

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ДИНАМІКА МАРКЕРІВ ЗАПАЛЕННЯ ПІСЛЯ ЧАСТКОВОЇ
ГЕПАТЕКТОМІЇ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 600 М групи

Нікорич Марія Володимирівна

Керівник:

д.б.н., професор **Копильчук Г.П.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол № _____ від _____ 2023 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена дослідженню вмісту біомаркерів запалення у сироватці крові щурів, які зазнали токсичного ураження медикаментозним ксенобіотиком-ацетамінофеном.

Встановлено максимальне підвищення рівня С-реактивного білка та прокальцитоніну в сироватці крові, яке супроводжується токсичним ураженням ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну, що можна розглядати як прогностичні біомаркери системної запальної реакції за даних експериментальних умов. Токсичне ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну призводить до гіперпродукції фактора некрозу пухлин-альфа, інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-10 та інтерлейкіну-8 в сироватці крові щурів.

У групі інтактних щурів після ЧГЕ рівень цитокінів TNF- α , IL-6 та IL-10 зростає лише на початковій стадії (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год), що можна розглядати як активну запальну відповідь після оперативного втручання для переведення гепатоцитів в активну фазу клітинного циклу. У групі щурів ТУ/ЧГЕ стимуляція синтезу даних цитокінів впродовж всього експерименту вказує на некерований процес регенерації печінки внаслідок чого порушення архітекtonіки органу може призвести до формування фіброзних тяжів. У сироватці крові інтактних щурів після ЧГЕ незначне зростання вмісту С-реактивного білка та прокальцитоніну відбувається лише впродовж 48 год регенеративного процесу, тоді як у тварин із токсичним ураженням після ЧГЕ високі рівні даних показників впродовж всього експериментального періоду можуть слугувати маркерами посиленої та некерованої системної запальної реакції у щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії.

Ключові слова: біомаркери, С-реактивний білок, прокальцитонін, фактор некрозу пухлини-альфа, інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, інтерлейкін-10, часткова гепатектомія, імуноферментний аналіз (ІФА).

SUMMARY

The thesis is dedicated to the investigation of inflammatory biomarkers in the serum of rats that have undergone toxic exposure to the xenobiotic acetaminophen. A significant increase in the levels of C-reactive protein and procalcitonin in the blood serum has been observed, accompanied by acetaminophen-induced toxicity in the context of protein malnutrition. These findings can be considered prognostic biomarkers of a systemic inflammatory reaction under experimental conditions.

Toxic exposure in the context of protein malnutrition leads to hyperproduction of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-8 in the blood serum of rats. In the group of intact rats after partial hepatectomy (PHx), the levels of TNF- α , IL-6, and IL-10 cytokines increase only at the initial stage (24 hours) and during the active cell proliferation period (48 hours), indicative of an active inflammatory response following the surgical intervention to induce hepatocytes into an active phase of the cell cycle. In the group of rats with toxic exposure/partial hepatectomy (TE/PHx), the stimulation of cytokine synthesis throughout the experiment suggests an uncontrolled process of liver regeneration, potentially leading to the disruption of organ architecture and the formation of fibrous bands. In the serum of intact rats after partial hepatectomy (PHx), a slight increase in the levels of C-reactive protein and procalcitonin occurs only during the 48-hour period of the regenerative process. In contrast, in animals with toxic exposure after PHx, elevated levels of these indicators throughout the entire experimental period may serve as markers of heightened and uncontrolled systemic inflammatory reactions in rats with acetaminophen-induced toxicity following partial hepatectomy.

Key words: *biomarkers, C-reactive protein, procalcitonin, tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, partial hepatectomy, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).*

ЗМІСТ

ВСТУП	6
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Регенерація печінки	8
1.2. С-реактивний білок як неспецифічний маркер запалення	10
1.3. Прокальцитонін як маркер запалення і сепсису	12
1.4. Прокальцитонін і С-реактивний білок	16
1.5. Прокальцитонін та інтерлейкіни	16
1.6. Цитокіни як маркери запалення	17
1.6. 1. Інтерлейкін-6	17
1.6.2. Інтерлейкін-8	20
1.6.3. Інтерлейкін 10	22
1.6.4. Фактор некрозу пухлини	24
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	28
2.1. Об'єкти та модель дослідження	28
2.2. Імуноферментний послідовний аналіз	29
2.2.1. Визначення рівня прокальцитоніну в крові методом ІФА	30
2.2.2. Визначення рівня СРБ в крові методом ІФА	30
2.2.3. Визначення рівня фактору некрозу пухлин (ФНП) в крові методом ІФА	31
2.2.4. Визначення рівня ІЛ-6 в крові методом ІФА	32
2.2.5. Визначення рівня ІЛ-8 в крові методом ІФА	32
2.2.6. Визначення рівня ІЛ-10 в крові методом ІФА	33
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	34
ВИСНОВКИ	62
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	63
ДОДАТКИ	81

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

СРБ (CRP) – С-реактивний білок
 ЧГЕ – часткова гепатектомія
 TNF- α (ФНП)– фактор некрозу пухлин альфа
 IL-6 – інтерлейкін 6
 IL-8 – інтерлейкін 8
 IL-10 – нтерлейкін 10
 К – контроль
 Ту – токсичне урадження
 НІР – низько протеїновий раціон
 НІР+ТУ – низько протеїновий раціон при токсичному уражені
 КК – клітини Купфера
 СЕК – синусоїдальні ендотеліальні клітини
 ЗСК – зірчасті клітини
 Т3 – трийодтиронін
 EGF – епідермальний фактор росту
 TGF – трансформуючий фактор росту
 HGF – фактор росту гепатоцитів
 IFN- γ – інтерферон γ
 ELISA (ІФА) – імуноферментний аналіз
 PCT – прокальцитонін
 СТ – кальцитонін
 РНК-рибонуклеїнова кислота
 мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота
 ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень
 ГЦК – гепатоцелюлярна карцином
 HCV – вірус гепатиту С
 Th-T – хелпери
 CRH – кортикотропін-рилізінг-гормону
 ТМБ – тетраметилбензидин
 ГПН – гостра печінкова недостатність
 LPS – ліпополісахарид
 TGF- β – тромбоцитарний фактор росту
 JNK – c-Jun-N-кінцева кіназа
 TLR – Toll-подібний рецептор
 ЛПС – ліпополісахариди
 DAMP – damage-associated molecular patterns

ВСТУП

Останні роки характеризуються стрімким збільшенням патологій печінки, які розвиваються на тлі нутритивного дисбалансу харчового раціону. Аліментарна депривація протеїну навіть при надлишку надходження енергетичних субстратів часто призводить до функціональної недостатності органів, що збільшує сприйнятливість до інфекцій та/або індукує жирову інфільтрацію печінки.

Водночас досить часто перебіг аліментарно-залежних захворювань посилюється внаслідок безсистемного використання широкого спектру загальнодоступних лікарських засобів, які використовують для корекції патологічних станів. Нині найпоширенішим безрецептурним анальгетиком-антипіретиком є парацетамол (ацетамінофен, N-ацетил-р-амінофенол), який вважають безпечнішим порівняно з нестероїдними протизапальними засобами (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, диклофенак тощо).

Фактично, ацетамінофен-індуковані ураження вийшли у лідери серед причин гострої печінкової недостатності.

