стверджувати, що введення меланіну не впливає на кількість спожитого корму щурами які хворіють ожирінням індукованим прогестероном. Як було описано раніше, надмірне споживання корму щурами за умов довготривалого введення прогестерону, може свідчити про те, що введення прогестерону впливає на центри ситості у дослідних тварин. Таке підвищене споживання корму вказує на ймовірний вплив прогестерону на відсутність відчуття насичення і, як наслідок, до збільшення вживання їжі. Основними медіаторами, які спливають

на відчуття насичення, центр ситості, є відповідає серотонінергічна сигнальна система та лептин [164]. Механізмом даних проявів є те що, при переїданні центр ситості (вентромедіальне ядро гіпоталамуса) адаптується до більш високих рівнів глюкози, інсуліну і лептину. Внаслідок цього знижується його чутливість і при споживанні надмірної кількості їжі відбувається недостатнє гальмування центру голоду. Крім того, жирова тканина синтезує гормон лептин, який відповідає за регуляцію апетиту і енергетичного метаболізму. При зв'язуванні лептину з відповідним рецептором відбувається внутрішньоклітинний сигналінг та виділення серотоніну в центрі насичення, який, у свою чергу, сигналізує мозку про споживання достатньої кількості їжі, після чого знижується апетит.

Аналізуючи отриманні дані, можна припустити, що меланін не впливає на центри насичення та голоду, які контролюються сигналінгом серотоніну та лептину, що не відображається на кількості спожитої їжі. Тим не менш, механізм впливу меланіну на данні процеси залишається не до кінця зрозумілим. Згідно нашим попереднім результатам, довготривале введення прогестерону впливає на збільшення кількості споживаної їжі дослідними тваринами, що означає, що прогестерон прямо, або опосередковано впливає на серотонінергічну систему та, відповідно, харчову поведінку. Механізми на які впливає прогестерон – активація синтази жирних кислот, збільшення маси тіла та вісцеральної жирової тканини, показники ліпідного профілю, спричиняють до тяжких ускладнень та розвитку ожиріння. При досліджуванні нами впливу меланіну при таких станах, ми побачили, що тварини, яким одночасно вводили прогестерон та меланін, значно втрачали вагу у порівнянні із тваринами які отримували тільки прогестерон, але при цьому споживали подібну кількість корму (більше ніж кількість корму, яка споживалась контрольною групою тварин).

Таким чином, спираючись на отриманні результати, щодо харчової поведінки досліджуваних тварин, наступним етапом роботи було дослідження

впливу меланіну на механізми, які впливають на харчову поведінку, а саме на вміст серотоніну у головному мозку.

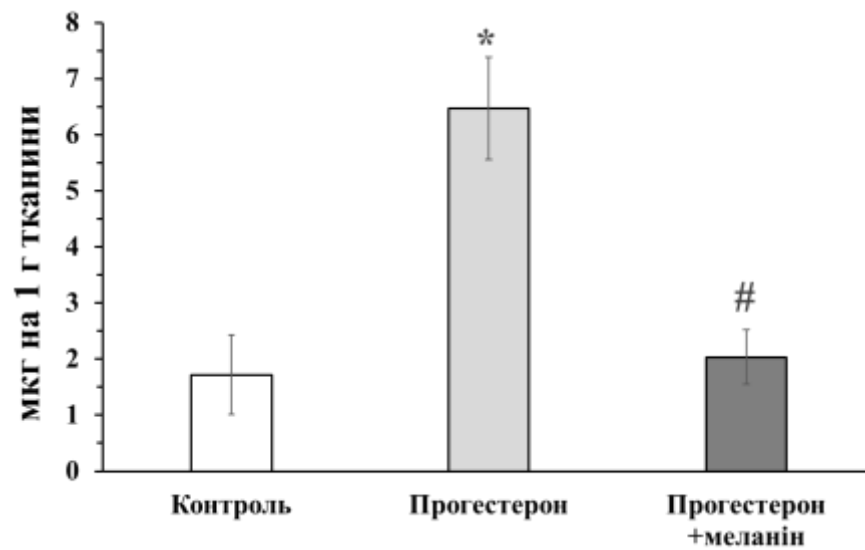


Рис. 4.6. Вміст серотоніну у гомогенаті головного мозку щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

В результаті досліджень ми спостерігали підвищення рівня серотоніну у головному мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону майже у 4 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з показниками контрольної групи тварин. При одночасному введенні прогестерону та меланіну рівень серотоніну значно зменшувався і був у 1,2 рази більшим за показники контрольної групи тварин (рис 4.6).

Відомо, що серотонін відповідає за емоційний стан пацієнтів та його понижений рівень призводить до розвитку депресії. У свою чергу надмірне споживання їжі під час депресії спричинює розвиток ожиріння. Було показано, зворотній зв'язок, при якому у хворих із вродженими або набутими порушеннями у функціонуванні серотонінергічної системи при голодуванні виникали гострі депресивні стани [165]. У таких ситуаціях при нетривалому

голодуванні у хворих розвивалась депресія і вони споживали надмірну кількість їжі знаходячись під впливом цього стану.

Підсумовуючи отримані раніше результати, можна припустити, що підвищений рівень серотоніну у щурів за умов довготривалого введення прогестерону залежить від кількості триптофану, амінокислоти із якої він утворюється. Відомо, що першою реакцією синтезу серотоніну із триптофану є його гідроксилювання ферментом триптофан гідроксилазою. Було показано, що оксидативний стрес, параметри якого значно посилюються у хворих на ожиріння, є причиною зниження активності ТрГ за рахунок зниження біодоступності кофактора даного фермента - тетрагідробіоптерина (BH<sub>4</sub>), біосинтез якого знижений внаслідок розвитку оксидативного стресу. Меланін виконує роль потужного антиоксиданту, зв'язуючи у клітинах продукти спонтанного окиснення. Таким чином, ми припускаємо, що вплив меланіну на функціонування серотонінергічної системи можна пояснити його антиоксидантними властивостями та нормалізацією біохімічних процесів організму.

Одним із принципів лікування ожиріння та проблем пов'язаних із надмірною вагою є зменшення калорій споживаних із їжею. Найбільша кількість калорій постачається у складі ліпідів та вуглеводів. Згідно з цими даними, у терапії та лікуванні ожиріння у якості одного із засобів лікування використовують препарати, які блокують всмоктування ліпідів у шлунково-кишковому тракті. При цьому зменшується отримувана організмом кількість ліпідів, і відповідно кількість калорій. Недоліком при використанні таких препаратів, є те що вони повністю блокують всмоктування ліпідів, які потрібні організму для синтезу гормонів, вітамінів, сигнальних молекул, функціонування мембран. Крім того, використання таких препаратів викликає зміну консистенції стулу, що супроводжується дискомфортом та погіршенням якості життя пацієнтів [166].

Дослідження ліпідного профілю є важливим аналізом при дослідженні процесів ожиріння, серцево-судинних хвороб, діабету. Інформацію отриману під час аналізу рівнів ліпідів пацієнтів використовуються як підставу для застосування медичних препаратів, або контролю ефективності терапії цих захворювань. Наприклад, зниження рівнів ЛПНЩ значно зменшує ризики виникнення хвороб серця. Також мішенями для фармацевтичних засобів при лікуванні перерахованих вище захворювань є зниження підвищеного рівня тригліцеридів та підвищення рівнів ЛПВЩ [167]. Тому важливим етапом дослідження потенційного терапевтичного впливу меланіну на ожиріння, що індуковане введенням прогестерону, є вивчення його впливу на показники ліпідного профілю.

	Холестерол (ммоль/л)	Тригліцериди (ммоль/л)	ЛПНЩ (ммоль/л)	ЛПВЩ (ммоль/л)	ЛПДНЩ (ммоль/л)
Контроль	2,12±0,21	1,06±0,24	0,15±0,02	2,20±0,31	0,20±0,04
Прогестерон	3,12±0,52*	2,12±0,47*	0,23±0,01*	1,51±0,20*	0,45±0,01*
Прогестерон +меланін	2,20±0,36 <sup>#</sup>	1,25±0,28 <sup>#</sup>	0,19±0,01* #	2,2±0,30 <sup>#</sup>	0,20±0,01 <sup>#</sup>

Таблиця 2. Концентрації ліпідів сироватки крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

При одночасному введенні прогестерону та меланіну щурам на протязі 28 днів спостерігали значні відмінності між показниками цих тварин та тварин яким вводили тільки прогестерон. Результати впливу меланіну на показники ліпідного профілю надані у Таблиці 2. Після проведених вимірювань ми спостерігали, що введення меланіну спричинює зменшення рівнів холестеролу, тригліцеридів, ЛПНЩ, ЛПДНЩ у порівнянні із показниками групи щурів із прогестерон індукованим ожирінням. Також спостерігали

збільшення рівнів ЛПВЩ ( $p < 0.05$ ). При одночасному введенні прогестерону та меланіну всі показники ліпідного профілю наближено відновлювались до значень щурів контрольної групи.

Як обговорювалось раніше, підвищені рівні тригліцеридів, атерогенні ЛПНЩ та ЛПДНЩ є характерними при ожирінні, метаболічному синдромі та діабеті 2 типу, і є факторами ризику захворювань серцево-судинної системи – атеросклерозу та ішемічної хвороби серця [25]. Крім того, такі показники є характерними при ожирінні, яке спричинене незбалансованим харчуванням із великою кількістю ліпідів.

#### **4.3. Вплив меланіну на показники запалення у щурів при прогестерон-індукованому ожирінні**

Ідентифікація механізмів і молекул, що пов'язані із пластичністю макрофагів та активації шляхом поляризації макрофагів забезпечує основу для розробки діагностичних та терапевтичних стратегій. Тому наступним етапом нашого дослідження було вивчення ефективності меланіну синтезованого антарктичними чорними дріжджами *Nadsoniella nigra* штам X-1 у профілактиці ожиріння. Вивчення його впливу на запальні реакції при індукованому прогестероном ожирінні представляє значний інтерес для розробки потенційних стратегій профілактики, спрямованих на зниження клінічних наслідків замісної гормональної терапії. У ряді досліджень було представлено антиоксидантні та протизапальні властивості меланіну [89].

Також дані дослідження передбачають вивчення модуляції поляризації макрофагів щурів із ожирінням, яке індуковане введенням прогестерону у відповідь на меланін. Застосування меланіну знижує рівень оксиду азоту, який виробляється перитонеальними макрофагами. Ми припускаємо, що меланін запобігає активації макрофагів у відповідь на слабо виражене хронічне запалення і тому може мати протизапальні властивості. Ці дані узгоджуються

із попередніми дослідженнями, у яких показано, що меланін знижує рівень прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і відновлює рівень протизапальних цитокінів (IL-10, TGF- $\beta$ ) у сироватці крові щурів із безалкогольною хворобою печінки, яка викликана глутаматом натрію [162].

В ході проведених досліджень було показано ефект меланіну *Nadsoniella nigra* штаму X-1 у боротьбі із ожирінням [162]. Меланін впливає на зменшення кількості вісцерального жиру у щурів, що страждали на неалкогольну жирову хворобу печінки стимульовану споживанням глутаматом натрію. Раніше не було показано впливу меланіну на інші моделі тварин при яких виникає ожиріння та механізм його дії не є з'ясованим.

Для виявлення впливу довготривалого введення прогестерону та введення меланіну на поляризацію макрофагів були проведені дослідження синтезу прозапального медіатора монооксиду азоту (NO), аргіназну активність, продукцію активних форм кисню перитонеальними макрофагами.

Були визначені рівні синтезу монооксиду азоту (NO) перитонеальними макрофагами щурів контрольної групи, групи щурів, яким вводили у шлунок розчин меланіну протягом 28 днів, групи щурів, яким вводили підшкірно розчин із прогестероном протягом 28 днів та групи щурів, яким одночасно вводили розчин із прогестероном та меланіном протягом 28 днів (Прогестерон+меланін).

