

УДК: 167.33:616.36+599.323.4

ЗМІНА БІОХІМІЧНОГО ПРОФІЛЮ ОРГАНІЗМУ ЗА УМОВ ТЕТРАХЛОРМЕТАН-ІНДУКОВАНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ

© Т. І. Галенова, Н. Г. Ракша, О. М. Савчук

У експерименті на щурах відтворено тетрахлорметан-індуковану модель токсичного ураження печінки. Динаміка зміни ключових біохімічних показників сироватки крові свідчить про прогресуючі процеси деструкції гепатоцитів та внутрішньопечінкового холестазу, що скоріш за все є наслідком активація процесів окисного стресу у відповідь на дію токсиканта. Отримані нами результати також вказують на дисбаланс про- та протизапальних цитокінів за умов інтоксикації тетрахлоретаном

Ключові слова: біохімічні показники крові, цитокіни, антиоксидантні ферменти, токсичне ураження печінки

The carbon tetrachloride-induced rat model of liver injury was described. Changes in serum biochemical parameters indicate a progressive process of the hepatocyte destruction and intrahepatic cholestasis, which most likely is the result of oxidative stress activation in response to toxicants. Our results also demonstrated an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines under conditions of tetrachloroethane intoxication

Keywords: blood biochemical parameters, cytokines, antioxidant enzymes, toxic liver injury

1. Вступ

Значне місце у структурі захворюваності, обумовленої дією токсичних чинників, займають хімічні ураження печінки – органу, який здійснює біотрансформацію речовин, що можуть надходити як ззовні, так і утворюватися в організмі. При токсичних пошкодженнях печінка сама перетворюється на джерело ендогенної інтоксикації, наслідком чого є розвиток вторинних метаболічних змін, що, у свою чергу, призводять до активації патологічних процесів в організмі, які негативно відображаються на функціонуванні різних органів та їх систем [1, 2]. Незважаючи на значні успіхи у діагностиці та лікуванні захворювань гепатобіліарної системи, пошук методів доступної та раціональної терапії й профілактики таких захворювань, як токсичні гепатити та цирози печінки, залишається надзвичайно актуальним. Створення ефектної моделі захворювання на тваринах, а саме на лабораторних щурах, дає можливість підвищити ефективність пошуку нових речовин з гепатопротекторною дією.

2. Огляд літератури

Існує багато способів моделювання уражень печінки у гризунів [3–5], що надає можливість експериментально відтворити розвиток порушення функціональної діяльності даного органу від різних стадій фіброзу до кінцевої стадії – цирозу. Залежно від дози хімічного реагенту, тривалості його дії, віку та лінії дослідних тварин розвиток патологічних процесів відбувається з різною швидкістю і може завершуватися на різних стадіях ураження. Використання тієї чи іншої моделі залежить від кінцевої мети дослідження.

При всьому різноманітті природи пускових факторів, універсальним механізмом токсичного ураження печінки є активація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), що сприяє прогресуванню патологічних змін у ланцюзі: пошкодження біомембран – цитоліз [6]. Ушкодження клітин, у свою чергу, є загальною ланкою розвитку запалення та фіброгенезу, які при хронізації патологічного процесу приз-

водять до формування цирозу печінки та розвитку його ускладнень. Сьогодні універсальною моделлю патології клітинних мембран, що супроводжується порушенням в клітині окисидантно-антиоксидантного гомеостазу, вважається токсичний гепатит, викликаний введенням тетрахлорметану (CCl₄) [7–9].

У літературі описані різні підходи щодо відтворення моделі CCl₄-індукованого ураження печінки. Найчастіше у експериментах використовують тетрахлорметан у вигляді 50 % олійного розчину, токсичність якого проявляється незалежно від способу його введення дослідним тваринам: під-шкірно [10], внутрішньошлунково [11], внутрішньочеревно [12–14], внутрішньом'язово [15]. Доза, інтервал та кратність введення токсичного розчину CCl₄ дослідним щурам можуть значно варіювати – з чим і пов'язано відтворення різних клінічних проявів токсичного ураження печінки у експерименті. У зв'язку з надзвичайно великою кількістю схем інтоксикації лабораторних тварин тетрахлорметаном, є певні труднощі в екстраполяції отриманих експериментальних даних (як щодо механізмів виникнення токсичного ураження, так і щодо пошуку підходів його профілактики та лікування) з вже існуючими в літературі. У зв'язку з цим нами було розроблено власний підхід щодо відтворення тетрахлорметан-індукованої моделі токсичного ураження печінки на статевозрілих лабораторних щурах та проаналізовано можливість використання цієї експериментальної моделі для подальшої розробки та оптимізації методів відновлення функції печінки.

3. Мета та задачі дослідження

Метою даної роботи було оцінити ключові біохімічні показники функціонального стану печінки у щурів за умов токсичного ураження тетрахлорметаном.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні задачі:

1. Дослідити ключові біохімічні показники у сироватці крові (активність печінкових ферментів, концентрацію загального та прямого білірубину, показники синтетичної активності печінки).

2. Дослідити активність ферментів антиоксидантного захисту (каталази та супероксиддисмутази) в сироватці крові та гомогенаті печінки щурів.

3. Визначити цитокиновий профіль (IFN γ , IL-1 β , IL-12, IL-4, IL-10) в сироватці крові та гомогенаті печінки щурів.