У літературі зазначається, що токсичне ураження печінки може бути різного ступеня – від стеатозу печінки, що переходить у стеатогепатит та навіть закінчується цирозом печінки. Проте існуючі відмінні характеристики швидкості та характеру патологічних змін досить часто не мають наукового обґрунтування, що супроводжується важкістю встановлення критеріїв лабораторної діагностики біохімічних змін, за якими можна було б контролювати прогресування захворювання. Тому доцільним в даному випадку є визначення маркерів запалення.

Підвищення рівнів цитокінів можуть бути частиною стратегії захисту організму для відновлення пошкодженої печінки та контролю запалення, відповідно. Цікаво, що IL-10 інгібує прозапальні цитокіни, такі як TNF- α , тим самим покращуючи перебіг ушкодження печінки, але він інгібує й

гепатопротекторні цитокіни, такі як IL-6, тим самим потенціюючи розвиток гепатопатологій та зменшуючи регенераційний потенціал печінки.

Печінка – основний метаболічний орган в організмі, що володіє здатністю до регенерації. Тоді як часткова гепатектомія (ЧГЕ) є популярною моделлю для вивчення регенерації печінки, печінка також регенерує після гострого ушкодження, але менше відомо про механізми, які керують цим процесом.

Нещодавні дослідження показали, що регенерація печінки має вирішальне значення для виживання при гострій печінковій недостатності (ГПН), яка зазвичай виникає внаслідок медикаментозного ураження печінки. Іноді припускають, що задіяні сигнальні шляхи подібні до тих, які регулюють регенерацію після ЧГЕ, але, ймовірно, існують критичні відмінності. Краще розуміння механізмів регенерації після гепатотоксичності загалом може призвести до розробки нових методів лікування для пацієнтів з ГПН та нових біомаркерів для прогнозування результатів захворювань.

Метою роботи стало дослідження біомаркерів запалення в сироватці крові щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної депривації протеїну та репаративної регенерації після часткової гепатектомії.

Досягнення поставленої мети передбачало виконання низки завдань:

- За умов аліментарної нестачі протеїну та токсичного ураження ацетамінофеном в сироватці крові щурів дослідити вміст С-реактивного білка та прокальцитоніну, а також рівні цитоків – фактору некрозу пухлини-альфа, інтерлейкінів-6, -8 та -10.
- За умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії в сироватці крові щурів дослідити рівні цитоків – фактору некрозу пухлини-альфа, інтерлейкінів-6, -8 та -10 та вміст С-реактивного білка та прокальцитоніну як маркери запалення.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Регенерація печінки

Відомо, що при втраті значного обсягу печінки, вона негайно починає регенерувати, щоб відновити свої початкові функції та об'єм. У миші лише 2–3 дні потрібні для відновлення приблизно 50% втраченого об'єму печінки після 2/3 часткової гепатектомії, але більше кількох тижнів для повного відновлення [1]. Таким чином, здається, що печінка негайно намагається підтримувати мінімальну функцію для підтримки життя у відповідь на втрату об'єму/функції печінки. Однак після досягнення мінімальної функції, необхідної для виживання, швидкість регенерації печінки знижується.

Печінка складається з різних типів клітин (паренхіматозних і непаренхіматозних клітин), включаючи гепатоцити, клітини Купфера (КК), синусоїдальні ендотеліальні клітини (СЕК), зірчасті клітини печінки (ЗСК) і стовбурові клітини печінки [2]. Ці клітини розвивають складну координуючу мережу всередині печінки, щоб функціонувати як орган. Ця добре організована внутрішньопечінкова клітинна мережа тісно пов'язана з позапечінковими клітинами/органами по всьому тілу, включаючи щитовидну залозу, наднирники, підшлункову залозу, дванадцятипалу кишку, тромбоцити, селезінці та вегетативній нервовій системі. Позапечінкові тканини/органи синхронно та координовано впливають/регулюють функцію печінки та клітин печінки через гормони (інсулін, глюкагон, Т3, норадреналін, соматостатин та серотонін) та фактори росту (епідермальний фактор росту (EGF) та трансформуючий фактор росту (TGF) [3].

Позапечінкові органи синхронно та координовано впливають/регулюють функцію печінки та клітин печінки через гормони та фактори росту. Відомо, що вони опосередковуються факторами росту (фактор росту гепатоцитів (HGF), TGF- α і - β) і цитокінами (інтерлейкін IL-6, фактор некрозу пухлини (TNF- α та інтерферон IFN- γ) [4-6]. Така багатофакторна система контролю в печінці робить можливим точне регулювання регенерації

печінки. Мережа між печінкою та іншими органами буде змінюватися і провокувати різні сигнали в непаренхіматозних і паренхіматозних клітинах печінки для досягнення ефективної регенерації органів без затримки.

За нормальних умов гепатоцити знаходяться в стані спокою (фаза G0), а клітини майже не переходять у фазу мітозу. Як тільки гепатоцити піддаються стресам, таким як хірургічна резекція та ліки, вони негайно реагують на мітогени, переходять до мітотичної фази та починають проліферувати. Цей процес може значною мірою залежати від взаємодії між гепатоцитами та непаренхіматозними клітинами, такими як КС та SEC, через цитокіни, такі як TNF- α , IL-6 та HGF.

Регенерація печінки починається в основному з активації КС і запускається такими молекулами, як ліпополісахарид, C3a, C5a і молекула міжклітинної адгезії (ICAM). Після цього КС починають продукувати та секретувати TNF- α . КС експресують рецептор TNF 1 (TNFR1) на своїй поверхні та самоактивуються аутокринним/паракринним способом. Сигнальний шлях TNF- α /TNFR1 КС головним чином опосередковується NF- κ B. Оскільки промоторна область гена IL-6 містить сайт зв'язування NF- κ B, IL-6 виробляється та секретується активованими КС.

TNF- α та IL-6, що секретуються активованими КС, беруть участь у процесі праймування на фазі ініціації, що дозволяє гепатоцитам відповідати на «сигнали проліферації» факторами росту або безпосередньо входити в мітотичну фазу. Взаємодія між гепатоцитами та КС, опосередкована TNF- α та IL-6, забезпечує процес праймування: перехід G0/G1 гепатоцитів. IL-6 безпосередньо посиляє мітотичні сигнали до гепатоцитів через сигнальний перетворювач і активатор транскрипції-3 (STAT3), який націлений на молекули цикліну D1 і p21, підкреслюючи його внесок у фазу ініціації та підтримки регенерації печінки [7].

1.2. С-реактивний білок як неспецифічний маркер запалення

С-реактивний білок (англійською - CRP) – є висококонсервативним білком плазми. Вперше його виявили Тілетт та Френсіс у 1930 році [8]. Гепатоцити у печінці виробляють С-реактивний білок за стимуляції цитокінів під час запальної відповіді. Інтерлейкін-6 (IL-6) є основним індуктором СРБ у людини [9]. Однак слід зауважити, що інші цитокіни, такі як фактор некрозу пухлини- α (TNF) та Інтерлейкін-1 (IL-1), також можуть сприяти індукції С-реактивного білка. Інтерферони (наприклад, інтерферон-альфа-IFN) пригнічують виробництво С-реактивного білку, яке спричинене IL-6 [10]. Цей білок є частиною сімейства білків пентраксину і складається з пентамерної структури підодиниць, які розташовані циклічним чином з ідентичними нековалентними зв'язками.