У ході досліджень спостерігали, 45% ( $p < 0.05$ ) зростання рівня NO у щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів (рис 4.7.).

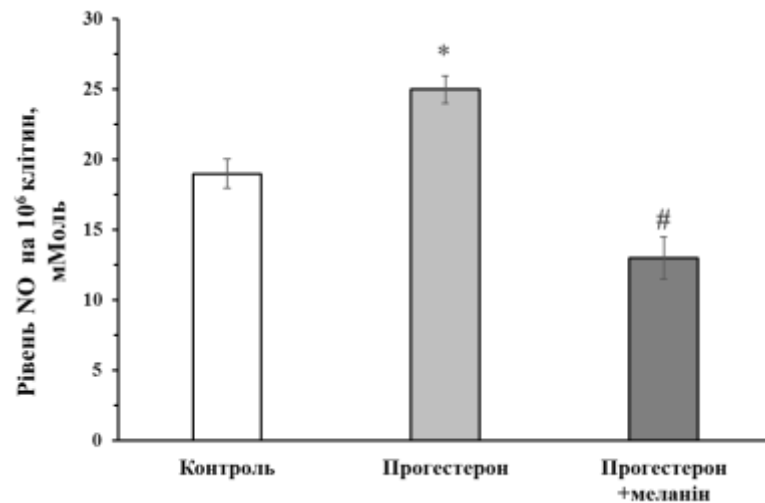


Рис. 4.7. Продукція моноξειду азоту (NO) перитонеальними макрофагами щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

Показники рівнів NO при одночасному введенні меланіну та прогестерону щурам були у 2,15 рази ( $p < 0.05$ ) менші за аналогічні показники після введення тільки прогестерону. Рівень NO цієї групи був на 48% ( $p < 0.05$ ) меншим у порівнянні із показником контрольної групи. Слід зазначити, що меланін більш ефективно впливає на продукцію NO макрофагами щурів, що страждають на ожиріння ніж у здорових щурів.

Ці данні показують, що перитонеальні макрофаги щурів після довготривалого введення прогестерону, із надмірною масою тіла, піддаються M1 поляризації, продукуючи більшу кількість NO. Також ми припускаємо, що меланін пригнічує M1 поляризацію перитонеальних макрофагів, продукуючи прозапальні медіатори, такі як NO. Тому меланін із *Nadsoniella nigra* штаму X-1 може проявляти протизапальні властивості. Раніше було показано, що меланін впливав на зменшення рівнів прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  сироватки крові щурів [162].

Наступним етапом досліджень процесу запалення у щурів було визначення аргіназної активності перитонеальних макрофагів. Аргіназна активність є маркером M2 поляризації макрофагів. Збільшення її активності відображає поляризацію цих клітин у бік протизапального фенотипу [47].

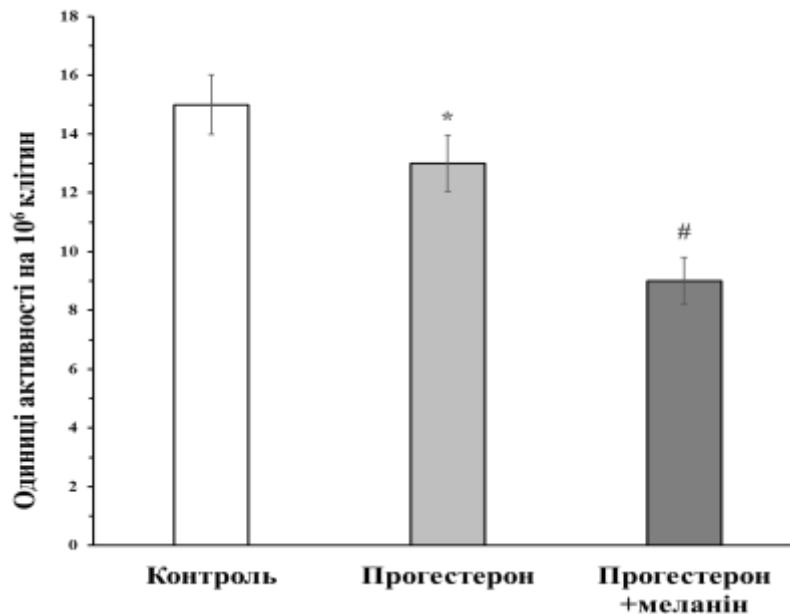


Рис. 4.8. Рівень аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

У результаті досліджень спостерігали зменшення на 12% аргіназної активності перитонеальних макрофагів щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів (рис. 4.8.). Активність ферменту у групі Прогестерон+меланін була на 28% ( $p < 0,05$ ) менша ніж у щурів після введення тільки прогестерону.

Зниження активності аргінази перитонеальних макрофагів щурів, після введення прогестерону, можна порівняти із показниками збільшення продукції NO, що свідчить про розвиток запалення не тільки у жировій тканині, а у перитонеальній порожнині.

Попередні дослідження показали, що розвиток оксидативного стресу пов'язаний із накопиченням вісцерального жиру і метаболічним синдромом. Підвищений рівень активних форм кисню встановлено у плазмі крові та у білій жировій тканині мишей, що страждають на ожиріння [12].

Також наявні дані про зв'язок між окислювальним стресом і запальною реакцією при ожирінні. Повідомлялося, що продукція адипокінів у жировій тканині збільшує виробництво активних форм кисню [168, 169].

Оксидативний стрес у жировій тканині відіграє важливу роль у розвитку запалення слабого ступеню при ожирінні. Так як, активні форми кисню (АФК) є широко визнаними маркерами оксидативного стресу, є важливим їх дослідження при розвитку ожиріння після введення прогестерону.

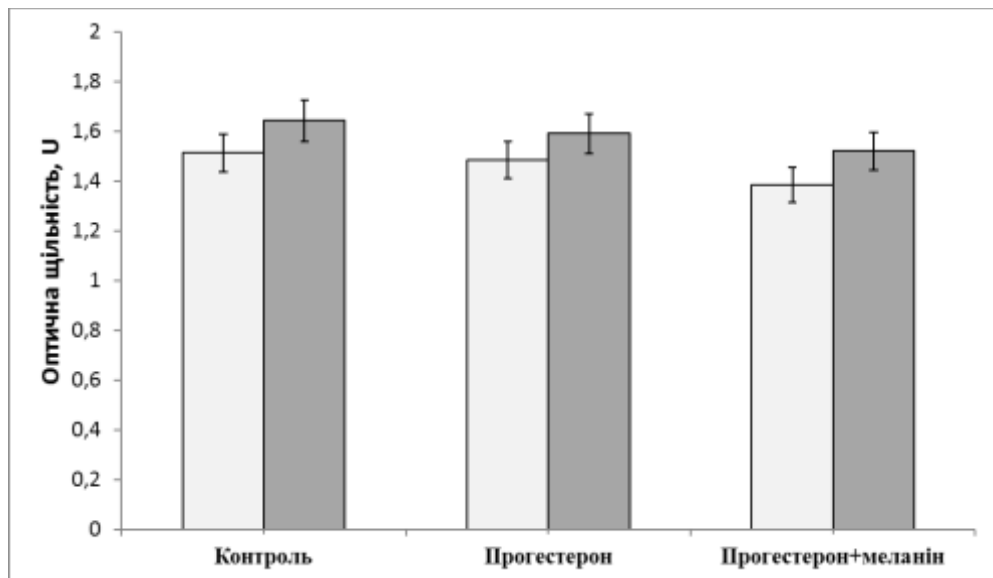


Рис. 4.9. Рівень кисень-залежного метаболізму перитонеальних макрофагів щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

Після проведення досліджень не спостерігали різниці між показниками продукції активних форм кисню перитонеальними макрофагами щурів після довготривалого введення прогестерону у порівнянні із контрольною групою щурів. Рівень АФК у щурів, яким вводили прогестерон та меланін, зменшився

на 9% у порівнянні із тваринами, яким вводили лише прогестерон, але дане зменшення не є статистично значущим.

У той час, як введення меланіну зменшує продукцію оксиду азоту перитонеальними макрофагами, рівень якого був підвищений у щурів, що страждають на ожиріння, цей препарат знижував активність аргінази, яка була менш активна у щурів, яким вводили прогестерон (рис 4.9.). Цей несподіваний ефект меланіну можна пояснити відповідно до ролі M2 макрофагів у розвитку пухлин, який був згаданий раніше: аргіназа бере участь у пригніченні протипухлинного імунітету [160], а активність аргінази підвищена у клітинах пухлин, пов'язаних із ожирінням [159]. Враховуючи те, що меланін пригнічує аргіназну активність у щурів із ожирінням, ми припускаємо, що його можливий сприятливий ефект може бути пов'язаний з профілактикою потенційного розвитку раку. Згідно деяким дослідженням, меланін проявляв протипухлинні властивості [92]. Крім того, завдяки своїм антиоксидантним властивостям меланін може ослаблювати виробництво активних форм кисню не тільки у жировій тканині, але і в інших клітинах, включаючи перитонеальні макрофаги, що полегшує місцеве і, отже, системне запалення.

Потенційна гастропротекторна активність меланіну була продемонстрована в недавніх дослідженнях: меланін знижував рівень стрес-індукованих уражень шлунку, а також посилював експресію eNOS і продукцію NO, подібно до інших поліфенолів [170].

Можливий сприятливий ефект препарату меланіну на продукування оксиду азоту та активних форм кисню перитонеальними макрофагами щурів із ожирінням відображає його антиоксидантні та протизапальні властивості. Широко визнано, що ожиріння пов'язане із запаленням у жировій тканині, що може викликати окисний стрес. Як активні форми кисню, що виробляються адипоцитами, так і оксид азоту, вважаються основою запалення при ожирінні [171]. У відповідь на гіпоксію гіпертрофовані адипоцити проявляють підвищений синтез активних форм кисню мітохондріями, що призводить до

некрозу жирової тканини. Окисне ураження адипоцитів супроводжується посиленою секрецією хемокінів, які стимулюють рекрутування макрофагів до жирової тканини [Page, 2010].

Існують докази, що підтверджують поліпшення імунної функції при ожирінні внаслідок зменшення окислювального стресу та послаблення запалення при споживанні екстракту омегранату та фізичного навантаження при ожирінні, яке індуковане дієтою із високим вмістом жирів. Спостерігали зменшення секреції запальних цитокінів та маркерів окислювального стресу [Zhao, 2016].

Докази протизапального ефекту меланіну при прогестерон-індукованому ожирінні можна отримати з досліджень ролі меланіну і меланогенезу в жировій тканині [Randhawa, 2009]. Що стосується підвищеної кількості меланіну у жировій тканині у пацієнтів з ожиріння, було висунуто гіпотезу, що ендогенний пігментний меланін може бути залучений до захисного механізму в адипоцитах шляхом позбавлення від активних форм кисню та зниження запалення [172]. Крім того, було продемонстровано, що аденогіпофізарний  $\alpha$ -меланоцит-стимулюючий гормон пригнічує запальну реакцію у жировій тканині шляхом інгібування сигнального шляху Akt/JNK [173] і також пригнічує шлях mTOR асоційований апоптоз адипоцитів, який активується активними формами кисню [174]. У зв'язку з цим аденогіпофізарний  $\alpha$ -меланоцит-стимулюючий гормон вважається новим потенційним терапевтичним засобом для лікування ожиріння.

Встановлено стійку кореляцію між показниками запалення та окислювальним стресом: продукція адипокінів у жировій тканині стимулює генерацію активних форм кисню, що, у свою чергу, індукує виробництво адипокінів [169]. Зниження рівня антиоксидантних ферментів та джерел антиоксидантного захисту також посилює процеси окисного стресу у жировій тканині, що вважається причиною розвитку системного запалення [168, 169]. При цьому рівень антиоксидантів знижується не тільки у жировій тканині, але

і у сироватці людей, що страждають на ожиріння [175]. Крім того, показано, що активні форми кисню знижують експресію адипонектину. Це свідчить про те, що лікування антиоксидантами або інгібіторами активних форм кисню може відновлювати рівень адипокінів. Таким чином споживання та терапія антиоксидантами зменшує ризики виникнення ускладнень пов'язаних з ожирінням та окисним стресом.