4. Матеріали та методи дослідження

Досліди виконані на 30 статевозрілих безпородних лабораторних щурах-самцях з початковою масою 250–280 г, яких утримували на повноцінному раціоні віварію з вільним доступом до їжі та води при температурі 19–21 °С. Експерименти на тваринах були проведені з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 року), «Загальних етичних принципів експериментів над тваринами», схвалених Національним конгресом з біоетики (20.09.04 р., Київ, Україна) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

З 10 щурів була сформована група інтактних дослідних тварин, яка слугувала контролем. Решта (20 гол.) були використані для експериментального відтворення моделі CCl $_4$ -індукованої гепатотоксичності. Моделлю токсичного ураження печінки служила інтоксикація щурів тетрахлорметаном, який вводили внутрішньочеревно щоденно протягом 7 днів із розрахунку 1 мл/кг маси щура у вигляді 50 % оливкового розчину. Тварин виводили з експерименту (після 16 годинного голодування) на 1 та 10 добу після останнього введення CCl $_4$. Летальність на 10 день експерименту становила 40 %.

У сироватці крові дослідних тварин визначали такі біохімічні показники функціонального стану печінки як концентрацію загального білка, альбуміну, сечовини, глюкози, холестеролу, ліпопротеїнів та активність ферментів – аланінамінотрансферази (АлАТ), аспаратамінотрансферази (АсАТ), гама-глутаматтрансферази (ГГТ) та лужної фосфатази (ЛФ). Визначення проводили за допомогою біохімічного аналізатора MicroLab 300 з використанням відповідних стандартних наборів виробництва фірми Human GmbH (Німеччина).

Показники активності ферментів антиоксидантного захисту та цитокиновий профіль досліджували в сироватці крові щурів та постмітохондріальному супернатанті 10 % гомогенату печінки, який готували на 50 ммоль/л Трис-НСІ-буфері (рН 7,4) [16].

Супероксиддисмутазну активність визначали за методом Т.В.Сироти, принцип якого полягає у здатності даного ферменту інгібувати аутоокислення адреналіну [17]. Каталазну активність встановлювали за методикою М. А. Королук і співавторів, що базується на здатності перекису водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [18]. Активність ферментів перераховували на мг білка, концентрацію якого визначали за методом Бредфорд [19].

Вміст цитокинів встановлювали методом імунно-ферментного аналізу. Зразки сироватки крові дослідних тварин попередньо розводили в десять разів 50 ммоль/л Трис-НСІ буфером (рН 7,4), який містив

0,13 моль/л NaCl, тоді як білковий матеріал постмітохондріального гомогенату печінки щурів розводили тим же буфером до концентрації 10 мкг/мл. Досліджувані проби, об'ємом 100 мкл інкубували в лунках 96-лункового планшету протягом ночі при 4 °С. Наступні етапи експерименту відповідали загальній схемі проведення імунферментного аналізу. У ході дослідження були використані первинні антитіла проти цитокинів: IFN- γ , IL-1 β , IL-12, IL-4 та IL-10 («Santa Cruz», США), відповідні вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Bio-Rad», США) та субстрат *o*-фенілендіамін/пероксид водню («Sigma», США). Про вміст цитокинів у досліджуваних зразках судили по величині адсорбції специфічних антитіл, яку визначали за оптичною густиною проб при довжині хвилі – 492 нм і виражали в умовних одиницях (ум. од.) у перерахунку на вміст загального білка (мг), який визначали методом Бредфорд [19].

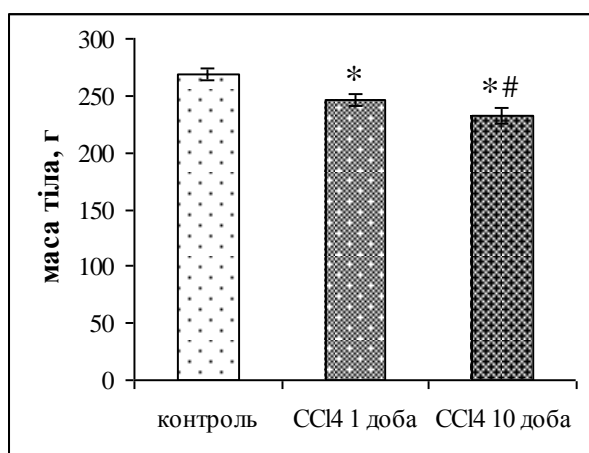
Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

5. Результати досліджень

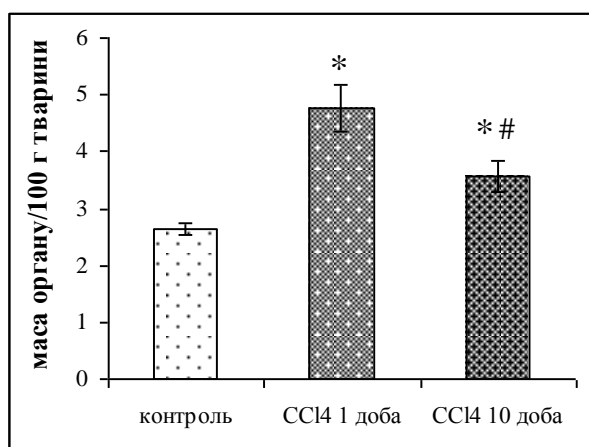
Результати досліджень свідчать про те, що змодельована форма CCl $_4$ -індукованого гепатиту супроводжувалася вираженими клінічними ознаками. У щурів з токсичним ураженням печінки відмічали пригнічення загального стану та прогресуюче зниження маси тіла (рис. 1, а).

При патолого-анатомічному розтині щурів з моделлю гепатотоксичності на 1 добу від останнього введення CCl $_4$ було відмічено збільшення розмірів печінки майже у 2 рази, порівняно з розмірами печінки у тварин контрольної групи (рис. 1, б). Окрім збільшених розмірів, печінка щурів з моделлю гепатотоксичності на 1 добу експерименту мала темно-вишневий колір паренхіми та в'ялу консистенцію, тоді як на 10 добу – паренхіма печінки дослідних щурів мала жовтуватий відтінок з помітним розростанням тяжів сполучної тканини. Такі дані свідчать про прогресуючі патологічні зміни у структурі органу і початок процесів фіброзу.