Молекулярна маса С-реактивного білка становить близько 120 кД [11]. У кожній підодиниці структури є місце зв'язування, залежне від кальцію. Період напіввиведення СРБ становить приблизно 19 годин, при цьому рівень СРБ зростає від 10 до 12 годин. Це призводить до невизначеності під час початкової діагностики запалення [12]. У дорослих, які, здавалося б, мають хороше здоров'я, зазвичай значення СРБ менше 10 мг/л [13]. Концентрація СРБ під час запалення швидко зростає і сягає 350-400 мг/л [14].

СРБ використовується як важливий біомаркер для багатьох бактеріальних захворювань, як у випадку апендициту, є показником післяопераційних ускладнень. Підвищення рівня СРБ також сприяє виявленню гострого апендициту [15], холециститу [16], панкреатиту [17], запальних захворювань органів малого тазу [18], пневмонії [19], менінгіту [20], інфекції сечовивідних шляхів [21], серцево-судинні захворювань [22] та педіатричні інфекції [23].

Концентрація СРБ вимірюється в міліграмах на літр (мг/л). Якщо рівень С-реактивного білка менше 10 мг/л, це вважається нормальним. Якщо він дорівнює або перевищує 10 мг/л, людина вважається в групі підвищеного ризику.

Клінічний діапазон СРБ для різних випадків визначається як $< 0,3$ мг/л (норма); від 0,3 до 1,0 мг/л (вважається нормальним, це може бути наслідком деяких станів, таких як стрес, вірус, застуда або діабет); від 1,0 до 10,0 мг/л (помірне підвищення); $> 10,0$ мг/л (високий ризик). Рівень СРБ змінюється при різних захворюваннях, таких як венозний тромбоз ($\sim 247,9$ мг/мл), кишкова непрохідність (від 100,6 до 218,0 мг/мл), ішемія шлунково-кишкового тракту ($\sim 123,0$ мг/мл), ішемічна хвороба кінцівок ($\sim 118,0$ мг/мл), рабдоміоліз ($\sim 183,0$ мг/мл), гематома ($\sim 136,0$ мг/мл), ревматологічний ($\sim 361,0$ мг/мл), солідна пухлина ($\sim 325,0$ мг/мл), перикардит (114-277,0 мг/мл), запалення кишечника ($\sim 203,2$ мг/мл), гематологічна злоякісність ($\sim 321,0$ мг/мл), реакція на ліки ($\sim 321,0$ мг/мл), загострення хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ) ($\sim 312,9$ мг/мл) [24].

С-реактивний білок можна виявити в різних рідинах організму, таких як кров, плевральна рідина, слина та піт. Було показано, що піт містить найнижчу концентрацію СРБ, і останнім часом його використовують для тестування завдяки додатковим перевагам, таким як його неінвазивність, безболісність, відсутність стресу та простий етап збору зразків [25].

Наявність аутоантитіл, що зв'язуються з реактантом гострої фази СРБ, було виявлено у пацієнта, який страждає на системний червоний вовчак, запальне захворювання, яке виникає, коли імунна система несе відповідальність за атаку на власні тканини. Дослідження описує, що анти-СРБ регулюється мономерним С-реактивним білком. Встановлена регуляція пентраксинів з ІФН типу I при аутоімунітеті. Рівень СРБ знижується в присутності IFN- α під час вірусних інфекцій [26].

С-реактивний білок частіш за все виявляється при застосуванні імуноферментного аналізу (ELISA). Він є золотим стандартом, доступним для виявлення СРБ. Його описують як імунологічний аналіз для визначення концентрації антигенів, глікопротеїнів, антитіл і білків. ІФА допомагає в різних діагнозах, включаючи рівень цитокінів, інфекції та вагітності. Зазвичай для проведення аналізу ELISA використовується 96 лунок, і в одному

експерименті одночасно вимірюють кілька зразків. Спеціально розроблені пластини, які називаються абсорбуючими пластинами, використовуються для того, щоб антиген і антитіла легко прикріплюються до поверхні. Специфічний антиген або антитіло підтверджується набором ELISA, і існують різні антигени, для яких доступні відповідні набори ELISA. Пара з двох антитіл використовується в сендвіч-ІФА для процесу виявлення. Перший крок включає покриття пластини ELISA антитілом для захоплення з наступним промиванням, щоб позбутися незв'язаних реагентів. Цільовий антиген використовується в поєднанні з цим антитілом захоплення. Справжній зразок додається на наступному етапі. Будь-який антиген, якщо він присутній у справжньому зразку буде зв'язуватися з покриттям захоплення антитіл на планшеті. Додавання детектуючих антитіл відбувається на третій фазі. За допомогою ферменту та лужної фосфатази або пероксидази хрому ці антитіла маркуються (HRP). Це відбувається, коли виявлення антитіл зв'язується з цільовим аналітом. Аналіз ELISA базується на принципі хромогенної реакції, коли субстрат перетворюється на забарвлений продукт, а потім вимірюється планшет-рідером [28].

1.3. Прокальцитонін як маркер запалення і сепсису

Прокальцитонін (PCT) є пептидом-попередником гормону кальцитоніну (СТ), і вперше згадується в медичній літературі в 1975 [28], а потім знову в 1981 [29]. Після цього в тканині медулярної карциноми щитовидної залози були виявлені численні гетерогенні форми. PCT є 116-амінокислотним попередником гормону СТ з молекулярною масою 13 кДа, і кодується геном кальцитоніну-I (CALC-I) на хромосомі 11, який продукує СТ і додаткові вільні пептиди після кількох посттрансляційних модифікацій [30]. Таким чином, лише дуже низькі рівні PCT присутні в крові здорових людей з нормальною функцією щитовидної залози. Сироватка здорових людей містить інтактний PCT (ProCT), СТ, анамінокінцеву послідовність 57 амінокислот (NProCT), карбоксикінцевий пептид з 21 амінокислоти (CCP-I або катакалцин) і CCP-I,

приєднаний до СТ (СТ: ССР-I) [31]. Хоча РСТ є прогормоном для СТ, біологічна активність істотно відрізняється. Він не регулює сироватковий кальцій, як КТ.

Вважається, що прокальцитонін в основному виробляється в печінці макрофагами (клітинами Купфера) або нейроендокринними клітинами [32].

У разі системної бактеріальної інфекції РСТ стає корисним біомаркером для ідентифікації дітей із сепсисом і титрування тривалості антибіотикотерапії [33-34]. Наприклад, нейроендокринні клітини легень, лейкоцити і клітини печінки сприяють підвищеному виділенню РСТ. Хоча точні механізми залишаються неясними, цитокінові стимули, такі як інтерлейкін 2 і фактор некрозу пухлини альфа, вважають, що відіграють важливу роль у опосередкуванні збільшення РСТ [35]. Крім того, було показано, що клінічні стани із системним запаленням можуть також підвищують РСТ, що робить його менш досконалим як біомаркер для бактеріальних інфекцій [36].

Підвищення рівня прокальцитоніну виявлено також при органоспецифічних захворюваннях, особливо печінки. У пацієнтів із гострим гепатитом РСТ значно вищий за наявності гострої печінкової недостатності [37]. У цих пацієнтів рівень РСТ не залежить від наявності чи відсутності основної бактеріальної інфекції [38]. Mallet, et al. показали, що у пацієнтів з інтоксикацією парацетамолом (PCM) рівень РСТ не може розрізнити пацієнтів з інфекцією та без неї, тоді як його дискримінаційна здатність зберігається у пацієнтів з ALF без інтоксикації PCM [39]. Пацієнти з раком легенів мали вищі рівні РСТ, коли були метастази в печінці.