Потрібно зауважити, що меланін синтезується не тільки у шкірі, але і у жировій тканині і вважається відповідальним за полегшення оксидативного стресу, що призводить до ослаблення запальних процесів.

Ми припускаємо, що зменшення рівню оксидативного стресу у жировій тканині і, можливо, в інших органах щурів, що страждають на ожиріння, є причиною ефекту меланіну на рівні цитокінів у крові. Внаслідок антиоксидантних властивостей поліфенол меланін може знижувати рівень запалення не тільки у жировій тканині, але впливати і на системне запалення. Наша гіпотеза узгоджується із даними які демонструють, що поліфенольні сполуки з антиоксидантними властивостями, які зустрічаються у природі, впливають на ожиріння у людей та у тваринних моделей із ожирінням, яке викликане висококалорійною дієтою [176]. Наприклад, такий поліфенол зеленого чаю, як ресвератрол, зменшує продукцію адипокінів адипоцитами *in vivo* та *in vitro*, що може сприяти його протизапальному ефекту [177, 178]. Також катехіни зеленого чаю пригнічують проліферацію адипоцитів, ліпогенез, стимулюють ліполіз і зменшують ступінь запалення у дослідженнях людей та тваринних моделей із ожирінням, яке індуковане висококалорійною дієтою [67].

Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу меланіну із антарктичних дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X1 на продукцію прозапальних (IL-1 та IFN- $\gamma$ ) і протизапальних (IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ ) цитокінів у сироватці крові щурів із ожирінням, яке індуковане введенням прогестерону.

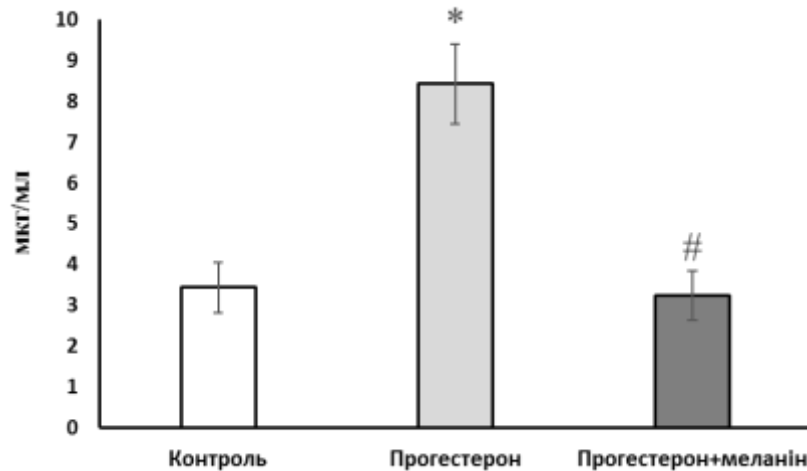


Рис. 4.10. Концентрація прозапального цитокіну ІЛ-1 у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

Концентрації прозапальних цитокінів ІЛ-1 та ІFN- $\gamma$  у сироватці крові щурів із ожирінням, індукованим введенням прогестерону були підвищені у 2,5 та 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), відповідно у порівнянні із щурами контрольної групи. Це свідчить про розвиток системного запалення у відповідь на прогестерон-індуковане збільшення ваги. При подальшому лікуванні меланіном результати відновлювалися до значень, які спостерігали у контрольній групі щурів (рис.4.10 та рис. 4.11.).

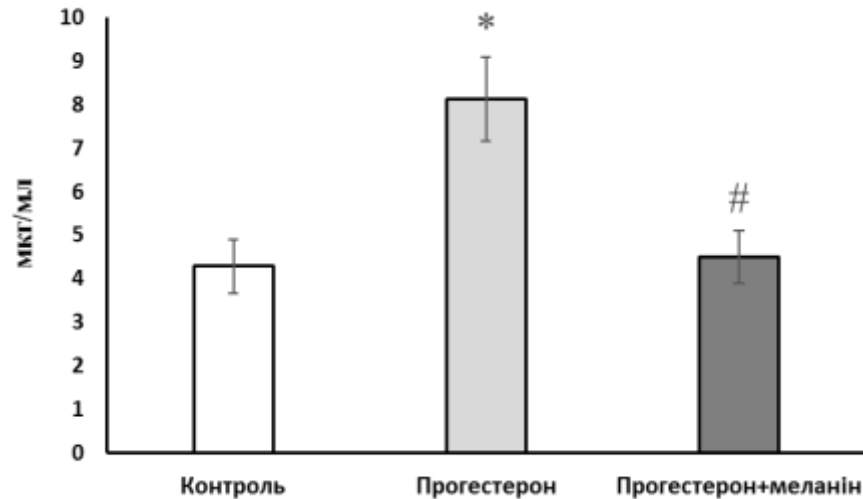


Рис. 4.11. Рівень прозапального цитокіну IFN- $\gamma$  у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

Очевидно, що зниження рівнів протизапальних цитокінів сироватки крові (IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ ) корелювало з підвищенням рівнів прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- $\gamma$ ), що також вказує на розвиток системного запального процесу.

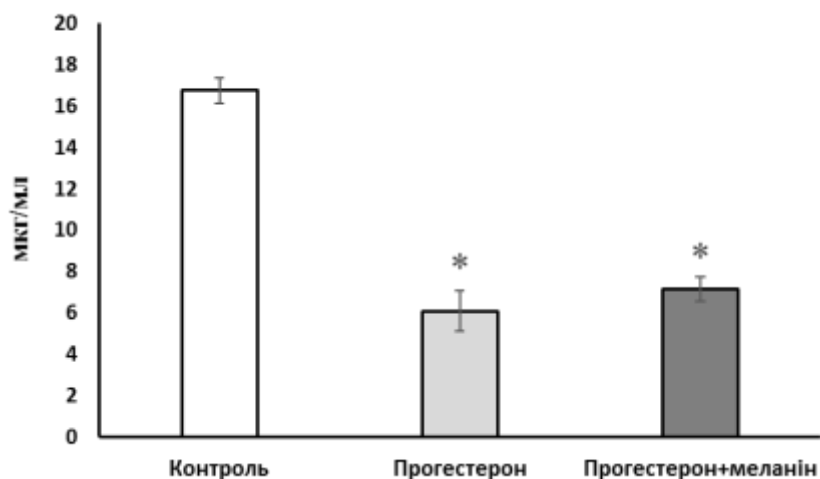


Рис. 4.12. Рівень протизапального цитокіну IL-4 у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Введення прогестерону знижувало рівні протизапальних цитокінів IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  у сироватці крові щурів у 2.26, 2.2 та 2 рази ( $p < 0,05$ ), відповідно, у порівнянні з результатами контрольної групи щурів. Лікування меланіном після довготривалого введення прогестерону призвело до часткового відновлення концентрацій цитокінів IL-4 на 28%, IL-10 на 38% та TGF- $\beta$  на 43% ( $p < 0,05$ ). Не зважаючи на таку позитивну тенденцію рівні протизапальних у щурів цитокінів після лікування меланіном не відновились до значень контрольної групи щурів (рис. 4.12, 4.13, 4.14.).

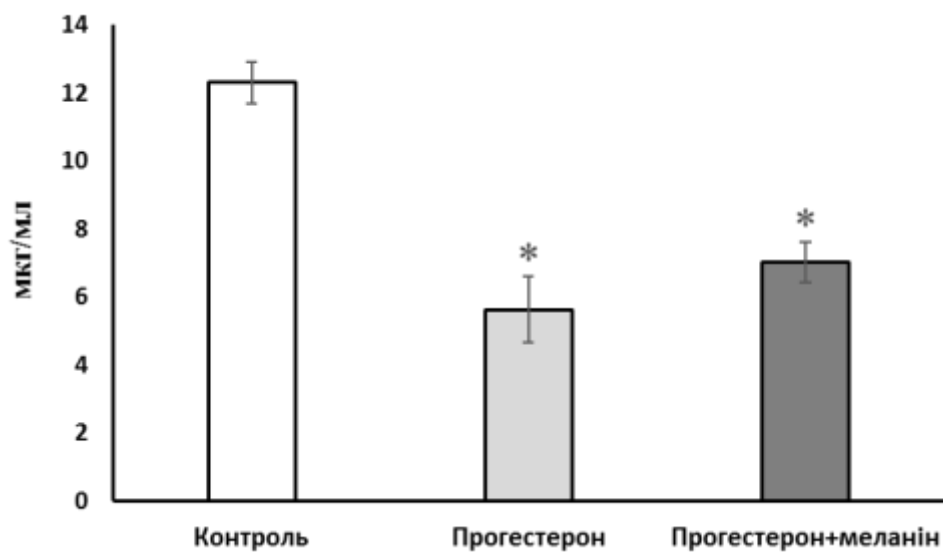


Рис. 4.13. Рівень протизапального цитокіну IL-10 у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем;

Порівнюючи отриманні результати із літературними даними, підвищення рівня циркулюючих цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) спостерігалось у людей та у тварин із ожирінням та у суб'єктів, які страждали на супутні на ожиріння хвороби. При цьому запалення при ожирінні супроводжується підвищенням рівнів інших маркерів запалення, таких як С-реактивний білок [139], альбумін, фібриноген, а також рецепторів до TNF та лептину [179].

Однак, попередні дані свідчать, що підвищення рівнів прозапальних цитокінів сироватки крові не корелює із їх рівнями у периферійних мононуклеарних клітинах крові, що означає, що ці клітини не могли бути джерелом цитокінів у осіб із ожирінням [140].

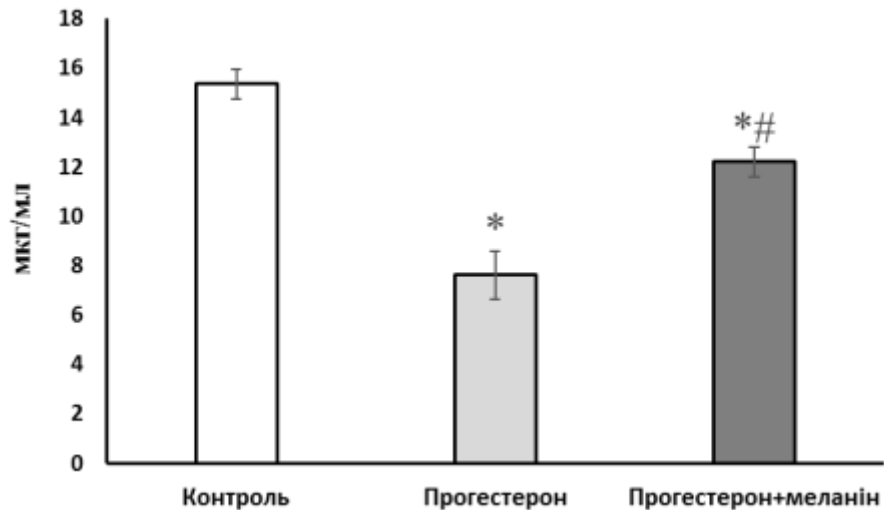


Рис. 4.14. Рівень протизапального цитокіну TGF- $\beta$  у сироватці крові щурів за умов розвитку експериментальної моделі ожиріння індукованого введенням прогестерону та сумісного введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$ ).

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою Прогестерон

У даному дослідженні ми продемонстрували підвищення рівнів прозапальних цитокінів IL-1 та IFN- $\gamma$  у щурів які отримували прогестерон, що може відображати зв'язок із розвитком системної запальної реакції. При цьому рівні протизапальних цитокінів IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  значно зменшились. Отримані результати узгоджуються з даними досліджень при інших моделях ожиріння, які демонструють підвищення рівнів сироваткових факторів, які описані вище. Таким чином, наші дані підтверджують гіпотезу про те, що місцеве запалення у жировій тканині при ожирінні призводить до розвитку системного запалення, пов'язаного з прогресуванням захворювання.