Отримані результати біохімічного дослідження крові свідчать про суттєві зміни показників у щурів з моделлю токсичного гепатиту, порівняно з контролем. Зокрема, на 1 добу після останнього введення CCl $_4$ був достовірно підвищений рівень активності ферментів: АлАТ – у 6,2 рази та АсАТ – у 3,1 рази, порівняно з контролем (табл. 1). Протягом наступних 10 днів активність ферментів у сироватці крові поступово знижувалась. Так, на 10 добу від останнього введення CCl $_4$ активність АсАТ та АлАТ була нижчою відповідно в 2,5 та 4,5 рази, порівняно з показниками на більш ранніх етапах токсичного ураження, однак рівень активності даних ферментів залишався достовірно високим, порівняно з контролем (табл. 1). Такі дані можуть вказувати або ж на поступове зменшення кількості зруйнованих гепатоцитів за рахунок компенсаторних процесів у печінці, або ж на повну деградацію клітин паренхіми печінки, які є джерелом даних ферментів.



а



б

Рис. 1. Дослідні щури із CCl₄-ураженням печінки на 1 та 10 добу експерименту: а – маса тіла; б – маса печінки; * – достовірні зміни порівняно з контролем, $p < 0,05$; # – достовірні зміни порівняно з групою CCl₄ 1 доба, $p < 0,05$.

Підвищення активності в плазмі крові таких ферментів, як АлАТ та АсАТ свідчить про порушення цілісності гепатоцитів і є надійним індикатором гострих уражень печінки. Однак, активність обох ферментів може підвищуватися при патологіях інших органів: серця, м'язової тканини, легенів. У зв'язку з тим, що співвідношення вмісту даних ферментів у органах різний, більш інформативно, для діагностики, використовувати показник співвідношення АсАТ/АлАТ – коефіцієнт де Рітца [20]. Згідно отриманих нами результатів, у щурів контрольної групи коефіцієнт АсАТ/АлАТ становив $2,29 \pm 0,21$. У тварин із CCl₄-ураженням печінки на 1 добу експерименту співвідношення величин АсАТ/АлАТ становило $1,25 \pm 0,11$, що може слугувати додатковим підтвердженням масивного пошкодження мембран гепатоцитів та виходу ферментів (більшою мірою АлАТ) у кров з пошкоджених тканин печінки. Однак, у щурів із CCl₄-ураженням печінки на 10 добу експерименту коефіцієнт АсАТ/АлАТ становив $3,03 \pm 0,39$, що може вказувати на відносно підвищення рівня АсАТ у сироватці крові тварин даної групи. Така закономірність має місце при некрозі печінкової тканини, так як у кров виходить і цитозольний і мітохондріальний пул ен-

зиму АсАТ, що може, у свою чергу, вказувати на розвиток цирозу печінки [20].

Гама-глутамілтранспептидаза (ГГТ) та лужна фосфатаза (ЛФ) – також специфічні для печінки ензими і є чутливими індикаторами її стану. Нами було встановлено підвищення активності ГГТ у 3,7 рази у сироватці крові щурів з моделлю токсичного ураження печінки на 1 добу експерименту, порівняно з контролем. Активність ГГТ залишалася на такому ж високому рівні і на 10 добу експерименту (табл. 1). Також було показано прогресуюче підвищення активності ЛФ у сироватці крові щурів з моделлю токсичного ураження печінки. Так, на 1 та 10 добу експерименту, показники активності даного ферменту перевищують контрольний у 1,7 та 2,6 рази, відповідно (табл. 1). Значне підвищення рівня активності ЛФ може вказувати на розвинений внутрішньопечінковий холестаза. Відомо, також що високі показники ГГТ та ЛФ можуть спостерігатися при цирозі та розвитку злоякісних пухлин печінки.

На нашу думку, така динаміка активності досліджених ферментів може свідчити про прогресуючі процеси деструкції гепатоцитів та внутрішньопечінкового холестаза внаслідок порушення архітекtonіки печінки та можливого розвитку циротичних змін.

При тривалій дії токсикантів, хронічна патологія печінки нерідко супроводжується розростанням сполучної тканини (фіброз). Рівень білірубину часто використовують для встановлення глибини субхронічних і хронічних уражень печінки. Отримані нами результати свідчать, що для щурів з моделлю CCl₄-індукованого ураження характерні суттєві зміни концентрації різних форм білірубину, порівняно з контролем (табл. 1). Зокрема, на 1 добу після останнього введення CCl₄ концентрація загального білірубину підвищувалася у 7,2 рази, прямого білірубину – у 2,6 рази, порівняно з контролем. Протягом наступних 10 днів досліджувані показники знизилися відповідно у 5,5 та 2 рази, порівняно з показниками на більш ранніх етапах токсичного ураження і були наближені до контрольних значень.

У печінці здійснюється синтез багатьох циркулюючих у крові речовин. Їх вміст у кровотоці є непрямим показником синтетичної активності даного органу. Найчастіше визначають альбумін, холестерол, тригліцериди, ліпопротеїди та глюкозу. Слід зазначити, що печінка має величезний резерв синтетичних функцій і внаслідок цього лише при дуже істотному дефіциті маси паренхіми органу слід чекати зміну показників.

Рівень глюкози на 1 добу після останнього введення CCl₄ вірогідно зменшився в крові тварин на 22%. Однак, протягом наступних 10 днів її рівень поступово підвищувався до контрольних значень (табл. 1). Ймовірно, при ураженні паренхіми печінки знижується рівень окислювальних процесів у гепатоцитах, що призводить до зниження активності глюконеогенезу та, як наслідок, до порушення участі печінки в регуляції рівня глюкози в крові.