При гепатокарциномі рівень РСТ корелює з розміром пухлини та виживаністю [40]. Після часткової резекції печінки РСТ підвищується після реперфузії та вважається наслідком тканинної гіпоксії та постішемичного запалення [41]. Також відомо, що після трансплантації, пацієнти можуть мати помітно підвищений РСТ, що в цьому випадку є показником не інфекції, а показником поганого результату [42].

В ідеалі ультрачутливий PCT-аналіз повинен надійно вимірювати циркулюючі концентрації цієї молекули у всіх здорових людей. Нижня межа виявлення 0,3–0,5 нг/мл, але зазвичай, він має рівень у плазмі менше 0,1 нг/мл (у здорових людей) [43]. Нормальні рівні PCT у сироватці крові людини були виміряні на рівні 0,033 (SE 0,003) нг/мл [44], тоді як при сепсисі рівні PCT можуть підвищуватися до 1100 000 разів вище базових рівнів [45]. PCT стабільний при 4 °C протягом 96 год [46]. Його надійність і чутливість дозволяють дуже рано виявляти невеликі підвищення, які виникають при бактеріальній інфекції.

PCT був названий «гормокіном», оскільки це прогормон, який секретується в сироватку, швидше за все, нейроендокринними клітинами в легенях або кишечнику як частина системної запальної відповіді [47]. Дослідження показали, що PCT повсюдно експресується в паренхіматозних клітинах, у яких PCT визначався шляхом вимірювання CALCI всього тіла, і тому їх можна розглядати як «ендокринну залозу». Під час стану інфекції, особливо під час системних інфекцій, таких як сепсис, експресія гена CALC-I регулюється вгору, і PCT конститутивно вивільняється майже з усіх тканин і типів клітин в організмі [48].

Є три причини експресії PCT [49]:

- PCT виявляється різними методами вимірювання та чутливістю аналізу (експресія мРНК CALC-I та рівень PCT);
- Зразки були отримані в різних точках часу та станціях захворювання;
- Зразок РНК екстрагували з тканин, а не з клітин.

При бактеріальних інфекціях рівень PCT у сироватці крові починає підвищуватися через 4 години після початку системної інфекції та досягає піку через 6 годин, зберігаючи плато через 8 та 24 години. PCT має період напіввиведення приблизно 24 години. PCT також може бути підвищеним при нирковій недостатності за відсутності інфекції [50]. Важливо, що рівень PCT у відповідь на сепсис не зазнає суттєвого впливу застосування стероїдів. Водночас слід обережно розглядати рівні PCT у пацієнтів із певними

супутніми захворюваннями, такими як порушення функції нирок та імунної системи. Насправді для пацієнтів з нирковою дисфункцією було запропоновано вищий поріг 2,57 нг/мл [51].

Біологічна роль РСТ залишається невідомою. Тому не дивно, що протягом останніх двох десятиліть існував значний інтерес, дебати та, іноді, суперечки щодо використання РСТ як біомаркера [52].

Окрім маркера запалення, РСТ може мати й інші застосування. Більша індукція мРНК РСТ і вивільнення пептидів РСТ з паренхіматозних клітин порівняно з циркулюючими клітинами вказує на тканинний, а не на лейкоцитний захисний механізм господаря. Дослідження показує, що протизапальні агенти можуть модулювати рівень РСТ, припускаючи, що це потенційний токсичний медіатор запалення [53]. Пептид, пов'язаний з геном кальцитоніну (CGRP), і попередники кальцитоніну можуть функціонувати як фактори, що пригнічують поширення запалення.

Спостереження китайських дослідників показують, що підвищені рівні РСТ у пацієнтів, які перебувають у стані інтоксикації ацетамінофеном, можуть бути пов'язані з ураженням інших органів, на які впливають цитокінові стимули від стерильного запалення в результаті пошкодження печінки, а не секреції РСТ, спричиненої безпосередньо пошкодженням клітин печінки [54].

Останні дослідження довели, що прокальцитонін можна використовувати і як ранній діагностичний сигнал для післяопераційних результатів. Рівень прокальцитоніну в сироватці крові варто використовувати для прогнозування печінкової недостатності після гепатектомії. Встановлений взаємозв'язок між післяопераційним РСТ і короткостроковим прогнозом у пацієнтів після гепатектомії. Було доведено, що підвищений рівень прокальцитоніну у пацієнтів після гепатектомії пов'язаний із вищою частотою печінкової недостатності, нижчою 30-денною виживаністю та поганими короткостроковими післяопераційними результатами [55].

1.4. Прокальцитонін і С-реактивний білок

Останні дослідження порівнювали діагностичну та прогностичну корисність РСТ із С-реактивним білком. РСТ є більш чутливим і специфічним, ніж СРБ для діагностики або прогнозу сепсису [56]. Дослідження, проведене в центрах первинної медичної допомоги в 12 європейських країнах, передбачило пневмонію у пацієнтів, які звертаються до первинної медичної допомоги з гострим кашлем, найкраще у пацієнтів з легкими або тяжкими клінічними проявами. Додавання концентрації СРБ при оптимальній межі [30 мг/л] покращило діагностичну інформацію, але вимірювання концентрації РСТ не дало клінічно значущої інформації для цієї групи [57]. Рандомізоване дослідження для визначення антибіотикотерапії при сепсисі за допомогою РСТ проти СРБ показало, що СРБ був таким же корисним, як і РСТ, у зниженні використання антибіотиків переважно медичною популяцією пацієнтів із сепсисом, не завдаючи видимої шкоди [58], але СРБ може бути більш цінним маркером у пацієнтів із гострими загостреннями ХОЗЛ [59]. Комбінація СРБ і РСТ є надійними діагностичними біомаркерами при інфекції та сепсисі [60]. Ідеального маркера не існує. Комбінація РСТ і СРП є недостатнім методом виявлення бактеріальних інфекцій і не може замінити правильну клінічну та мікробіологічну діагностику. Сепсис є патофізіологічним процесом, а не специфічним синдромом, і є надто складним, щоб описати його одним маркером [61].

1.5. Прокальцитонін та інтерлейкіни

Загальновідомо, що прокальцитонін (РСТ) та інтерлейкін-6 (IL-6) стали біомаркерами для різних запальних станів. Нові дослідження групи американських дослідників [62], яка визначала рівні РСТ та IL-6 біоаналізатором Kryptor у групі пацієнтів хворих на рак з лихоманкою (575 пацієнтів) та у хворих на рак без лихоманки (410 пацієнтів) з контрольною групою у 79 неракові осіб, показали можливість використання цієї пари у якості біомаркерів онкологічних та деяких інших захворювань. За даними їх

досліджень, середній рівень РСТ був нижчим у контрольних суб'єктів (0,029 нг/мл) порівняно з онкологічними пацієнтами зі стадією захворювання I-III (0,127 нг/мл) ($p < 0,0001$) і стадією IV (0,190 нг/мл) ($p < 0,0001$). Він також був вищим у хворих на рак з лихоманкою (0,310 нг/мл) порівняно з хворими на рак без лихоманки (0,1 нг/мл) ($p < 0,0001$). Середній рівень IL-6 був достовірно нижчим у контрольній групі (0 пг/мл), ніж у хворих на рак без лихоманки зі стадією I-III (7,376 пг/мл) або стадією IV (9,635 пг/мл) ($p < 0,0001$). Отримані результати свідчать про потенційну роль РСТ та IL-6 у прогнозуванні раку у пацієнтів без лихоманки. Крім того, на думку авторів РСТ корисний для виявлення прогресування раку та прогнозування бактеріємії або сепсису у пацієнтів з лихоманкою.