Ми показали, що меланін отриманий з антарктичних дріжджів відновлює баланс між рівнями цитокінів сироватки крові щурів на моделі прогестерон-індукованого ожиріння. Меланін знижує рівні прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів із ожирінням та підвищує рівень протизапальних цитокінів.

Вплив меланіну на концентрації цитокінів у сироватці можна пояснити спираючись на його антиоксидантні та протизапальні властивості. Широко визнано, що еумеланін – форма меланінів, яка присутня у шкірі людини, є антиоксидантом, а також фотозахисною речовиною, яка позбавляється від активних радикалів та запобігає пошкодження ДНК ультрафіолетовим випромінюванням [75]. Здатність меланіну реагувати із активними формами кисню, такими як синглетний кисень, супероксидний аніон та гідроксильний радикал, була продемонстрована у попередніх дослідженнях. Антиоксидантна властивість меланіну з антарктичних чорних дріжджів була встановлена в попередніх дослідженнях у яких він знижував рівень прозапального цитокіну IL-1 $\beta$  [82, 180].

Отже, ми припускаємо, що дріжджовий меланін завдяки своїм властивостям знижує процеси окислювального стресу не тільки у жировій тканині, але й у всьому організмі, таким чином полегшуючи місцеве і системне запалення при ожирінні, індукованому введенням прогестерону. Часткове відновлення балансу про- і протизапальних цитокінів у щурів із ожирінням, можливо, відображає поліпшення запального статусу у жировій тканині. Гіпотетичний благотворний вплив на жирову тканину щурів, що страждають ожирінням, може бути реалізовано за рахунок зменшення пошкоджень пов'язаних із активними радикалами. Підвищена продукція активних форм кисню за рахунок секреції адипокінів, разом із виснаженням систем антиоксидантного захисту, була продемонстрована у жировій тканині [168, 169, 175, 181] та у сироватці людей, що страждають на ожиріння [175].

Враховуючи, що меланін знижує масу тіла і показники індексу вісцерального ожиріння щурів з прогестерон-індукованим ожирінням, а також пригнічує продукування оксиду азоту та активних форм кисню перитонеальними макрофагами, ми припускаємо, що цей препарат має позитивний ефект проти ожиріння, через його антиоксидантні властивості, що призводять до пригнічення запалення за рахунок зменшення виробництва оксиду азоту. Основні механізми впливу дріжджового меланіну на поляризацію макрофагів щурів залишаються неповністю зрозумілими. Вплив меланіну із дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X-1 на розвиток запальної реакції при прогестерон-індукованому ожирінні потребує подальшого детального вивчення і має бути цінним при розробці заходів для запобігання результатам ожиріння, пов'язаного із гормональною замісною терапією у жінок.

Якщо підсумовувати Згідно існуючим рекомендаціям FDA (Food and Drug Administration) США, всі нові лікарські засоби для лікування ожиріння при застосуванні їх протягом року повинні забезпечувати втрату маси тіла на 5% більше порівняно із плацебо та забезпечувати більш ніж 5% втрати ваги не менше ніж у 35% пацієнтів. По людським міркам місяць проведення експерименту на щурах еквівалентний 2,5 рокам життя дослідних тварин. Крім цього, бажано, щоб потенційний лікарський засіб проявляв сприятливий вплив на метаболічні параметри пацієнтів та низьку кількість побічних ефектів. Так як, лікування ожиріння і бажаний терапевтичний вплив лікарського засобу на вагу пацієнтів проводиться протягом тривалого часу, стандартом безпечності всіх нових лікарських засобів стає співвідношення ризиків до користі.

Згідно FDA існують дві групи препаратів, які призначають для лікування ожиріння: препарати, які вживають для зниження маси тіла протягом довгого періоду та препарати-симпатоміметики, які вживають протягом короткого періоду часу (менше 12 тижнів) [166, 182].

Якщо розглядати меланін, як потенційний засіб для корекції ожиріння, потрібно враховувати те що, ожиріння є хронічним захворюванням і лікування меланіном потрібно проводити з довгостроковою перспективою, до появи стабільного ефекту. По друге, важливо до кінця зрозуміти механізми, за допомогою яких меланін впливає на зниження ваги та використовувати його у складі комплексної терапії, яка буде включати корекцію дієти та фізичної активності. Також важливим моментом є те, що критичною вимогою до застосування меланіну, як засобу корекції симптомів ожиріння є дослідження його безпечності та переносимості. Так як, віддалені побічні ефекти важко прогнозувати та попередити, вживати лікарські препарати повинні хворі ожирінням високого ступеню тяжкості, ті хто будуть отримувати найбільшу користь від лікування, враховуючи співвідношення ризиків і користі. Використання будь яких, лікарських препаратів із косметичною метою потребує високого рівня безпечності цих речовин. Меланін є речовиною, яка має у складі поліфенольні структури, синтезується людським організмом, має структурні аналоги з доведеними сприятливими властивостями (ресвератол, катехіни, куркумін), він є дуже перспективним засобом для лікування ожиріння.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

Ожиріння – це хвороба, спричинена підвищеним накопиченням жиру в адипоцитах і, як наслідок, збільшення маси підшкірного і вісцерального жиру. Небезпечними для здоров'я наслідками ожиріння є метаболічний синдром, діабет, інсульт, інфаркт міокарду, онкологічні захворювання.

На сьогодні існують різні моделі ожиріння, на яких було докладно вивчені його механізми та наслідки. Найбільш популярними є модель ожиріння, викликаного висококалорійною дієтою, надмірним споживанням глутамату натрію, тощо [27]. Незважаючи на велику кількість даних, отриманих на різних моделях ожиріння, механізми розвитку ожиріння, викликаного прогестероном, досі залишають мало вивченими.

Прогестерон використовують як препарат для контрацепції та гормон замісної терапії. Проте, небажаним наслідком його дії є посилення споживання їжі [5], що призводить до накопичення жиру [4, 39]. Оскільки частота випадків ожиріння, спровокованого прогестероном, почала зростати у жінок та навіть дівчат-підлітків, було розроблено тваринні моделі для вивчення механізмів його розвитку [25, 41]. Дані, отримані при цьому, є фрагментарними. Тому в даній роботі на тваринній моделі було проведено комплексне дослідження процесів, які виникають в організмі в результаті пролонгованого введення прогестерону. Дану модель було відтворено згідно опублікованих робіт [94, 95, 112], в яких мишам або щурам цей препарат вводили упродовж 28 діб у дозі 10 мг / кг ваги.

Підставами стверджувати про розвиток ожиріння є , що наслідком довготривалого введення прогестерону стало збільшення маси дослідних тварин на кінець експерименту була на 27% ( $p < 0,05$ ) більшою за масу щурів контрольної групи, а приріст індексу маси тіла у щурів експериментальної групи був на 27% ( $p < 0,05$ ) більшим за показники контрольної групи тварин

(п.3.1.). Отриманні данні пояснюються тим, що прогестерон впливає на ріст адипоцитів, через стимуляцію синтази жирних кислот [113]. Дієта із високим вмістом вуглеводів стимулює експресію синтази жирних кислот, а голодування та високий вміст ліпідів у раціоні – інгібує. Інсулін, глюкоза, вільні жирні кислоти, цАМФ є прямими ефекторами гену синтази жирних кислот.

За контроль транскрипції синтази жирних кислот відповідає ADD1/SREBP1c (adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c), який у свою чергу стимулюється інсуліном [34]. У попередніх дослідженнях було показано, що прогестерон регулює експресію ADD1/SREBP1c у клітинах раку молочної залози MSF7 та у культивованих клітинах преадипоцитів отриманих з жирової тканини щурів. Отже, прогестерон, як і інсулін, стимулює роботу синтази жирних кислот, що є потенційним механізмом його впливу на ріст адипоцитів. Тому, ми припускаємо, що виявлене нами збільшення маси тіла щурів, яким вводили прогестерон, може бути наслідком стимуляції синтезу жирів в адипоцитах та, відповідно, накопичення його в них.

Також, при проведенні лапоротомії дослідних тварин ми виявили, що щури, за умов довготривалого введення прогестерону мають в середньому у 73% ( $p < 0,05$ ) більшу кількість вісцеральної жирової тканини саме в області сечо-статевої системи у порівнянні із параметрами щурів контрольної групи (п.3.1.).

Наші результати узгоджуються з даними літератури щодо впливу прогестерону на ліпідний обмін і його можливого зв'язку з розвитком ожиріння. Було показано, що вісцеральний жир секретує у кров'яне русло ретинол-зв'язуючий білок 4, який підвищує резистентність до інсуліну, що призводить до розвитку діабету 2 типу та ожиріння [116]. Також, накопичення в організмі жирової тканини призводить до активації ліполізу, транспорту вільних жирних кислот у кров'яне русло. Вільні жирні кислоти у свою чергу

знижують утилізацію глюкози печінкою, що спричиняє збільшення секреції інсуліну та розвитку компенсаторної гіперінсулінемії. Таким чином, активація прогестероном синтази жирних кислот та ретинол-зв'язуючий білок 4, який виділяється надлишковою кількістю вісцеральної жирової тканини, призводять до розвитку ожиріння.

Для дослідження впливу харчової поведінки проводили вимірювання кількості спожитого корму. Загальна кількість спожитого корму протягом 28 днів щурами експериментальної групи була на 17,2% ( $p < 0,05$ ) вищою, ніж у контрольній групі тварин. Розглядаючи отримані результати, можна припустити, що довготривале введення прогестерону впливає на центри насичення у дослідних тварин. Збільшене споживання корму вказує на ймовірний вплив прогестерону на відсутність відчуття насичення і, як наслідок, до збільшення вживання їжі. За такі наслідки в організмі відповідає серотонінергічна сигнальна система [120]. Крім того, при переїданні центр насичення (вентромедіальне ядро гіпоталамуса) адаптується до більш високих рівнів глюкози, інсуліну і лептину. Результатом є те, що знижується його чутливість, і при споживанні надмірної кількості їжі відбувається недостатнє гальмування центру голоду. Відомо, що жирова тканина синтезує гормон лептин, який відповідає за регуляцію апетиту і енергетичного метаболізму. При зв'язуванні лептину з відповідним рецептором відбувається внутрішньоклітинний сигналінг та виділення серотоніну в центрі насичення, який, у свою чергу, сигналізує мозку про споживання достатньої кількості їжі, після чого знижується апетит. Також показано, що у жінок, яким призначали прогестерон для гормон-замісної терапії, виникало збільшене споживання їжі на тлі емоційної нестабільності (emotional eating), що призводило до значного збільшення ваги.

Отже, ми виявили, що збільшення маси тіла щурів при введенні прогестерону відбувається внаслідок збільшення споживання корму тваринами і проявляється у шляхом збільшенні маси вісцеральної жирової

тканини, особливо біля статевих органів. Це також, ймовірно, пов'язано із стимуляцією синтезу жирів, спровокованого прогестероном.

Так як, харчова поведінка знаходиться під контролем серотоніну, ми досліджували рівні основних метаболітів та активності ферментів у головному мозку щурів, які забезпечують функціонування серотонінергічної системи. Встановлено, що концентрація триптофану – попереднику серотоніну у головному мозку щурів після довготривалого введення прогестерону зросла в 2,16 ( $p < 0,05$ ) рази порівняно з контрольною групою (п. 3.2.). Першим етапом біосинтезу серотоніну є гідроксилювання триптофану з утворенням проміжного метаболіту - 5-гідрокситриптофану. Активність триптофан-гідроксилази знижувалась на 25% ( $p < 0,05$ ) у групі щурів при тривалому введенні прогестерону в порівнянні з контрольною групою. Концентрація 5-гідрокситриптофану збільшилася в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ) після введення прогестерону. Активність триптофан-декарбоксилази зростала і склала 170% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з показниками щурів контрольної групи. Концентрація продукту триптофан-декарбоксилазної активності - серотоніну збільшилася в 3,25 рази ( $p < 0,05$ ) у щурів за умов довготривалого введення прогестерону.