Встановлено вірогідне зниження як загального білка, так і альбуміну в сироватці крові дослідних тварин з токсичним ураженням печінки на 1 добу експерименту відповідно на 25 та 20%, порівняно з контро-

лем. Показано, що протягом наступних 10 днів відбувається підвищення показників до контрольного рівня (табл. 1). Оскільки всі альбуміни плазми, 75–90 % α -глобулінів і 50 % β -глобулінів синтезуються гепато-

цитами, то гіпоальбумінемія та гіпопротеїнемія може свідчити про зниження інтенсивності білоксинтетичних процесів у гепатоцитах, що, як відомо, характерно для цитолітичного синдрому при ураженні печінки.

Таблиця 1

Біохімічні показники сироватки крові дослідних щурів($M \pm m$; $n=6$)

Показник	Контроль	CCl ₄ 1 доба	CCl ₄ 10 доба
АлАТ, од./л	58,7±4,3	360,2±163,0	78,5±4,8
АсАТ, од./л	145,4±21,0	449,4±35,9	180,9±17,9
ГГТ, од./л	1,7±0,4	5,2±2,8	6,2±0,5
ЛФ, од./л	220,8±44,7	367,9±73,5	563,1±130,5
загальний білірубін, мкмоль/л	2,6±0,7	10,6±5,1	3,3±1,7
прямий білірубін, мкмоль/л	0,9±0,2	2,1±0,9	1,1±0,4
глюкоза, ммоль/л	5,7±0,8	4,5±0,6*	4,6±0,3
загальний білок, мг/мл	81,0±6,8	59,9±9,7*	73,0±2,5
альбумін, мг/мл	38,2±3,4	31,0±4,3*	34,6±2,5
холестерол, ммоль/л	1,9±0,3	0,8±0,3*	1,7±0,3
сечовина, ммоль/л	5,7±0,8	10,0±1,3*	6,4±0,5
триацилгліцериди, ммоль/л	1,1±0,2	0,5±0,1*	1,2±0,2
ЛПВЩ, г/л	0,8±0,1	0,4±0,1*	0,6±0,1
ЛПНЩ, г/л	0,28±0,06	0,11±0,02*	0,27±0,01

Примітка: * – достовірні зміни порівняно з контролем, $p < 0,05$; # – достовірні зміни порівняно з групою CCl₄ (1 доба), $p < 0,05$

Концентрація сечовини як кінцевого продукту обміну білків та основної складової частини залишкового азоту у ссавців залежить від інтенсивності її синтезу та виведення. Тому її визначення є важливим діагностичним тестом як для печінки, де вона синтезується, так і для нирок, через які вона виводиться. Дані, наведені в таблиці 1, свідчать про те, що на 1 добу після останнього введення CCl₄ сечовинсинтетична функція печінки посилюється, про що свідчить підвищення вмісту сечовини в крові тварин на 74 % порівняно з таким у тварин контрольної групи. Одночасно такий показник слугує доказом можливого зниження активності видільної функції нирок за цих умов.

Як відомо, печінка бере активну участь у всіх етапах обміну жирів. В ній активно відбувається обмін стеринів, зокрема холестеролу, переважна кількість якого синтезується в організмі з ацетилкоензиму А, у тому числі 80 % його утворюється в печінці. У сироватці крові щурів на 1 добу після останнього введення токсину виявлено зниження вмісту холестеролу у 2,4 рази, порівняно з контролем (табл. 1), що, очевидно, може бути наслідком глибоких дистрофічних процесів у печінці та порушення синтетичної активності гепатоцитів. Однак на більш пізніх строках токсичного ураження спостерігали відновлення досліджуваного показника до контрольного рівня (табл. 1).

У сироватці крові щурів на 1 добу від останнього введення токсину встановлено вірогідно зменшений рівень тригліцеридів у 2,2 рази, ЛПВЩ у 2 рази та ЛПНЩ у 2,5 рази, порівняно з контролем. На 10 добу від останнього введення CCl₄ спостерігали відновлення досліджуваних показників до контрольного рівня (табл. 1). Отримані нами результати вказують на розвиток печінково-клітинної недостатності та розвиток внутрішньопечінкового холестазу.

Одним з найбільш вірогідних механізмів, що пояснюють подібні біохімічні зміни в крові піддослідних тварин за умов гострої інтоксикації CCl₄, є активація процесів перекисного окислення ліпідів. Це пов'язано з тим, що вільні радикали, які утворюються з CCl₄, сприяють пошкодженню мембран клітин, модуляції апоптозу, розвитку окисного стресу [7–9]. Згідно літературних даних, при інтоксикації тетрахлорметаном, у крові тварин спостерігалася активація процесів ПОЛ, що реєструється по наростанню концентрації вторинних продуктів ліпопероксидації.

Рівень ПОЛ пов'язаний із активністю антиоксидантних ферментів, що утворюють єдиний метаболічний ланцюг, внаслідок функціонування якого відбувається перетворення активних форм кисню на воду, спирти та інші нетоксичні для організму метаболіти. Представником першої лінії антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза (СОД) – пероксид: пероксид оксидоредуктаза (КФ 1.15.1.1), яка забезпечує переривання ланцюгів кисневозалежних вільно радикальних реакцій шляхом дисмутації супероксидного аніон-радикала (O_2^-) з подальшим утворенням триплетного кисню і перекису водню: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. За нейтралізацію ж пероксиду водню відповідає інший гемвмісний фермент – каталаза – пероксид гідрогену: пероксид гідрогену оксидоредуктаза (КФ 1.11.1.6).

При дослідженні активності СОД встановлено, що у сироватці крові тварин із CCl₄-ураженням печінки на 1 добу спостерігалася тенденція до підвищення активності ферменту (рис. 2, а), тоді як у гомогенаті печінки тварин даної групи активність СОД достовірно знижувалася на 30 %, порівняно з активністю ферменту в гомогенаті печінки контрольних тварин (рис. 2, б). На 10 добу від моменту введення CCl₄ спостерігали значне зростання показників активності СОД як у сироватці (у 1,6 рази), так і у гомогенаті печінки (у 2,2 рази),

порівняно з відповідними показниками контрольних тварин (рис. 2).