Едуардо Азнар-Оровал із співавторами [63] вивчав діагностичне значення прокальцитоніну, інтерлейкіну 8, інтерлейкіну 6 і С-реактивного білка для виявлення бактеріємії та фунгемії у хворих на рак. Авторами було проаналізовано 79 епізодів лихоманки у 79 пацієнтів, 43 чоловіків і 36 жінок. Сорок чотири пацієнти були в групі справжньої бактеріємії. Значні відмінності в значеннях РСТ ($P < 0,001$), IL-8 ($P < 0,001$) та IL-6 ($P = 0,002$) були виявлені між пацієнтами зі справжньою бактеріємією та без неї. Порогова точка для РСТ становила 0,5 нг/мл, і цей параметр дав найкращу специфічність у 91,4 % із чутливістю 59,1 %. Це дало змогу авторам зробити висновок, що серед досліджених маркерів інфекції РСТ надав найбільше інформації для діагностики бактеріємії у хворих на рак.

1.6. Цитокіни як маркери запалення

1.6. 1. Інтерлейкін-6

Інтерлейкін-6 вважається прозапальним цитокіном через його підвищення при численних злоякісних і запальних захворюваннях [64]. Хронічна продукція IL-6 причетна до прогресування захворювання та пошкодження тканин [65], а його підвищений рівень у сироватці крові пацієнтів може корелювати з меншою тривалістю життя та гіршим прогнозом

[66]. Інші дослідження показали, що ІЛ-6 бере участь у пухлиногенезі, пов'язаному із запаленням, і в регуляції вродженого та/або адаптивного імунітету [67]. Окрім його згубної ролі при запаленні та раку, були дослідження, які демонструють, що ІЛ-6 також має регенеративний і протизапальний потенціал [68]. Крім того, ІЛ-6 регулює продукцію білка гострої фази у печінки і може регулювати виживання та активацію лімфоцитів [69].

Рівень інтерлейкіну-6 у сироватці крові часто підвищуються під час запальних захворювань печінки та пов'язаних з ними вірусних інфекцій. Високі сироваткові та внутрішньопечінкові рівні ІЛ-6 спостерігалися при різних типах гепатиту [70], HCV-асоційованому цирозі печінки та ГЦК (гепатоцелюлярна карциному) [71].

Пацієнти, які страждають на ГЦК, мають підвищені рівні ІЛ-6 у сироватці крові, що свідчить про те, що підвищена передача сигналів ІЛ-6 є ознакою раку печінки [72]. ІЛ-6 навіть розглядався як маркер ГЦК, оскільки він міг ідентифікувати злоякісні новоутворення у пацієнтів з цирозом печінки зі специфічністю 93% і чутливістю 77% [73], у порівнянні з 41-65% чутливістю у пацієнтів з цирозом печінки. альфа-фетальний білок, поширений маркер, який зараз використовується [74]. ІЛ-6 також вважається важливим фактором ризику ожиріння, де запалення печінки та пухлиногенез сприяють активації ІЛ-6-опосередкованої передачі сигналу STAT3. Крім того, враховуючи, що ІЛ-6 тісно пов'язаний з ожирінням і резистентністю до інсуліну, вважається, що сигналізація ІЛ-6 може сприяти розвитку неалкогольної жирової хвороби печінки та неалкогольного стеатогепатиту [75]. Підвищені рівні ІЛ-6 у сироватці крові були виявлені як при алкогольній, так і при неалкогольній жировій хворобі печінки [76].

Сироватковий інтерлейкін-6 може сприяти онкогенній трансформації гепатоцитів шляхом фосфорилування та активації STAT3, щоб порушити функцію печінки та обмежити виживання пацієнтів з ГЦК. Дійсно, STAT3 може діяти як онкоген, захищаючи ракові клітини від апоптозу.

Загалом очевидно, що ІЛ-6 відіграє багатогранну роль у патологіях печінки; з одного боку, це може сприяти регенерації печінки, а з іншого – індукує резистентність до інсуліну, порушує метаболізм ліпідів у печінці та зменшує апоптоз гепатоцитів, що загострює прогресування захворювання до ГЦК [77].

Печінка має чудову здатність до регенерації після травми або навіть часткової гепатектомії [78], і, хоча інтерлейкін-6 пов'язаний з багатьма патологіями печінки та раком, ІЛ-6 також є критичним для цієї регенеративної здатності.

Інтерлейкін-6 регулює печінкові овальні клітини, які є дорослими стовбуровими клітинами печінки, отриманими з печінкових клітин-попередників і які знаходяться в малих кінцевих жовчних протоках. Ці клітини залишаються недиференційованими в ніші стовбурових клітин у протоках, але мають здатність диференціюватися в гепатоцити та епітеліальні клітини жовчних шляхів.

ІЛ-6 регулює метаболізм глікогену та ліпідів. Сприятливий ефект ІЛ-6 у печінці пояснюється його здатністю збільшувати печінковий експорт тригліцеридів і холестерину, а також його антиапоптозною та антиоксидантною дією на гепатоцити. Трансигналізація ІЛ-6 викликає сприятливий ефект, регулюючи метаболізм глікогену при ураженні печінки, спричиненого ацетамінофеном [79].

ІЛ-6 може розширювати клітини-попередники печінки (LPC) *in vivo* та *in vitro*, і після трансплантації ці клітини забезпечують захист від порушення функції печінки [80]. Враховуючи ці захисні ефекти, інфузія гіпер ІЛ-6 буде корисною для пацієнтів, яким проводять часткову резекцію печінки.

Стан печінки, що містить (метастатичні) пухлини, може відрізнитись від нормальної печінки у фізіологічному стані, оскільки вона не продукує інтерлейкін-6. Вихідні зразки ІЛ-6 у метастатичному варіанті не перевищували порогового значення ELISA (16 нг/л) [81].

Ендогенна фосфатидна кислота сприяє регенерації печінки після гепатотоксичності ацетамінофену. Таку думку виказують в своїй роботі, Клеменс із співавторами (2021), які обробляли мишей токсичною дозою ацетамінофену, після чого проводили обробку кислотою через 0, 6, 24 і 52 години. Постлікування кислотою через 2 години після ураження захищало від пошкодження печінки вже на 6 годину. Транскриптоміка показала, що кислота активує передачу сигналів інтерлейкіну-6 у печінці. Експресія ІЛ-6 зросла у 18 разів у жировій тканині, що вказує на те, що жир є джерелом циркулюючого ІЛ-6, індукованого кислотою [82].

Дослідження Занта зі співавторами показали взаємозв'язок ІЛ-6 з прокальцитоніном та з С-реактивним білком. За відсутності інфекції, їх рівні підвищуються після трансплантації печінки. У той час як ІЛ-6 і СРБ були значно збільшені при сепсисі, а прокальцитонін був його показником сепсису [83].

1.6.2. Інтерлейкін-8

Інтерлейкін-8 (ІЛ-8 або хемокін) – це хемокін, що виробляється макрофагами та іншими типами клітин, такими як епітеліальні клітини, гладком'язові клітини дихальних шляхів і ендотеліальні клітини. Ендотеліальні клітини зберігають ІЛ-8 у своїх накопичувальних везикулах-тільцях Вейбеля-Паладе. У людини білок інтерлейкін-8 кодується геном CXCL8. ІЛ-8 спочатку виробляється як пептид-посередник з 99 амінокислот, який потім піддається розщепленню для створення кількох активних ізоформ ІЛ-8. У культурі пептид із 72 амінокислот є основною формою, що секретується макрофагами [84].