Крім того, було досліджено рівні амінокислот із розгалуженим бічним радикалом (валін, лейцин, ізолейцин) у сироватці крові щурів. Транспорт ВСАА та триптофану через гематоенцефалічний бар'єр відбувається за рахунок транспортеру великих нейтральних амінокислот (LAT1). Встановлено, що рівні валіну та лейцину були, відповідно, у 58% і 50% ( $p < 0,05$ ) нижчими у щурів із ожирінням, яке було індуковане довготривалим введенням прогестерону, ніж у щурів контрольної групи. Показане нами зростання вмісту триптофану у головному мозку може бути обумовлене конкуренцією даної амінокислоти з валіном та лейцином за транспорт LAT1 для проходження гематоенцефалічного бар'єру, що у свою чергу впливає на підвищення рівню серотоніну та порушенню харчової поведінки при довготривалому введенні прогестерону.

Таким чином, в результаті проведених досліджень нами встановлено дисбаланс в системі метаболізму серотоніну в головному мозку щурів, при розвитку гормонального ожиріння, індукованого довготривалим введенням прогестерону, що свідчить про залучення функціонування серотонінергічної нейротрансмітерної системи в механізми розвитку ожиріння гормонального генезу. Серотонін впливає на емоційну сферу. Порушення процесів його обміну може викликати емоційну нестабільність і, як наслідок, збільшення споживання їжі.

На основі отриманих даних можна зробити висновок, тривале введення прогестерону порушує функціонування системи метаболізму серотоніну, що може бути пов'язаним із накопиченням ліпідів у жировій тканині і реалізуватися через посилення споживання їжі. Тому система метаболізму серотоніну може бути використана як потенційна мішень для корекції метаболічного дисбалансу при розвитку гормонального ожиріння.

Загальновідомо, що ожиріння супроводжується розвитком запального процесу, який спочатку виникає у жировій тканині у відповідь на гіпертрофію адипоцитів внаслідок збільшення вмісту в них жиру.

Ми припускаємо, що викликане прогестероном збільшення загальної маси тіла щурів та збільшення маси жирової тканини (п.3.1.) призводить до розвитку запального процесу, який набуває не тільки локального, а й системного характеру. Проявом цього і є зростання рівнів циркулюючих прозапальних цитокінів і зниження рівню протизапальних (п.3.4.). Оскільки збільшення ваги щурів, яким вводили прогестерон, супроводжується також змінами маркерів поляризації перитонеальних макрофагів у прозапальний бік (п.3.5.), можна припустити, що запальний процес на даній моделі ожиріння починає розповсюджуватися не тільки і жировій тканині, а й у інших органах. Залучення перитонеальних макрофагів пояснюється тим, що саме макрофаги черевної порожнини одними з перших реагують на збільшення маси вісцерального жиру (показано нами в даній роботі), яке призводить до

запалення. На користь такого припущення свідчать також дані літератури, згідно яких, по-перше, при зростанні кількості жиру в адипоцитах виникає їх гіпертрофія, внаслідок чого вони секретують прозапальні цитокіни.

Це в свою чергу викликає рекрутування з кров'яного руслу у жирову тканину макрофагів, які також починають продукувати прозапальні фактори. Це поглиблює запальний процес у жировій тканині і, внаслідок запалення розповсюджується на інші органи і тканини. Проявом розвитку такої системної реакції і є зростання рівню прозапальних цитокінів у крові, зокрема, TNF- $\alpha$  [43].

По-друге, отримані нами дані щодо поляризації макрофагів у тип прозапальний тип M1 можна інтерпретувати таким чином. На різних моделях ожиріння показано, що макрофаги жирової тканини зазнають поляризації у бік M1 і починають синтезувати індукцибельну NO-синтазу, а також секретувати TNF $\alpha$  [141]. При цьому рівень таких M1-макрофагів суттєво збільшується [48]. Показано, що рівень M2 макрофагів (поляризованих за протизапальним типом, які експресують аргіназу) у жировій тканині зменшується, що супроводжується системним запаленням. До того ж, у людей з ожирінням виявлено, що M1 поляризацію макрофагів стимулюють прозапальні цитокіни [151].

Тому, щодо отриманих нами результатів на прогестероновій моделі ожиріння, ми можемо припустити, що збільшення маси вісцерального жиру викликає запалення у жировій тканині, що призводить до його розповсюдження в організмі, зокрема, на нього реагують макрофаги черевної порожнини, які зазнають поляризації у M1 прозапальний бік (в них зростає інтенсивність кисень-залежного метаболізму та рівень оксиду азоту). Натомість, поляризації у M2 протизапальний бік в них не відбувається, про що свідчить зниження активності аргінази. M1 поляризацію цих клітин можуть викликати прозапальні цитокіни (IL-1 та IFN- $\gamma$ ), рівень яких підвищується у сироватці крові. Отже, цілком ймовірно, що при прогестерон-індукованому

ожирінні, як і при інших досліджених на сьогодні типах ожиріння, збільшення жирової тканини призводить до системного запального процесу, яке розвивається за схожим механізмом.

Ожиріння, яке виникає під час розладів ендокринної системи та супутньої гормон-замісної терапії, чи при вживанні засобів контрацепції, які спираються на дію гормонів, потребує особливих методів лікування. Так як, такі види ожиріння виникають не тільки у наслідок надмірного споживання висококалорійної їжі, малорухливого способу життя то цей стан неможливо вилікувати лише застосуванням дієтотерапії та зміною фізичної активності хворих.

Меланін, який володіє антиоксидантними властивостями, привертає особливу увагу, як перспективний інструмент для зменшення окисного стресу і тому може застосовуватись, як препарат при лікуванні ожиріння [11]. Останнім часом спостерігається великий інтерес до вивчення сприятливого впливу поліфенолів, які здатні запобігати розвитку ожиріння та хронічних порушень, пов'язаних з ожирінням. Поліфенолвмісні екстракти зеленого, чорного чаю та чаю улун зменшують рівень запальних процесів у мишей із ожирінням, індукованим висококалорійною дієтою, і зменшують кількість вісцерального жиру [61, 62].

Потрібно зауважити, що меланін синтезується не тільки у шкірі, але і у жировій тканині і вважається відповідальним за полегшення оксидативного стресу, що призводить до ослаблення запальних процесів. Останні данні свідчать про те, що еумеланін із дріжджів *Nadsoniella nigra* штаму X1, отриманих на Українській Антарктичній станції має виражений ефект проти проявів ожиріння, знижуючи кількість вісцерального жиру у щурів із безалкогольною хворобою печінки, індукованою глутаматом натрію. Для дослідження впливу меланіну на ожиріння, індуковане довготривалим введенням прогестерону, дослідним щурам одночасно вводили прогестерон та розчин меланіну у дозах 1 мг/кг перорально протягом 28 днів.

Було показано, що одночасне введення меланіну та прогестерону щурам призводить до зниження маси тіла на 16% та ІМТ на 27% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні із показниками щурів яким вводили тільки прогестерон (п.4.2). Також, введення меланіну спричиняло відновлення кількості статевої жирової тканини до показників контрольної групи. Спираючись на отримані результати, можна стверджувати, що меланін значно впливає на зменшення ваги при ожирінні.

При дослідженні харчової поведінки ми не спостерігали впливу меланіну на кількість спожитого корму щурами із ожирінням. Цей показник був підвищений у порівнянні із показниками контрольної групи. Також в результаті досліджень ми спостерігали підвищення рівня серотоніну у головному мозку щурів за умов довготривалого введення прогестерону у 3,78 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з показниками контрольної групи тварин (п.4.2.). При одночасному введенні прогестерону та меланіну рівень серотоніну значно зменшувався і був у 1,19 рази ( $p < 0,05$ ) більшим за показники контрольної групи тварин. Аналізуючи отримані результати можна зробити висновок, що меланін впливає на зниження маси тіла за рахунок зменшення кількості жирової тканини та впливу на метаболізм ліпідів. Про це свідчать те, що введення меланіну спричинює зменшення рівнів холестеролу, тригліцеридів, ЛПНЩ, ЛПДНЩ у порівнянні із показниками групи щурів із прогестерон індукованим ожирінням. Також спостерігали збільшення рівнів ЛПВЩ. При одночасному введенні прогестерону та меланіну всі показники ліпідного профілю наближено відновлювались до значень щурів контрольної групи (п.4.2.).

Також було показано, що меланін може проявляти сприятливий вплив при розвитку запалення при ожирінні, що викликане довготривалим введенням прогестерону. Потрібні більш детальні дослідження для ідентифікації молекулярних сигнальних шляхів, які пояснювали б розвиток запального процесу при ожирінні, що викликане довготривалим введенням

прогестерону. Виявлення ефекту меланіну на розвиток запалення було б надзвичайно корисним для затвердження нового засобу терапії та профілактики ожиріння.

Для виявлення впливу довготривалого введення прогестерону та введення меланіну на поляризацію макрофагів були проведені дослідження синтезу прозапального медіатора монооксиду азоту (NO), аргіназну активність, продукцію активних форм кисню перитонеальними макрофагами.

У той час, як введення меланіну зменшує продукцію оксиду азоту перитонеальними макрофагами, рівень якого був підвищений у щурів, які страждають на ожиріння, цей препарат знижував активність аргінази, яка була менш активна у щурів, яким вводили прогестерон. Цей несподіваний ефект меланіну можна пояснити відповідно до ролі M2 макрофагів у розвитку пухлин, який був згаданий раніше: аргіназа бере участь у пригніченні протипухлинного імунітету [160], а активність аргінази підвищена у клітинах пухлин, пов'язаних із ожирінням [92, 159]. Крім того, завдяки своїм антиоксидантним властивостям меланін може ослаблювати виробництво активних форм кисню не тільки у жировій тканині, але і в інших клітинах, включаючи перитонеальні макрофаги, що полегшує місцеве і, отже, системне запалення.

Ми показали, що меланін отриманий з антарктичних дріжджів відновлює баланс між рівнями цитокінів сироватки крові щурів на моделі прогестерон-індукованого ожиріння. Меланін знижує рівні прозапальних IL-1 та IFN- $\gamma$  цитокінів у сироватці крові щурів із ожирінням та підвищує рівень протизапальних цитокінів IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  (п.4.3, 4.4.). Вплив меланіну на концентрації цитокінів у сироватці можна пояснити спираючись на його антиоксидантні та протизапальні властивості. Широко визнано, що еумеланін – форма меланінів, яка присутня у шкірі людини, є антиоксидантом, а також фотозахисною речовиною, яка позбавляється від активних радикалів та запобігає пошкодження ДНК ультрафіолетовим випромінюванням [75].

Широко визнано, що еумеланін – форма меланінів, яка присутня у шкірі людини, є антиоксидантом, а також фотозахисною речовиною, яка позбавляється від активних радикалів та запобігає пошкодження ДНК ультрафіолетовим випромінюванням [75]. Здатність меланіну реагувати із активними формами кисню, такими як синглетний кисень, супероксидний аніон та гідроксильний радикал, була продемонстрована у попередніх дослідженнях.

Якщо розглядати меланін, як потенційний засіб для корекції ожиріння, потрібно враховувати те що, ожиріння є хронічним захворюванням і лікування меланіном потрібно проводити з довгостроковою перспективою, до появи стабільного ефекту. По друге, важливо до кінця зрозуміти механізми, за допомогою яких меланін впливає на зниження ваги та використовувати його у складі комплексної терапії, яка буде включати корекцію дієти та фізичної активності. Також важливим моментом є те, що критичною вимогою до застосування меланіну, як засобу корекції симптомів ожиріння є дослідження його безпечності та переносимості. Меланін є речовиною, яка синтезується людським організмом, має структурні аналоги з доведеними сприятливими властивостями (резвератол, катехіни, куркумін) і тому він є дуже перспективним засобом для лікування ожиріння.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що довготривале введення прогестерону викликає розвиток ожиріння, про що свідчить збільшення маса дослідних тварин на 27%, маси статевої жирової тканини на 70% та приріст ІМТ на 27%, це супроводжується підсиленням харчової поведінки тварин (підвищення кількості спожитого корму на 17,2%).