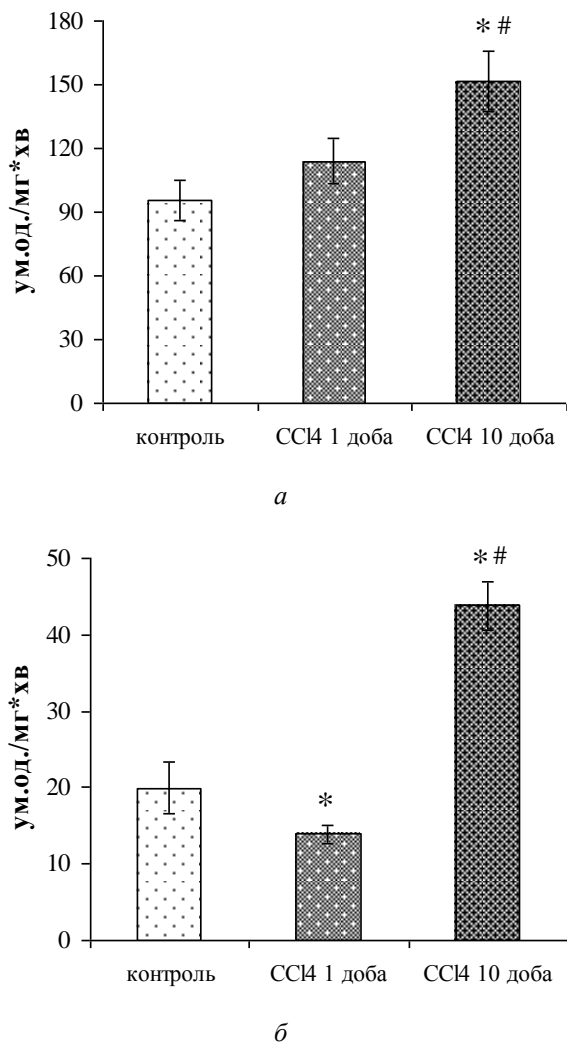


Рис. 2. Дослідні щури із CCl₄-ураженням печінки на 1 та 10 добу експерименту: а – супероксиддисмутазна активність у сироватці; б – гомогенаті печінки; * – достовірні зміни порівняно з контролем, p<0,05; # – достовірні зміни порівняно з групою CCl₄ 1 доба, p<0,05

У результаті проведених досліджень встановлено, що у сироватці крові тварин із CCl₄-ураженням печінки на 1 добу спостерігалось значне зростання активності каталази: у 2 рази, порівняно з контролем (рис. 3, а), тоді як у гомогенаті печінки тварин даної групи активність ферменту навпаки знижувалася у 2 рази, порівняно з активністю ферменту в гомогенаті печінки контрольних тварин (рис. 3, б). На 10 добу від моменту введення CCl₄ спостерігали відновлення показників активності каталази до контрольного, як у сироватці крові, так і гомогенаті печінки дослідних тварин (рис. 3).

Пригнічення активності СОД та каталази у клітинах печінки щурів із CCl₄-ураженням на 1 добу експерименту очевидно може бути обумовлено суттєвим виснаженням пулу ферментів внаслідок посиленого їх використання на нейтралізацію вільних радикалів, продукція яких значно інтенсифікується у печінці тва-

рин під впливом тетрахлорметану. З іншого боку, достовірно відомо про безпосередній вплив активних форм кисню на ступінь окиснення іонів металів в активних центрах ензимів, що обумовлює пригнічення їх функціонування. Зростання активності СОД та каталази в сироватці крові щурів з CCl₄-ураженням на 1 добу експерименту скоріш за все обумовлено значним виходом ферментів у кровотік на фоні масивного ушкодження (цитолізу) гепатоцитів.

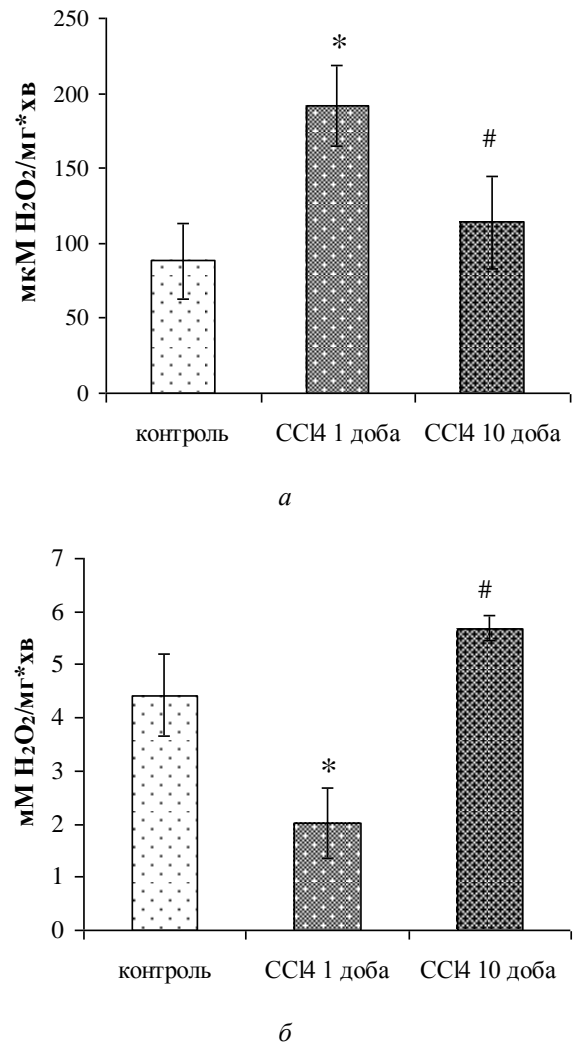


Рис. 3. Дослідні щури із CCl₄-ураженням печінки на 1 та 10 добу експерименту: а – каталазна активність у сироватці; б – гомогенаті печінки; * – достовірні зміни порівняно з контролем, p<0,05; # – достовірні зміни порівняно з групою CCl₄ 1 доба, p<0,05

Однак зростання активності ферментів антиоксидантного захисту в сироватці крові та гомогенаті печінки тварин CCl₄-ураженням печінки на більш пізніх строках експерименту може бути пов'язано з увімкненням компенсаторних механізмів захисту (наприклад, підвищенням синтезом даних ферментів) у відповідь на стан оксидантного стресу, що направлено на підтримання фізіологічного гомеостазу.