ІЛ-8 є важливим посередником імунної реакції у відповіді вродженої імунної системи, а також він відомий як хемотаксичний фактор нейтрофілів, що виконує дві основні функції:

- індикація хемотаксису у клітинах-мішенях, насамперед нейтрофілах, а також інших гранулоцитах, змушуючи їх мігрувати до місця інфекції. IL-8 також стимулює фагоцитоз після їх надходження.
- стимулятор ангіогенезу. У клітинах-мішенях IL-8 індукує низку фізіологічних реакцій, необхідних для міграції та фагоцитозу, таких як збільшення внутрішньоклітинного Ca^{2+} , екзоцитоз (наприклад, вивільнення гістаміну) та респіраторний вибух.

Інтерлейкін-8 є ключовим медіатором, пов'язаним із запаленням, де він відіграє ключову роль у рекрутуванні й дегрануляції нейтрофілів, виступає прозапальним медіатором при гінгівіті та псоріазі [85].

Секреція інтерлейкіну-8 посилюється оксидантним стресом, який, таким чином, викликає залучення запальних клітин й індукує подальше збільшення медіаторів оксидантного стресу, що робить його ключовим параметром при локалізованому запаленні [86].

IL-8 пов'язаний з ожирінням. Доведена його роль у колоректальному раку, діючи як аутокринний фактор росту клітинних ліній карциноми товстої кишки [87] або сприяючи поділу та можливій міграції шляхом розщеплення молекул металопротеїнази. Відіграє важливу роль у хіміорезистентності злоякісної мезотеліоми плеври шляхом індукції експресії трансмембранних транспортерів [88].

Якщо у вагітної матері високий рівень інтерлейкіну-8, існує підвищений ризик розвитку шизофренії у її нащадків. Показано, що високий рівень інтерлейкіну-8 знижує ймовірність позитивної відповіді на антипсихотичні препарати при шизофренії [89].

IL-8 причетний до патології муковісцидозу. Завдяки своїй дії як сигнальної молекули він здатний рекрутувати та направляти нейтрофіли до епітелію легень. Надмірна стимуляція та дисфункція цих рекрутованих нейтрофілів у дихальних шляхах призводить до вивільнення ряду прозапальних молекул і протеаз, що призводить до подальшого пошкодження легеневої тканини.

Підвищений рівень ІЛ-8 у сироватці крові у пацієнтів з гепатоцелюлярною карциномою можна використовувати як біомаркер, що замінює альфа-фетопротейн або як клінічний аналіз для оцінки патогенезу та, ймовірно, прогресування або розвитку відповідного захворювання [90].

Дослідження китайських біохіміків показало, що ІЛ-8 посилює індукований фіброз печінки, і може забезпечити потенційні терапевтичні мішені для клінічного лікування цього захворювання.

Вербаргом з колегами (2017) було продемонстровано комплексні можливості ELISA та платформи біодатчиків магнітної модуляції при виявленні та кількісному визначенні інтерлейкіну-8 людини. Автори вказують, що таке поєднання здатне виявляти 0,08 нг/л ІЛ-8 у плазмі крові, що є значно чутливішим, порівнянню з найсучаснішими лабораторними аналізами [91].

Азоузі із співаторами (2022) розробили дві різні просторово-ієрархічні наноархітектури для виявлення в реальному часі біомаркера раку інтерлейкіну-8. Двовимірну платформу було створено шляхом іммобілізації активованого анти-ІЛ-8 на модифікованому амінітіолом робочому золотому електроді. А інтеграція багатошарових вуглецевих нанотрубок у процес функціональності дозволила створити авторам і тривимірну наноархітектуру [92].

Підсумовуючи, варто відмітити значні можливості інтерлекінів (особливо ІЛ-6, ІЛ-8), як біомаркерів [93].

1.6.3. Інтерлейкін 10

Інтерлейкін 10 (ІЛ-10), також відомий як інгібуючий фактор синтезу цитокінів людини, є протизапальним цитокіном. Він знижує експресію цитокінів Т-хелперів (Th1), антигенів II класу головного комплексу гістосумісності та костимулюючих молекул на макрофагах. Він також покращує виживання В-клітин, проліферацію та вироблення антитіл. ІЛ-10 може блокувати активність ядерного фактору каппа-легкого ланцюга-

підсилювача, активованих В-клітині, а також бере участь у регуляції сигнального шляху ланцюга взаємодій між білками, які беруть участь у таких процесах, як імунітет, поділ клітин, смерть клітин і утворення пухлин.

Інтерлейкін-10 відкритий у 1991 році [94], спочатку повідомлялося, що ІЛ-10 пригнічує секрецію цитокінів, презентацію антигену та активацію CD4⁺ Т-клітин [95]. Подальші дослідження показали, що ІЛ-10 переважно пригнічує опосередковану ліпополісахаридом і бактеріальним продуктом індукцію прозапальних цитокінів [96].

Згодом з'явилася більш детальна картина імуностимулюючої функції інтерлейкіну-10. Експресія ІЛ-10 з трансфікованих ліній пухлинних клітин [97] у трансгенних мишей ІЛ-10 або дозування ІЛ-10 призводить до контролю над ростом первинної пухлини та зменшення метастатичного тягаря [98]. Нещодавно було показано, що пегільований рекомбінантний мишачий ІЛ-10 індукуює залежний протипухлинний імунітет [99].

Дослідження на мишах показало, що ІЛ-10 також виробляється тучними клітинами, протидіючи запальному ефекту, який ці клітини мають у місці алергічної реакції [100].

Інтерлейкін-10 здатний пригнічувати синтез прозапальних цитокінів, а також стимулює дозрівання В-клітин і вироблення антитіл. Брак ІЛ-10 викликає активацію циклооксигенази і, як наслідок, активацію рецептора тромбоксану, що викликає дисфункції ендотелію судин і серця у мишей. [101].

ІЛ-10 пов'язаний з міокінами, оскільки фізичні вправи провокують підвищення циркулюючих рівнів, що свідчить про сприяння фізичних вправ створенню середовища протизапальних цитокінів [102].

У клітинних лініях меланоми ІЛ-10 модулює поверхневу експресію лігандів трансмембранного білку з сімейства лектиноподібних рецепторів С-типу [103].

Недавнє дослідження на мишах показало, що ІЛ-10 регулює ключовий ефектор фагоцитозу, сприяючи очищенню гематоми після

внутрішньомозкового крововиливу. Дефіцит IL-10 посилює черепно-мозкову травму у мишей-самців, але не самок [104].

Дослідження Хіміона та Бойка (2019) показали, що у хворих на псоріатичний артрит в сироватці крові підвищується вміст IL-10, що є свідченням збільшення синтезу цього протизапального цитокіну у відповідь на хронічний імунзапальний процес [105].

В останній час, в наукових джерелах активно обговорюється взаємозв'язок різноманітних біомаркерів. Дослідженнями Захеді із співавторами (2023) показано, що метаболічний синдром супроводжується хронічним запаленням низького ступеня, а маркери запалення, такі як високочутливий С-реактивний білок чи інтерлейкін-6 (IL-6), сприяють запаленню, ожирінню та резистентності до інсуліну. Натомість, адипонектин та інтерлейкін-10 є протизапальними маркерами, які відіграють захисну роль у метаболічному синдромі [106].