2. Виявлено розвиток дисліпідемії за умов розвитку прогестерон-індукованого ожиріння у щурів: підвищення рівнів триацилгліцеролів у 2 рази, ЛПНЩ – у 1,5 рази, ЛПДНЩ у 2,2 рази та зменшення рівню ЛПВЩ у 1,5 рази у сироватці крові порівняно з контрольною групою тварин.

3. Виявлено, що система обміну серотоніну залучена до розвитку прогестерон-індукованого ожиріння у щурів, що проявляється у збільшенні в головному мозку вмісту серотоніну (у 3,25 рази), амінокислот-попередників, а також зміні активності ферментів його метаболізму. Збільшення вмісту триптофану у мозку пов'язано із зниженням вмісту амінокислот з розгалуженими бічними ланцюгами (валіну, лейцину, ізолейцину) у сироватці крові.

4. Показано, що за умов розвитку ожиріння індукованого довготривалим введенням прогестерону спостерігається розвиток системного запального процесу, що проявляється у підвищенні рівня прозапальних цитокінів (IL-1 та IFN- $\gamma$ ) та зниженні рівню протизапальних (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) у сироватці крові щурів, посиленні поляризації макрофагів за M1 типом і пригніченні такої за M2 типом.

5. Встановлено, що меланін може попереджати розвиток ожиріння у щурів при сумісному введенні з прогестероном, модифікуючи органометричні параметри, усуваючи дисліпідемію та нормалізуючи вміст серотоніну в головному мозку, а також проявляючи протизапальні властивості через

усунення дисбалансу між рівнями про- і протизапальних цитокінів та запобігаючи поляризації перитонеальних макрофагів за M1 типом. Меланін може бути перспективним потенційним засобом для профілактики прогестерон-індукованого ожиріння.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Kratz, M., Baars, T., Guyenet, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *European Journal of Nutrition*. 2013. Vol. 52, No. 1. С. 1–24.
2. Lötzke, D., Wiedemann, F., Rodrigues Recchia, D., та ін. Iyengar-Yoga Compared to Exercise as a Therapeutic Intervention during (Neo)adjuvant Therapy in Women with Stage I-III Breast Cancer: Health-Related Quality of Life, Mindfulness, Spirituality, Life Satisfaction, and Cancer-Related Fatigue. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2016. Vol. 2016.
3. Han, Y. H., Kee, J. Y., Park, S. H., та ін. Rubrofusarin-6- $\beta$ -gentiobioside inhibits lipid accumulation and weight gain by regulating AMPK/mTOR signaling. *Phytomedicine*. 2019. Vol. 62, No. July 2018. С. 152952.
4. Bonny, A. E., Lange, H. L. H., Rogers, L. K., та ін. A pilot study of depot medroxyprogesterone acetate pharmacokinetics and weight gain in adolescent females. *Contraception*. 2014. Vol. 89, No. 5. С. 357–360.
5. Klump, K. L., Culbert, K. M., Slane, J. D., та ін. The effects of puberty on genetic risk for disordered eating: Evidence for a sex difference. *Psychological Medicine*. 2012. Vol. 42, No. 3. С. 627–637.
6. Amatayakul, K., Sivassomboon, B., Singkamani, R. Effects of medroxyprogesterone acetate on serum lipids, protein, glucose tolerance and liver function in Thai women. *Contraception*. 1980. Vol. 21, No. 3. С. 283–297.
7. Marroquí, L., Gonzalez, A., Nêco, P., та ін. Role of leptin in the pancreatic  $\beta$ -cell: Effects and signaling pathways. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2012. Vol. 49, No. 1.
8. Tchkonina, T., Campisi, J., Kirkland, J. L., та ін. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities Find the latest version: Review series Cellular senescence and the senescent secretory

- phenotype : therapeutic opportunities. 2013. Vol. 123, No. 3. С. 966–972.
9. Pasarica, M., Sereda, O. R., Redman, L. M., та ін. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009. Vol. 58, No. 3. С. 718–725.
  10. Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., та ін. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metabolism*. 2013. Vol. 18, No. 4. С. 470–477.
  11. Pandey, K. B., Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009. Vol. 2, No. 5. С. 270–278.
  12. Origasa, H., Goto, S., Shimada, K., та ін. Prospective cohort study of gastrointestinal complications and vascular diseases in patients taking aspirin: Rationale and design of the MAGIC study. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2011. Vol. 25, No. 6. С. 551–560.
  13. Heber, D., Stoeck, T., Foissner, W. Morphology and Ontogenesis of *Psilotrichides hawaiiensis* nov. gen., nov. spec. and Molecular Phylogeny of the *Psilotrichidae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2018. Vol. 65, No. 2. С. 291–292.
  14. Чижанська Н.В. Дослідження механізмів антистресової дії меланіну : автореф. дис. канд. біол. наук : 03.00.13. Київ, 2008. 17 с.
  15. Голишкін Д.В. Вплив меланіну та нанокристалічного діоксиду церію на стан слизової оболонки шлунку та реакцію кори наднирників за умов дії гострого стресу: дис. канд. біол. наук : 03.00.13. Київ, 2018. 164 с.
  16. Colditz, G. A., Willett, W. C., Rotnitzky, A., та ін. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Annals of Internal Medicine*. 1995. Vol. 122, No. 7. С. 481–486.
  17. Koh-Banerjee, P., Wang, Y., Hu, F. B., та ін. Changes in body weight and body

- fat distribution as risk factors for clinical diabetes in US men. *American Journal of Epidemiology*. 2004. Vol. 159, No. 12. C. 1150–1159.
18. National Heart, Lung, and B. I. O. E. I. Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. *Obesity Research*. 1998. Vol. 6, No. s2. C. 51.
  19. Wing, R. R., Bahnson, J. L., Bray, G. A., та ін. Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: Four-year results of the look AHEAD trial. *Archives of Internal Medicine*. 2010. Vol. 170, No. 17. C. 1566–1575.
  20. Li, G., Zhang, P., Wang, J., та ін. The long-term effect of lifestyle interventions to prevent diabetes in the China Da Qing Diabetes Prevention Study: a 20-year follow-up study. *The Lancet*. 2008. Vol. 371, No. 9626. C. 1783–1789.
  21. Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., та ін. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New England Journal of Medicine*. 2002. Vol. 346, No. 6. C. 393–403.
  22. Toumillehto, J., Lindström, J., Eriksson, J. G., та ін. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England journal of medicine*. 2013. Vol. 344, No. 18. C. 1343–1350.
  23. Strazzullo, P., D’Elia, L., Cairella, G., та ін. Excess body weight and incidence of stroke: Meta-analysis of prospective studies with 2 million participants. *Stroke*. 2010. Vol. 41, No. 5.
  24. McGee, D. L. Body mass index and mortality: A meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Annals of Epidemiology*. 2005. Vol. 15, No. 2. C. 87–97.
  25. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*. 2014. Vol. 2014.

26. Leeners, B., Kruger, T. H. C., Geraedts, K., та ін. Lack of associations between female hormone levels and visuospatial working memory, divided attention and cognitive bias across two consecutive menstrual cycles. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2017. Vol. 11, No. July. C. 1–10.
27. Angelova, P., Boyadjiev, N. A review on the models of obesity and metabolic syndrome in rats. *Tjs*. 2013. Vol. 1, No. 1. C. 5–12.
28. Jadhav, S. M., Morey, P., Karpe, M. M., та ін. Novel vesicular system: An overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012. Vol. 2, No. 1. C. 193–202.
29. Tresserra-Rimbau, A., Rimm, E. B., Medina-Remón, A., та ін. Polyphenol intake and mortality risk: A re-analysis of the PREDIMED trial. *BMC Medicine*. 2014. Vol. 12, No. 1. C. 1–11.
30. Cristancho, A. G., Lazar, M. A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011. Vol. 12, No. 11. C. 722–734.
31. Taylor, A. the Estrogenic Endocrine Disrupting Chemical. 2013. Vol. 354. C. 74–84.
32. Boucher, J. G., Husain, M., Rowan-Carroll, A., та ін. Identification of mechanisms of action of bisphenol A-induced human preadipocyte differentiation by transcriptional profiling. *Obesity*. 2014. Vol. 22, No. 11. C. 2333–2343.
33. Calcium, R. O. F., Metabolism, P. Metabolic disease Metabolic disease Metabolic disease. 2007. Vol. 478, No. 7367. C. 110–113.
34. Tchkonina, T., Thomou, T., Zhu, Y., та ін. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism*. 2013. Vol. 17, No. 5. C. 644–656.
35. Zeng, D., Zhou, W. Determination of Forward Slip and Friction Coefficient in

- Cold Rolling of Powder Sintered Blanks. *Zhongnan Kuangye Xueyuan Xuebao/Journal of Central-South Institute of Mining and Metallurgy*. 1987. Vol. 18, No. 1. C. 53–58.
36. Björntorp, P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Annals of Medicine*. 1992. Vol. 24, No. 6. C. 465–468.
37. Karastergiou, K., Fried, S. K., Xie, H., та ін. Distinct developmental signatures of human abdominal and gluteal subcutaneous adipose tissue depots. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2013. Vol. 98, No. 1. C. 362–371.
38. Vieira Potter, V. J., Strissel, K. J., Xie, C., та ін. Adipose tissue inflammation and reduced insulin sensitivity in ovariectomized mice occurs in the absence of increased adiposity. *Endocrinology*. 2012. Vol. 153, No. 9. C. 4266–4277.
39. Bonny, A. E., Secic, M., Cromer, B. Early weight gain related to later weight gain in adolescents on depot medroxyprogesterone acetate. *Obstetrics and Gynecology*. 2011. Vol. 117, No. 4. C. 793–797.
40. Chidrawar, V., Sheth, N., Trivedi, P., та ін. Antiobesity effect of *Stellaria media* against drug induced obesity in Swiss albino mice. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*. 2011. Vol. 32, No. 4. C. 576.
41. Kaur, G., Kulkarni, S. K. Evidence for serotonergic modulation of progesterone-induced hyperphagia, depression and algesia in female mice. *Brain Research*. 2002. Vol. 943, No. 2. C. 206–215.
42. Moorthy, K., Yadav, U. C. S., Siddiqui, M. R., та ін. Effect of estradiol and progesterone treatment on carbohydrate metabolizing enzymes in tissues of aging female rats. *Biogerontology*. 2004. Vol. 5, No. 4. C. 249–259.
43. Weisberg, S. P., Leibel, R. L., Anthony, W., та ін. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. *J Clin Invest*. 2003. Vol. 112, No. 12. C. 1796–1808.
44. Harford, K. A., Reynolds, C. M., McGillicuddy, F. C., та ін. Fats, inflammation

- and insulin resistance: Insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2011. Vol. 70, No. 4. C. 408–417.
45. Sell, H., Eckel, J. Adipose tissue inflammation: Novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2010. Vol. 13, No. 4. C. 366–370.
46. Mills, C. D. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease. *Critical Reviews in Immunology*. 2012. Vol. 32, No. 6. C. 463–488.
47. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., та ін. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages / *Frontiers Media S.A.*, 2014.
48. Heilbronn, L., Campbell, L. Adipose Tissue Macrophages, Low Grade Inflammation and Insulin Resistance in Human Obesity. *Current Pharmaceutical Design*. 2008. Vol. 14, No. 12. C. 1225–1230.
49. Dahdah, A., Gautier, G., Attout, T., та ін. Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2014. Vol. 124, No. 10. C. 4577–4589.
50. Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., та ін. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013. Vol. 38, No. 4. C. 792–804.
51. Bou Ghosn, E. E., Cassado, A. A., Govoni, G. R., та ін. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107, No. 6. C. 2568–2573.
52. Cain, D. W., O’Koren, E. G., Kan, M. J., та ін. Identification of a Tissue-Specific, C/EBP $\beta$ -Dependent Pathway of Differentiation for Murine Peritoneal Macrophages. *The Journal of Immunology*. 2013. Vol. 191, No. 9. C. 4665–

4675.