Цитокіни – це ендogenous, біологічно-активні поліпептидні медіатори, що являють собою велику гетерогенну групу низькомолекулярних, неспецифічних стосовно антигенів, білків-глікопротеїдів, які

продукуються активованими клітинами різних типів, у тому числі макрофагами і куперівськими клітинами печінки, у відповідь на зовнішній позаклітинний стимул і беруть участь у формуванні та регуляції захисних реакцій організму. При тривалому хронічному запаленні вони служать одними з медіаторів деструкції тканин.

Гепатоцити дуже чутливі до дії цитокінів, так як містять на своїй поверхні цілий ряд специфічних рецепторів, через які здійснюється регуляція процесів білкового синтезу, проліферації, диференціації, спеціалізованого функціонування та апоптозу клітин печінки. У запуску специфічного імунної відповіді беруть участь прозапальні цитокіни: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , IFN- γ , тоді як протизапальні цитокіни – IL-4, IL-10, IL-13, TGF – беруть участь у розвитку реакцій протизапального процесу і пригнічують синтез інтерлейкінів прозапального ряду.

Показники ІФА досліджень свідчать, що CCl₄-індуковане ураження печінки характеризується, вираженою імунною відповіддю на дію токсиканта, про що свідчить зміна вмісту цитокінів у сироватці та гомогенаті печінки дослідних щурів на різних термінах експерименту (табл. 2).

Токсичні метаболіти тетрахлоретану, а також первинні та вторинні продукти ліпопероксидації, що

в надлишку утворюються та накопичуються в клітинах печінки щурів на 1 добу токсичного ураження можуть запускати каскад реакцій, у результаті яких посилюється утворення прозапальних цитокінів клітинами даного органу, що було підтверджено отриманими експериментальними даними: показники вмісту IFN γ та IL-1 β зростали відповідно на 62 % та 42 %, порівняно з контролем. На 10 добу токсичного ураження, вміст IFN γ та IL-1 β залишався на такому ж високому рівні (табл. 2). Необхідно відмітити, що дані прозапальні цитокіни можуть викликати продукцію фіброгенних чинників (TGF- β) і як наслідок ініціювати процес фіброгенезу, що загалом узгоджується з раніше описаними показниками біохімічного аналізу сироватки крові дослідних щурів: підвищена активність ГГТ та ЛФ на пізніх термінах експерименту є підтвердженням активації фіброзу тканин печінки.

Зміна цитокінового профілю в сироватці крові щурів з моделлю токсичного ураження печінки скоріш за все корелює зі зміною загальної фракції білків за таких умов. Так, на нашу думку, однонаправлене зниження як прозапальних, так і протизапальних цитокінів, – в середньому на 25–30 %, можна пояснити станом гіпопротеїнемії, на 1 добу токсичного ураження тетрахлорметаном (табл. 1).

Таблиця 2

Цитокіновий профіль в сироватці крові та гомогенаті печінки дослідних щурів (M \pm m; n=6)

		Сироватка крові ум. од./мл сироватки			Гомогенат печінки ум. од./мг білка		
		контроль	CCl ₄ 1 доба	CCl ₄ 10 доба	контроль	CCl ₄ 1 доба	CCl ₄ 10 доба
прозапальні	IFN γ	8,6 \pm 1,3	6,0 \pm 0,5*	11,1 \pm 1,2 [#]	15,0 \pm 3,5	24,3 \pm 3,2*	30,8 \pm 2,5* [#]
	IL-1 β	21,6 \pm 2,6	14,8 \pm 2,8*	25,2 \pm 3,7 [#]	24,3 \pm 3,9	34,0 \pm 3,6*	32,5 \pm 2,8*
	IL-12	60,0 \pm 5,7	42,3 \pm 5,0*	55,5 \pm 2,5 [#]	82,6 \pm 14,0	70,9 \pm 10,1	74,5 \pm 8,5
протизапальні	IL-4	34,4 \pm 2,8	39,6 \pm 3,9	45,0 \pm 4,0*	107,5 \pm 9,9	68,5 \pm 10,2*	95,8 \pm 3,9 [#]
	IL-10	24,5 \pm 2,6	18,6 \pm 1,8*	7,8 \pm 1,9* [#]	88,7 \pm 10,3	47,0 \pm 10,8*	80,0 \pm 5,7 [#]

Примітки: * – достовірні зміни порівняно з контролем, $p < 0,05$; # – достовірні зміни порівняно з групою CCl₄ (1 доба), $p < 0,05$

6. Висновки

Таким чином, апробована нами модель тетрахлоретан-індукованого ураження у лабораторних тварин супроводжувалася значними морфо-функціональними змінами печінки. Виражене збільшення активності АлАТ та АсАТ може свідчити про пошко-

дження як зовнішньої так і мітохондріальної мембран гепатоцитів під дією CCl₄. Збільшення активності γ -ГГТ і ЛФ у крові лабораторних тварин може вказувати на масивний некроз гепатоцитів, що виникає під впливом на організм щурів тетрахлорметану. Однак підвищення концентрації білірубину, переважно за

рахунок його прямої фракції, на тлі високої активності γ -ГГТ і ЛФ вказує не лише на формування синдрому цитолізу у підслідних тварин, а й на розвиток синдрому внутрішньопечінкового холестазу.