С-реактивний білок, IL-6 та IL-10 є чутливими біомаркерами лихоманки, тоді як прокальцитонін підвищений переважно у пацієнтів із тяжкими захворюваннями. IL-6 та IL-10 на початку лихоманки демонструють кращу ефективність, ніж С-реактивний білок та прокальцитонін, у виявленні пацієнтів з грамнегативною бактеремією та септичним шоком [107].

Відкладення фібрину є невід'ємною ознакою запальної відповіді. У відповідь на С-реактивний білок, реагент гострої фази, моноцити крові синтезують і експресують тканинний фактор – головний ініціатор згортання крові. Встановлена інгібуюча дія інтерлейкіну-10 на експресію моноцитами активності тканинного фактора, відповідного білка і мРНК у відповідь на С-реактивний білок [108].

1.6.4. Фактор некрозу пухлини

Фактор некрозу пухлини (кахексин або кахектин;) раніше відомий як фактор некрозу пухлини альфа або TNF- α [109] – це адипокін і цитокін, який

є членом надродини TNF, яка складається з різних трансмембранних білків із гомологічним доменом.

Фактор некрозу пухлини альфа (TNF- α), також відомий як член надродини TNF 2 (TNFSF2) або просто TNF, є багатофункціональним цитокіном, який має добре встановлену імунологічну роль у вродженому та адаптивному імунітеті та в нормальних фізіологічних функціях імунних клітин, де його виробництво та дії, як правило, обмежені як у часі, так і в просторі. Навпаки, аномально підвищена і стійка продукція TNF пов'язана з патогенними запальними хворобами, включаючи пов'язаний з інфекцією сепсис і хронічні аутоімунні захворювання. В останні десятиліття TNF також став відомий як адипокін, після випадкового спостереження його підвищеного виробництва в жировій тканині при ожирінні, що призвело до оцінки запальної природи ожиріння та пов'язаних з ним метаболічних патологій. Як цитокін, TNF використовується імунною системою для сигналізації клітин. Якщо макрофаги (певні лейкоцити) виявляють інфекцію, вони вивільняють TNF, щоб попередити інші клітини імунної системи в рамках запальної відповіді [110].

Передача сигналу TNF відбувається через два рецептори: TNFR1 і TNFR2. TNFR1 конститутивно експресується на більшості типів клітин, тоді як TNFR2 обмежений переважно ендотеліальними, епітеліальними та підгрупами імунних клітин. Передача сигналів TNFR1, як правило, є прозапальною та апоптотичною тоді як передача сигналів TNFR2 є протизапальною та сприяє проліферації клітин [111]. Пригнічення передачі сигналів TNFR1 було важливим для лікування аутоімунних захворювань, тоді як передача сигналів TNFR2 сприяє загоєнню ран [112].

TNF- α існує як трансмембранна форма (mTNF- α) і як розчинна форма (sTNF- α). sTNF- α є результатом ферментативного розщеплення mTNF- α за допомогою процесу, який називається представленням субстрату. mTNF- α в основному знаходиться на моноцитах/макрофагах, де він взаємодіє з рецепторами тканин шляхом міжклітинного контакту [113]. sTNF- α вибірково

зв'язується з TNFR1, тоді як mTNF- α зв'язується як з TNFR1, так і з TNFR2. Зв'язування TNF- α з TNFR1 є необоротним, тоді як зв'язування з TNFR2 є оборотним.

Основна роль TNF полягає в регуляції імунних клітин. TNF, як ендогенний піроген, здатний індукувати лихоманку, апоптозну загибель клітин, кахексію та запалення, пригнічувати пухлиногенез і реплікацію вірусу та реагувати на сепсис через клітини, що продукують IL-1 та IL-6. Порушення регуляції виробництва TNF пов'язане з різними захворюваннями людини, включаючи хворобу Альцгеймера, рак, велику депресію, псоріаз, і запальні захворювання кишечника. Незважаючи на суперечливість, деякі дослідження пов'язують депресію та запальні захворювання кишечника із підвищенням рівня TNF.

Під назвою тазонермін TNF використовується як імуностимулюючий препарат при лікуванні деяких видів раку. Препарати, що протидіють дії TNF, використовуються при лікуванні різних запальних захворювань, наприклад, ревматоїдного артрити.

Деякі види раку можуть спричинити надмірне вироблення TNF. TNF аналогічний паратиреоїдному гормону як у спричиненні вторинної гіперкальціємії, так і в ракових захворюваннях, з якими пов'язане надмірне виробництво.

Цей білок може використовувати морфеїнову модель алостеричної регуляції [114].

TNF виробляється різними типами клітин, включаючи лімфоїдні клітини, тучні клітини, ендотеліальні клітини, серцеві міоцити, жирову тканину, фібробласти та нейрони. Велика кількість TNF вивільняється у відповідь на ліпополісахарид, інші бактеріальні продукти та інтерлейкін-1 (IL-1). У шкірі огрядні клітини є переважним джерелом попередньо сформованого TNF, який може вивільнятися під час запального стимулу [115].

Він має ряд дій на різні системи органів, як правило, разом з інтерлейкіном-6. На гіпоталамус: стимуляція гіпоталамо-гіпофізарно-

надниркової осі шляхом стимуляції вивільнення кортикотропін-рилізінг-гормону (CRH); придушення апетиту; лихоманка. На печінку: стимуляція реакції гострої фази, що призводить до збільшення С-реактивного білка та ряду інших медіаторів. Він також індукує резистентність до інсуліну, сприяючи фосфорилюванню серину субстрату рецептора інсуліну-1, що погіршує сигналізацію інсуліну

Це потужний хемоаттрактант для нейтрофілів і сприяє експресії молекул адгезії на ендотеліальних клітинах, допомагаючи нейтрофілам мігрувати.

На макрофагах: стимулює фагоцитоз і вироблення оксидантів IL-1 і запального ліпиду простагландину E2 (PGE 2).

З боку інших тканин: стимулює підвищення інсулінорезистентності. TNF фосфорилює залишки серину інсулінового рецептора, блокуючи передачу сигналу. На обмін речовин і споживання їжі: регулює сприйняття гіркого смаку [116]. Місцеве підвищення концентрації TNF спричинить появу основних ознак запалення: жар, набряк, почервоніння, біль і втрату функції.

Сеїд та ін. показали, що TNF спричиняє IL-10-залежне інгібування експансії та функції CD4 Т-клітин шляхом підвищення рівня PD-1 на моноцитах, що призводить до продукції IL-10 моноцитами після зв'язування PD-1 PD-L [117].

Концентрації TNF- α та IL-6 підвищені при ожирінні [118]. Використання моноклональних антитіл проти TNF- α пов'язане зі збільшенням, а не зменшенням ожиріння, що вказує на те, що запалення є результатом, а не причиною ожиріння.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Об'єкти та модель дослідження

Для дослідження маркерів запалення організму тварин використовувались білі безпородні щури масою 140-180 г, репродуктивного віку (140-150 днів).

З експериментальними тваринами працювали відповідно з дотриманням усіх вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Шостим національним конгресом з біоетики (Київ, 2016).

Для створення умов гострого токсичного ураження печінки використовували ацетамінофен (парацетамол). Введення ацетамінофену дослідним тваринам здійснювали перорально за допомогою спеціального зонда в дозі 1250 мг/кг маси тіла тварини одну дозу в день протягом двох діб. Парацетамол готувався у вигляді суспензії в 1 % розчині крохмального гелю.