53. Cassado, A. A., D'Império Lima, M. R., Bortoluci, K. R. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function / *Frontiers Media S.A.*, 2015.
54. Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., та ін. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2010. Vol. 362, No. 10. C. 875–885.
55. Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., та ін. From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages: Induction of Diapedesis by Human Mature Adipocytes. *Diabetes*. 2004. Vol. 53, No. 5. C. 1285–1292.
56. Narita, Y., Kitamura, H., Wakita, D., та ін. The Key Role of IL-6–Arginase Cascade for Inducing Dendritic Cell–Dependent CD4 + T Cell Dysfunction in Tumor-Bearing Mice . *The Journal of Immunology*. 2013. Vol. 190, No. 2. C. 812–820.
57. Trayhurn, P., Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*. 2004. Vol. 92, No. 3. C. 347–355.
58. Wood, I. S., Heredia, F. P. De, Wang, B., та ін. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity: *Proceedings of the Nutrition Society*, November.09. C. 370–377.
59. Trayhurn, P., Wang, B., Wood, I. S. Hypoxia in adipose tissue: A basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition*. 2008. Vol. 100, No. 2. C. 227–235.
60. Pandey, K. B., Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. 2009. C. 270–278.
61. Uchiyama, S., Taniguchi, Y., Saka, A., та ін. Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition*. 2011.

Vol. 27, No. 3. C. 287–292.

62. Heber, D., Zhang, Y., Yang, J., та ін. Green Tea, Black Tea, and Oolong Tea Polyphenols Reduce Visceral Fat and Inflammation in Mice Fed High-Fat, High-Sucrose Obesogenic Diets. *The Journal of Nutrition*. 2014. Vol. 144, No. 9. C. 1385–1393.
63. Rausch, M. E., Weisberg, S., Vardhana, P., та ін. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *International Journal of Obesity*. 2008. Vol. 32, No. 3. C. 451–463.
64. Meydani, M., Hasan, S. T. Dietary Polyphenols and Obesity. *Nutrients*. 2010. Vol. 2, No. 7. C. 737–751.
65. Xu, G., Ren, G., Xu, X., та ін. Combination of curcumin and green tea catechins prevents dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 2010. Vol. 48, No. 1. C. 390–395.
66. Chen, D., Wan, S. B., Yang, H., та ін. Green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment: *Advances in Clinical Chemistry*. 2011. C. 155–177.
67. Bogdanski, P., Suliburska, J., Szulinska, M., та ін. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition Research*. 2012. Vol. 32, No. 6. C. 421–427.
68. Tian, C., Ye, X., Zhang, R., та ін. Green Tea Polyphenols Reduced Fat Deposits in High Fat-Fed Rats via erk1/2-PPAR $\gamma$ -Adiponectin Pathway. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, No. 1.
69. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. Vol. 23, No. 2, C. 174–181.
70. Eckstein, A., Grzyb, J., Hermanowicz, P., та ін. A role for GLABRA1 in dark-induced senescence. *Acta Biochimica Polonica*. 2019.

71. Riley, P. A. Naevogenesis: A Hypothesis Concerning the Control of Proliferation of Melanocytes with Special Reference to the Growth of Intradermal Naevi. *Dermatology*. 1997. Vol. 194, No. 3. C. 201–204.
72. Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., та ін. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi / Academic Press Inc., 2003. 143–158 p.
73. Huang, S. K. S., Okamoto, T., Morton, D. L., та ін. Antibody responses to melanoma/melanocyte autoantigens in melanoma patients. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998. Vol. 111, No. 4. C. 662–667.
74. Nappi, A. J., Ottaviani, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*. 2000. Vol. 22, No. 5. C. 469–480.
75. Kobayashi, N., Nakagawa, A., Muramatsu, T., та ін. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998. Vol. 110, No. 5. C. 806–810.
76. Jacobson, E. S. Pathogenic Roles for Fungal Melanins. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000. Vol. 13, No. 4. C. 708–717.
77. Miyahisa, I., Funa, N., Ohnishi, Y., та ін. Combinatorial biosynthesis of flavones and flavonols in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. Vol. 71, No. 1. C. 53–58.
78. Cantos, E., Tudela, J. A., Gil, M. I., та ін. Phenolic Compounds and Related Enzymes Are Not Rate-Limiting in Browning Development of Fresh-Cut Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. Vol. 50, No. 10. C. 3015–3023.
79. Carreira, A., Paloma, L., Loureiro, V. Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 1998. Vol. 41, No. 3. C. 223–230.
80. Gibello, A., Allende, J. L., Mengs, G., та ін. Comparison of phenolic substrate

- utilization and growth kinetics between immobilized and suspended degradative-bacteria. *Biocatalysis and Biotransformation*. 1998. Vol. 16, No. 4. С. 291–306.
81. Бриттон, Г. Биохимия природных пигментов. 1986. 417с.
82. Sarna, T., Sealy, R. C. Photoinduced oxygen consumption in melanin systems. action spectra and quantum yields for eumelanin and synthetic melanin. *Photochemistry and Photobiology*. 1984. Vol. 39, No. 1. С. 69–74.
83. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A., та ін. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *The EMBO Journal*. 1994. Vol. 13, No. 24. С. 5818–5825.
84. Eisen, T. G. The control of gene expression in melanocytes and melanomas / Lippincott Williams and Wilkins, 1996. С. 277–284.
85. Konrad, K., Wolff, K., Hönigsmann, H. The giant melanosome: A model of deranged melanosome-morphogenesis. *Journal of Ultrastructure Research*. 1974. Vol. 48, No. 1. С. 102–123.
86. Riley, P. A. *Materia Melanica: Further Dark Thoughts*. *Pigment Cell Research*. 1992. Vol. 5, No. 3. С. 101–106.
87. Спасов А.А., Островский О.В., Ивахненко И.В., Косолапов В.А., Анисимова В.А. Влияние соединений с антиоксидантными свойствами на функциональную активность тромбоцитов: Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. Vol.62. No.1. С.38-40.
88. Проценко О. В., Дудка О. А., Козерецька І. А., Фалалєєва Т. М., Берегова Т. В., Остапченко Л. І. Оцінка токсичності та генотоксичності меланіну на тест-системі *Drosophila melanogaster*. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016. Vol.18. С. 137–139.
89. Taburets, O., Kondratiuk, T., Beregova, T., та ін. The Effect of “Melanin-Gel” on the Wound Healing. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and*

Chemical Sciences. 2016. Vol.7. No.3 С.2031–2038.

90. Воронина, О.К., Голышкин, Д.В., Береговой, С.М., Береговая, Т.В., Остапченко, Л.И. Исследование подострой токсичности препарата меланин по показателям биохимических и морфологических изменений печени у крыс. Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. 2017. No.5. С.39–44.
91. Kondratiuk, T., Beregova, T., Ostapchenko, L. Antifungal influence of a melanin producer *Pseudonadsoniella brunnea* culture fluid on *Gibberella fujikuroi* (anamorph: *Fusarium verticillioides*). *Acta Botanica Hungarica*. 2017. Vol. 59, No. 1–2. С. 63–69.
92. Permyakova, N. M., Zheltonozhskaya, T. B., Beregova, T. V., та ін. Micellar nanocarriers for anticancer drug melanin. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2016. Vol. 640, No. 1. С. 122–133.
93. Böhm, M., Hill, H. Z. Ultraviolet B, melanin and mitochondrial DNA: Photo-damage in human epidermal keratinocytes and melanocytes modulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *F1000Research*. 2016. Vol. 5.
94. Reddy, D. S., Kulkarni, S. K. The role of GABA-A and mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptors on the effects of neurosteroids on food intake in mice. *Psychopharmacology*. 1998. Vol. 137, No. 4. С. 391–400.
95. Suneetha D. та ін. Evaluation of anti-obesity activity of methanolic extract of *Sapindus emarginatus* by progesterone induced obesity on albino mice. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013. Vol. 23, No. 2. С. 164–169.
96. Kumar, M. A Review on Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Ricinus communis* L. Plant. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2017. Vol. 9, No. 4.
97. Общие липиды / Диагностический набор // *Pliva-lachemadiagnostika*. - 2008.

- 10003157.

98. Kuhn, D. M., O'Callaghan, J. P., Juskevich, J., та ін. Activation of brain tryptophan hydroxylase by ATP-MG<sup>2+</sup>: dependence on calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980. Vol. 77, No. 8. С. 4688–4691.
99. Калниня, И.Э., Блума, Р.К. та ін. Флуориметрическое определение 5-гидрокситриптофана в крови. 1991. No. 1.С. 29–39.
100. Александров А.В. та ін. Шлях біосинтезу серотоніну в головному мозку щурів за умов експериментального ожиріння 2018. Vol. 1, No. 75. С. 59–63.
101. Конопельнюк В. В., Войтенко В. В., Савчук А. Н., Остапченко Л. И. Вміст серотоніну та триптофану в сироватці крові щурів за умов розвитку хронічної алкогольної інтоксикації. *Одеський медичний журнал*. 2013. Vol. 2, No. 136. С. 8–11.
102. Ali, B. H., Bartlet, A. L. Inhibition of monoamine oxidase by furazolidone in the chicken and the influence of the alimentary flora thereon. *British Journal of Pharmacology*. 1980. Vol. 71, No. 1. С. 219–224.
103. Kudo, Y. Modulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon-gamma in human placental chorionic villi. *Molecular Human Reproduction*. 2000. Vol. 6, No. 4. С. 369–374.
104. Савчук, О. М., Остапченко, Л. І. Методи. експериментальні дослідження. 2013. Vol. 1, No. 63. С. 44–47.
105. Crowther, J. R. *The ELISA Guidebook. Methods in molecular biology*. 2001. Vol.149. 421с.
106. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72, No. 1–2. С. 248–254.