Як показали наші дослідження, гостра інтоксикація тетрахлорметаном приводила до значного порушення синтетичної функції печінки. На підставі отриманих біохімічних даних у щурів з моделлю тетрахлорметан-індукованого ураження була діагностована вторинна гіпопротеїнемія та дисліпопротеїдемія. Виявлена в ході проведеного дослідження гіпоглікемія у лабораторних тварин, підданих інтоксикації тетрахлорметаном, мабуть, пов'язана з порушенням протікання процесів глікогенолізу і глікогенезу в печінці, а саме з гальмуванням глікогенезу.

Отримані нами результати також вказують на дисбаланс про- та антиоксидантного статусу за умов інтоксикації тетрахлоретаном. Підвищену експресію прозапальних цитокінів на фоні зниження цитокінів прозапального ряду можна розцінювати як, з одного боку, початкову причину розвитку імунної відповіді в тканинах ураженого органу, а, з іншого, як рушійну силу прогресування пошкоджень тканин даного органу. Такі дані можуть свідчити про негативний прогноз перебігу патологічного процесу ураження печінки тетрахлорметаном.

На нашу думку дана модель може бути використана у експериментах, щодо дослідження профілактичної та терапевтичної дії потенційних лікарських речовин. Запропонована нами схема відтворення токсичного ураження є простою та швидкою у виконанні. Тоді як її клінічні прояви яскраво виражені і супроводжується значними змінами ряду біохімічних показників. Немало важливим фактом є необоротність процесу ураження печінки. Усе це надає підставу рекомендувати дану модель до подальшого використання при пошуку та розробці методів лікування токсичного ураження печінки та профілактики розвитку ускладнень пов'язаних з негативною дією ксенобіотиків різної природи.

Література

- Häussinger, D. Physiological Functions of the Liver [Text] / D. Häussinger // *Comprehensive Human Physiology*. – 1996. – P. 1369–1391. doi: 10.1007/978-3-642-60946-6_68
- Gumucio, J. J. Liver cell heterogeneity and liver function [Text] / J. J. Gumucio, J. Chianale; I. M. Arias, W. B. Jacoby, H. Popper, D. Schachter, D. A. Shafritz (Eds.) // *The Liver: Biology and Pathobiology*. – New York: Raven Press, 1988. – P. 931–947.
- Bhakuni, G. S. Animal models of hepatotoxicity [Text] / G. S. Bhakuni, O. Bedi, J. Bariwal, R. Deshmukh, P. Kumar // *Inflammation Research*. – 2015. – Vol. 65, Issue 1. – P. 13–24. doi: 10.1007/s00011-015-0883-0
- Liu, Y. Animal models of chronic liver diseases [Text] / Y. Liu, C. Meyer, C. Xu, H. Weng, C. Hellerbrand, P. ten Dijke, S. Dooley // *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2012. – Vol. 304, Issue 5. – P. G449–G468. doi: 10.1152/ajpgi.00199.2012
- Singh, G. Experimental models for hepatotoxicity [Text] / G. Singh, N. Dhadwal, S. L. Harikumar // *Asian J. Pharm. Clin. Res.* – 2015. – Vol. 8, Issue 2. – P. 70–74
- Muriel, P. Role of free radicals in liver diseases [Text] / P. Muriel // *Hepatology International*. – 2009. – Vol. 3, Issue 4. – P. 526–536. doi: 10.1007/s12072-009-9158-6

- Weber, L. W. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model [Text] / L. W. D. Weber, M. Boll, A. Stampfl // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2003. – Vol. 33, Issue 2. – P. 105–136. doi: 10.1080/713611034

- Comporti, M. Three models of free radical-induced cell injury [Text] / M. Comporti // *Chemico-Biological Interactions*. – 1989. – Vol. 72, Issue 1-2. – P. 1–56. doi: 10.1016/0009-2797(89)90016-1

- Manibusan, M. K. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review [Text] / M. K. Manibusan, M. Odin, D. A. Eastmond // *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. – 2007. – Vol. 25, Issue 3. – P. 185–209. doi: 10.1080/10590500701569398

- Смольякова, В. И. Гепатопротекторные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлоретаном [Текст] / В. И. Смольякова, М. Б. Плотников, Г. А. Чернышева, И. С. Иванов, А. Е. Просенко, Н. В. Кандалицева // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2011. – Т. 74, № 8. – С. 37–40.

- Файзуллин, О. В. Гістоморфологічна оцінка лікувальної дії густого екстракту з листя винограду культурного в умовах гострого токсичного ураження печінки у щурів, викликаного тетрахлоретаном [Текст] / О. В. Файзуллин // *Український медичний альманах*. – 2013. – Т. 16, № 2. – С. 148–150.

- Dongare, P. P. Standardization of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat [Text] / P. P. Dongare, S. R. Dhande, V. J. Kadam // *Am. J. PharmTech Res.* – 2013. – Vol. 3, Issue 5.

- Драгулян, М. В. Моделирование токсичного пошкодження печінки на лінії мишей *ICR* [Текст] / М. В. Драгулян, Т. П. Гулько, В. А. Кордюм, Р. В. Бубнов, О. Г. Дерябіна // *ScienceRise*. – 2014. – Т. 4, № 1 (4). – С. 13–20. doi: 10.15587/2313-8416.2014.29151

- Halenova, T. I. Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl4-induced acute liver injury in rats [Text] / T. I. Halenova, I. M. Varenjuk, N. M. Roslova, M. E. Dzerzhynsky, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko et. al. // T. I. Halenova, I. M. Varenjuk, N. M. Roslova, M. E. Dzerzhynsky, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko. – 2016. – Vol. 6, Issue 102. – P. 100046–100055. doi: 10.1039/c6ra20291h

- Рагулина, В. А. Зависимость между антиоксидантным действием производных 3-гидроксипиридина и их влиянием на вазодилатирующую функцию эндотелия в условиях эндотелиальной дисфункции [Текст] / В. А. Рагулина // *Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация*. – 2012. – № 4 (123). – С. 212–215.