107. Macrophages and dendritic cells. *Methods and Protocols. Methods Mol Biol.* Edited by N.E.Reiner. NY, Humana Press, 2009. 368c.
108. Skivka, L. M., Prylutska, S. V., Rudyk, M. P., та ін. C60 fullerene and its nanocomplexes with anticancer drugs modulate circulating phagocyte functions and dramatically increase ROS generation in transformed monocytes. *Cancer Nanotechnology.* 2018. Vol. 9, No. 1.
109. Muennig, P., Lubetkin, E., Jia, H., та ін. Gender and the burden of disease attributable to obesity. *American journal of public health.* 2006. Vol. 96, No. 9. C. 1662–8.
110. Guh, D. P., Zhang, W., Bansback, N., та ін. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health.* 2009. Vol. 9, No. 1. C. 88.
111. Kelishadi, R. Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. *Epidemiologic Reviews.* 2007. Vol. 29, No. 1, C. 62–76.
112. Gundamaraju, R., Mulapalli, S., Res, C. R.-I. J. P. and P., та ін. Evaluation of anti-obesity activity of *Lantana camara* Linn. by Progesterone induced obesity on Albino mice. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.* 2013. Vol. 4. No.4. C.213-218
113. Wakil, S. J. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry.* 1989. Vol. 28, No. 11. C. 4523–4530.
114. Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., та ін. SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Elsevier B.V.,* 2004. 839–848 p.
115. Rybar, R., Kopecka, V., Prinosilova, P., та ін. Male obesity and age in relationship to semen parameters and sperm chromatin integrity. *Andrologia.* 2011. Vol. 43, No. 4. C. 286–291.
116. Rhee, E.-J., Lee, M. K., Kim, J. D., та ін. Metabolic Health Is a More Important Determinant for Diabetes Development than Simple Obesity: A 4-Year

- Retrospective Longitudinal Study. PLoS ONE. 2014. Vol. 9, No. 5.
117. Kautzky-Willer, A., Harreiter, J., Pacini, G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus/ Endocrine Society. 2016. С. 278–316.
118. Ogden, C. L., Fryar, C. D., Carroll, M. D., та ін. Advance Data from Vital and Health Statistics. 2004. No. 347.
119. Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., та ін. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. Laboratory Animals. 2007. Vol. 41, No. 1. С. 111–119.
120. Tops, M., Russo, S., Boksem, M. A. S., та ін. Serotonin: Modulator of a drive to withdraw. Brain and Cognition. 2009. Vol. 71, No. 3. С. 427–436.
121. Иванов, В. В., Шахристова, Е. В., Степовая, Е. А., та ін. Молекулярные механизмы модуляции липолиза в жировой ткани и развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2014. Vol. 58, No. 4. С. 111–119–111–119.
122. Kovalenko, V. M., Dolzhenko, M. M., Nesukai, Y. H. Comparative Characteristics of the Cardiovascular Disease Prevention in Ukraine and Europe According to EUROASPIRE IV Data: a Hospital Line. Hypertension. 2016. Vol. 0, No. 1.45. С. 29.
123. Kesaniemi, Y. A., Witztum, J. L., Steinbrecher, U. P. Receptor-mediated catabolism of low density lipoprotein in man. Journal of Clinical Investigation. 1983. Vol. 71, No. 4. С. 950–959.
124. Perret, B., Ruidavets, J.-B., Vieu, C., та ін. Alcohol Consumption Is Associated With Enrichment of High-Density Lipoprotein Particles in Polyunsaturated Lipids and Increased Cholesterol Esterification Rate. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2002. Vol. 26, No. 8. С. 1134–1140.

125. Nelson, G. J., Kelley, D. S., Bartolini, G., та ін. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*. 2001. Vol. 36, No. 3. C. 229–236.
126. Berger, S., Raman, G., Vishwanathan, R., та ін. Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2015. Vol. 102, No. 2. C. 276–294.
127. Boadle-Biber, M. C. Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1993. Vol. 60, No. 1. C. 1–15.
128. Ladisich, W. Influence of stress on regional brain serotonin metabolism after progesterone treatment and upon plasma progesterone in the rat. *Journal of neural transmission*. 1975. Vol. 36, No. 1. C. 33–42.
129. Williams, C. J., Erickson, G. F. *Morphology and Physiology of the Ovary: Endotext*. 2012.
130. Couse J.F. та ін. The intraovarian actions of estrogen receptor-alpha are necessary to repress the formation of morphological and functional Leydig-like cells in the female gonad. *Endocrinology*. 2006. Vol. 147. No. 8. C.3666-78.
131. Mani, S. K., Oyola, M. G. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front Endocrinol*. 2012. Vol. 3. No. 7.
132. Yilmaz, C., Gökmen, V. Determination of tryptophan derivatives in kynurenine pathway in fermented foods using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2018. Vol. 243. C. 420–427.
133. Moffett, J. R., Namboodiri, M. A. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology*. Vol. 81. No.4. C. 247–265.
134. Pardridge W., Fierer G. Transport of tryptophan into brain from the circulating, albumin-bound pool in rats and in rabbits. *Journal of Neurochemistry*. 1990. Vol.54. C.971–976.

135. Salter, M., Knowles, R. G., Pogson, C. I. How does displacement of albumin-bound tryptophan cause sustained increases in the free tryptophan concentration in plasma and 5-hydroxytryptamine synthesis in brain? *Biochemical Journal*. 1989. Vol. 262, No. 1. C. 365–368.
136. Aleksandrov A., Konopelnyuk V., Ostapchenko L. Peripheral serotonin and tryptophan levels in rats under progesterone long-term administration. *Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. 2016. Vol. 1, No. 20. C. 5-7.
137. Tellechea, A., Leal, E. C., Kafanas, A., та ін. Mast cells regulate wound healing in diabetes: *Diabetes*, American Diabetes Association Inc., C. 2006–2019.
138. Bulló, M., García-Lorda, P., Megias, I., та ін. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*. 2003. Vol. 11, No. 4. C. 525–531.
139. Engeli, S., Feldpausch, M., Gorzelniak, K., та ін. Association between adiponectin and mediators of inflammation in obese women. *Diabetes*. 2003. Vol. 52, No. 4. C. 942–947.
140. O'Rourke, R. W., Kay, T., Lyle, E. A., та ін. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006. Vol. 146, No. 1. C. 39–46.
141. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., та ін. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes / 2002. 549–555 p.
142. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003. Vol. 73, No. 2. C. 209–212.
143. Spencer, M., Yao-Borengasser, A., Unal, R., та ін. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2010. Vol. 299, No. 6.

144. Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., та ін. Macrophages in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*. 2009. Vol. 58, No. November. C. 2574–2582.
145. Davies, L. C., Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages: Then and now. *Immunology*. 2015. Vol. 144, No. 4. C. 541–548.
146. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., та ін. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. 2003. Vol. 112, No. 12. C. 1796–1808.
147. Durmus, U., Duran, C., Ecirli, S. Visceral adiposity index levels in overweight and/or obese, and non-obese patients with polycystic ovary syndrome and its relationship with metabolic and inflammatory parameters. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2017. Vol. 40, No. 5. C. 487–497.
148. Shaw, O. M., Pool, B., Dalbeth, N., та ін. The effect of diet-induced obesity on the inflammatory phenotype of non-adipose-resident macrophages in an in vivo model of gout. *Rheumatology*. 2014. Vol. 53, No. 10. C. 1901–1905.
149. Wu, D., Ren, Z., Pae, M., та ін. Diet-induced obesity has a differential effect on adipose tissue and macrophage inflammatory responses of young and old mice. *BioFactors*. 2013. Vol. 39, No. 3. C. 326–333.
150. Zhang, M., Zhou, Z., Wang, J., та ін. MiR-130b promotes obesity associated adipose tissue inflammation and insulin resistance in diabetes mice through alleviating M2 macrophage polarization via repression of PPAR- $\gamma$ . *Immunology Letters*. 2016. Vol. 180. C. 1–8.
151. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007. Vol. 117, No. 1. C. 175–184.
152. Tsuchiya, K., Sakai, H., Suzuki, N., та ін. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 2007. Vol. 148, No. 10. C. 4548–4556.

153. Hrabák, A., Derzbach, L., Csuka, I., та ін. Role of nitric oxide (NO) metabolism and inflammatory mediators in childhood obesity. *Inflammation Research*. 2011. Vol. 60, No. 11. C. 1061–1070.
154. Joost, H. G., Tschöp, M. H. NO to obesity: Does nitric oxide regulate fat oxidation and insulin sensitivity?. *Endocrinology*. 2007. 4545–4547 p.
155. Gruber, H. J., Mayer, C., Mangge, H., та ін. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *International Journal of Obesity*. 2008. Vol. 32, No. 5. C. 826–831.
156. Albina, J. E., Mills, C. D., Henry, W. L., та ін. Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1990. Vol. 144, No. 10. C. 3877–80.
157. Takele, Y., Abebe, T., Weldegebreal, T., та ін. Arginase Activity in the Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis and HIV Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013. Vol. 7, No. 1. C. e1977.
158. Herbert, D. R., Orekov, T., Roloson, A., та ін. Arginase I Suppresses IL-12/IL-23p40–Driven Intestinal Inflammation during Acute Schistosomiasis. *The Journal of Immunology*. 2010. Vol. 184, No. 11. C. 6438–6446.
159. Zaytouni, T., Tsai, P. Y., Hitchcock, D. S., та ін. Critical role for arginase 2 in obesity-Associated pancreatic cancer. *Nature Communications*. 2017. Vol. 8, No. 1.
160. Mills, C. D., Shearer, J., Evans, R., та ін. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1992. Vol. 149, No. 8. C. 2709–14.
161. Rucker, D., Padwal, R., Li, S. K., та ін. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: Updated meta-analysis. *British Medical Journal*. 2007. Vol. 335, No. 7631. C. 1194–1199.
162. Belemets, N., Kobyljak, N., Virchenko, O., та ін. Effects of polyphenol

- compounds melanin on NAFLD/NASH prevention. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 88. C. 267–276.
163. Chan, M. Obesity and Diabetes: The Slow-Motion Disaster. *Milbank Quarterly*. 2017. Vol. 95, No. 1. C. 11–14.
164. Cascio, S., Ferla, R., D'Andrea, A., та ін. Expression of angiogenic regulators, VEGF and leptin, is regulated by the EGF/PI3K/STAT3 pathway in colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2009. Vol. 221, No. 1. C. 189–194.
165. Borgers, A. J., Koopman, K. E., Bisschop, P. H., та ін. Decreased serotonin transporter immunoreactivity in the human hypothalamic infundibular nucleus of overweight subjects. *Frontiers in Neuroscience*. 2014. Vol. 8.
166. Tkach, M., Théry, C. *Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go* / Cell Press, 2016. 1226–1232 p.
167. Barter, P., Gotto, A. M., LaRosa, J. C., та ін. HDL Cholesterol, Very Low Levels of LDL Cholesterol, and Cardiovascular Events. *New England Journal of Medicine*. 2007. Vol. 357, No. 13. C. 1301–1310.
168. Amirkhizi, F., Siassi, F., Minaie, S., та ін. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women? *ARYA Atherosclerosis*. 2007. Vol. 2, No. 4. C. 189–192.
169. Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., та ін. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*. 2011. Vol. 12, No. 5. C. 3117–3132.
170. Голишкін, Д. В., Фалалєєва, Т. М., Непорада, К. ., та ін. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу. *Фізіологічний журнал*. 2015. Vol. 61, No. 2. C. 65–72.
171. Nathan, C. Epidemic inflammation: Pondering obesity. *Mol Med*. 2008. Vol. 14. No. 7-8. C. 485–492.

172. Rao, X., Zhong, J., Sun, Q. The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes / Elsevier Inc., 2014. C. 59–66.
173. Liu, G., Li, M., Saeed, M., та ін.  $\alpha$ MSH inhibits adipose inflammation via reducing FoxOs transcription and blocking Akt/JNK pathway in mice. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, No. 29. C. 47642–47654.
174. Cao, W., Li, M., Wu, T., та ін.  $\alpha$ MSH prevents ROS-induced apoptosis by inhibiting Foxo1/mTORC2 in mice adipose tissue. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, No. 25. C. 40872–40884.
175. Vincent, H. K., Vincent, K. R., Bourguignon, C., та ін. Obesity and postexercise oxidative stress in older women. *Medicine and science in sports and exercise*. 2005. Vol. 37, No. 2. C. 213–9.
176. Wang, N., Liang, H., Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014. No.5 C.614
177. Ahn, J., Lee, H., Kim, S., та ін. Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. Vol. 364, No. 4. C. 972–977.
178. Lin, J., Della-Fera, M. A., Baile, C. A. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity Research*. 2005. Vol. 13, No. 6. C. 982–990.
179. Bulló, M., García-Lorda, P., Megias, I., та ін. Systemic Inflammation, Adipose Tissue Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. *Obesity Research*. 2003. Vol. 11, No. 4. C. 525–531.
180. Crippa, R., Horak, V., Prota, G., та ін. Chemistry of Melanins. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*. 1990. Vol. 36, No. C. C. 253–323.
181. Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., та ін. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *International Journal of Molecular*

Sciences. 2014. Vol. 16, No. 1. C. 378–400.

182. Bray, G. A., Bouchard, C. George A. Progress in Obesity—Multidisciplinary Research, Multidimensional Man. Diabetes Care. 2016. Vol. 39 No. 9. C. 1481–1485.