- Рибальченко, В. К. Структура и функции мембран: Практикум [Текст] / В. К. Рибальченко, М. М. Коганов. – К.: Вища школа. – 1988. – 312 с.

- Сирота, Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы [Текст] / Т. В. Сирота // *Биомедицинская химия*. – 1999. – Т. 45, № 3. – С. 263–272.

- Королук, М. А. Метод определения активности каталазы [Текст] / М. А. Королук, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, Е. В. Токорев // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

- Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [Text] / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.

- Nyblom H., Björnsson E., Simrén M., Aldenborg F., Almer S., Olsson R. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC [Text] / H. Nyblom, E. Björnsson, M. Simrén, F. Aldenborg, S. Almer, R. Olsson // *Liver International*. – 2006. – Vol. 26, Issue 7. – P. 840–845. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01304.x

References

1. Häussinger, D. (1996). Physiological Functions of the Liver. *Comprehensive Human Physiology*, 1369–1391. doi: 10.1007/978-3-642-60946-6_68
2. Gumucio, J. J., Chianale, J.; Arias, I. M., Jacoby, W. B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D. A. (Eds.) (1988). Liver cell heterogeneity and liver function. *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press, 931–947.
3. Bhakuni, G. S., Bedi, O., Bariwal, J., Deshmukh, R., Kumar, P. (2015). Animal models of hepatotoxicity. *Inflammation Research*, 65 (1), 13–24. doi: 10.1007/s00011-015-0883-0
4. Liu, Y., Meyer, C., Xu, C., Weng, H., Hellerbrand, C., ten Dijke, P., Dooley, S. (2012). Animal models of chronic liver diseases. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304 (5), G449–G468. doi: 10.1152/ajpgi.00199.2012
5. Singh, G., Dhadwal, N., Harikumar, S. L. (2015). Experimental models for hepatotoxicity. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 8 (2), 70–74
6. Muriel, P. (2009). Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology International*, 3 (4), 526–536. doi: 10.1007/s12072-009-9158-6
7. Weber, L. W. D., Boll, M., Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model. *Critical Reviews in Toxicology*, 33 (2), 105–136. doi: 10.1080/713611034
8. Comporti, M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions*, 72 (1-2), 1–56. doi: 10.1016/0009-2797(89)90016-1
9. Manibusan, M. K., Odin, M., Eastmond, D. A. (2007). Postulated Carbon Tetrachloride Mode of Action: A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 25 (3), 185–209. doi: 10.1080/10590500701569398
10. Smol'yakova, V. I., Plotnikov, M. B., Chernyshova, G. A., Ivanov, I. S., Prosenko, A. E., Kandalintseva, N. V. (2011). Hepatoprotective effect of thiophane in rats with experimental carbon tetrachloride-induced hepatitis. *Experimental and Clinical Pharmacology*, 74 (8), 37–40.
11. Faizullin, A. V. (2013). Histomorphological evaluation of the therapeutic action of spissum extract of vitus vinifera leaves, under acute hepatitis, caused by carbon tetrachloride. *Ukrai'ns'kyj medychnyj al'manah*, 16 (2), 148–150.
12. Dongare, P. P., Dhande, S. R., Kadam, V. J. (2013). Standardization of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Am. J. PharmTech Res.*, 3 (5).
13. Drahulian, M., Gulko, T., Kordium, V. A., Deryabina, O. (2014). Modelling of toxic liver damage on line ICR mice. *ScienceRise*, 4/1 (4), 13–20. doi: 10.15587/2313-8416.2014.29151
14. Halenova, T. I., Vareniuk, I. M., Roslova, N. M., Dzerzhynsky, M. E., Savchuk, O. M., Ostapchenko, L. I. et. al. (2016). Hepatoprotective effect of orally applied water-soluble pristine C60 fullerene against CCl4-induced acute liver injury in rats. *RSC Adv.*, 6 (102), 100046–100055. doi: 10.1039/c6ra20291h
15. Ragulina, V. A. (2012). Relationship between the antioxidant effect of 3-hydroxypyridine and their influence on endothelium vasodilating effect in endothelial dysfunction v.a. ragulina. *Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy*, 4 (123), 212–216.
16. Rybalchenko, V. K., Koganov, M. M. (1988). Structure and function of membrane. *Kyiv: Vischa Shkola*, 312.
17. Sirota, T. V. (1999). A new approach to the investigation of adrenaline autooxidation and its application for determination of superoxide dismutase activity. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 45 (3), 263–272.
18. Korolyuk, M. A., Ivanova, L. I., Maiorova, I. G., Tokarev, V. E. (1988). A method for measuring catalase activity. *Lab Delo*, 16–19.
19. Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
20. Nyblom, H., Bjornsson, E., Simren, M., Aldenborg, F., Almer, S., Olsson, R. (2006). The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver International*, 26 (7), 840–845. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01304.x

Дата надходження рукопису 20.09.2016

Галенова Тетяна Іванівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, м. Київ, Україна, 01601
E-mail: galenovatanya@rambler.ru

Ракша Наталія Григорівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, м. Київ, Україна, 01601
E-mail: nkudina@ukr.net

Савчук Олексій Миколайович, доктор біологічних наук, професор кафедри біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, м. Київ, Україна, 01601
E-mail: olexiy.savchuk@yandex.ru