Дослідні щури піддавались частковій гепатектомії (ЧГЕ), суть полягала у резекції (видаленні) 2/3 тканини печінки, що в подальшому призводить до прогресування клітинного циклу гепатоцитів. Дані маніпуляції проводили близько 7:30-8:00 годин ранку, в умовах анестезії за методом Mitchell & Willenbring. Суть методу полягає у почерговому перев'язуванні та резекції лівої латеральної та медіальної часток печінки, як показано на рис. 2.1.

Модель дослідження передбачала розподіл тварин на групи:

- інтактні щури, які підлягали частковій резекції тканини печінки (К/ЧГЕ);
- щури з токсичним ураженням ацетамінофеном, які піддавались частковій гепатектомії (ТУ/ЧГЕ);

Умертвіння щурів виконували шляхом цервікальної дислокації під дією легкого ефірного наркозу на 48 (період активної проліферації клітин), 72 години та 7-му добу (168 годин) після проведення ЧГЕ.



Рис. 2.1. Схематичне зображення ділянок перев'язування часток печінки, які в подальшому піддавались резекції

2.2. Імуноферментний послідовний аналіз

Усі дослідження проводились методом імуноферментного аналізу (ІФА). Реагенти, необхідні для імуноферментного визначення, включають, в надлишку, високоафінні і специфічні антитіла (фермент-мічені і іммобілізовані) для специфічного розпізнавання різних епітопів, і природний антиген. У процесі аналізу на поверхні мікролунок відбувається іммобілізація через взаємодію х-антитіл, нанесених в лунці. При змішуванні ферментно-міченого антитіла і сироватки, що містить нативний антиген, між нативним антигеном і антитілами відбувається реакція, без конкуренції або стеричних перешкод, з утворенням сендвіч-комплексу.

Після необхідного інкубаційного періоду, пов'язана фракція антиген-антитіло відокремлюється від не пов'язаних антигенів декантацією або промиванням. Активність ферменту у фракції пов'язаних антитіл прямо пропорційна концентрації нативного антигену. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація невідомих зразків (інструкція прокальцитоніну)

2.2.1. Визначення рівня прокальцитоніну в крові методом ІФА

Потрібні реагенти заздалегідь підготували, після чого у спеціальні стрипи вносили по 50 мкл РСТ калібратора у відповідні лунки. Послупово додавали по 50 мкл ферментативного реагенту РСТ у кожен лунку, після чого перемішували вміст лунок протягом 20-30 секунд до утворення однорідності. Накрили вміст лунок з наступною 30-хвилинною інкубацією у термошафі при сталій температурі +37°C. Після періоду інкубації вміст лунок вилучали методом декантації, після чого висушили планшет на фільтрувальному папері. Додали 350 мкл промивного буфера і видалили його, повторюючи дану процедуру ще два рази. Після промивки додали по 100 мкл робочого розчину субстрату у кожен лунку, при цьому реагенти додавались в одній і тій самій послідовності і з однаковою швидкістю. Не струшуючи вміст інкубували на 15 хвилин при кімнатній температурі. Спостерігали активне утворення забарвлення, яке зупинили додаючи 50 мкл стоп-реагенту у кожен лунку і перемішуючи 15-20 секунд. Через 15 хвилин після зупинки реакції виміряли величину поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм [119].

2.2.2. Визначення рівня СРБ в крові методом ІФА

Підготовка реагентів відбувалась таким чином: зразки сироватки (плазми) крові розвели у 101 раз, використовуючи при цьому ІФА-буфер, до 5 мкл зразка додали 500 мкл ІФА-буфера.

До заздалегідь підготовлених реагентів, використовуючи одноразовий наконечник, у спеціальні стрипи вносили по 100 мкл червоного ІФА-буфера у кожен лунку. У відповідні лунки у двох повторях вносили по 25 мкл калібрувальних проб та контрольної сироватки, а у лунки, що ми попередньо підготували, внесли у двох повторях по 25 мкл розведених досліджуваних зразків сироватки крові (дані внесення проводили протягом 5 хвилин). Після внесення усіх проб перемішали вміст планшета круговими рухами, заклеїли планшет спеціально. Плівкою та інкубували дані проби при температурі +37 °C протягом 30 хвилин. Після попередньої інкубації видалили вміст лунок і

промили тричі. Далі у всі лунки внесли по 100 мкл кон'югату, знову заклеїли планшетку плівкою і інкубували на 30 хв. Після закінчення інкубації вміст промили 5 разів, та внесли у всі лунки по 100 мкл розчину субстрату тетраметилбензидину і помістили у термостат за температури +20 оС на 15 хвилин. До наявного синього забарвлення внесли по 100 мкл стоп-реагенту з подальшим утворенням яскраво-жовтого забарвлення. Даний вміст помістили в апарат для визначення величини оптичної густини при довжині хвилі 450 нм. [120].

2.2.3. Визначення рівня фактору некрозу пухлин (ФНП) в крові методом ІФА

Підготовка реагентів перед початком проведення аналізу відбувалась наступним чином: всі реагенти виводили на рівень кімнатної температури. У кожну лунку внесли по 100 мкл розчин для розведення сироватки, після чого ще додали по 100 мкл досліджуваної сироватки та калібратора. Інкубували 2 години в термошейкері при температурі +37°С і 700 об/хв. Промили лунки 5 раз по 350 мкл. У ретельно промиті лунки вносили по 100 мкл ферментативного реагенту в кожну лунку і інкубували в термошейкері протягом 1 години при температурі +37°С. Після повторної інкубації промили лунки по 350 мкл розчину 5 разів. Наступним кроком до всіх лунок додавали по 100 мкл субстратного реагенту. За допомогою термошейкера інкубували планшет при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Після повторної інкубації промили стріпи по 5 разів розчином для помивки по 350 мкл. У кожну лунку внесли по 100 мкл ТМБ розчину з подальшою інкубацією в 25 хвилин при +20°С. Появу активного забарвлення зупинили стоп-реагентом, вносячи в лунки по 100 мкл розчину. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм протягом 10 хвилин після додавання стоп-реагенту [121].

2.2.4. Визначення рівня ІЛ-6 в крові методом ІФА

У необхідну кількість лунок додавали піпеткою по 100 мкл досліджуваної сироватки, вслід додали по 100 мкл розчину для розведення сироватки. Після ретельного перемішування, ізолювали та інкубували при кімнатній температурі протягом 120 хв. Далі вміст лунок видалили методом декантацією та просушили планшет на фільтрувальному папері, надалі додаючи по 350 мкл промивного буфера, та видалили його. Кількість промивки загалом складалась з 5 циклів. Після промивки додавали по 100 мкл ферментативного реагенту в кожен стріп. Далі вміст планшету ретельно змішали та інкубували протягом 1 години при температурі +37°C. Знову вилучили вміст лунок методом декантації та просушили планшет за допомогою фільтрувального паперу. Додали промивного буферу 350 мкл та знову декантували. Промивку повторювали ще 4 цикли. У кожен лунку додавали по 100 мкл субстратного реагенту. За допомогою термошейкера інкубували планшет при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Після повторної інкубації промили стріпи по 5 разів розчином для помивки по 350 мкл. У лунки внесли по 100 мкл робочого розчину тетраметилбензидину (ТМБ), після чого на 25 хвилин інкубували. Зупиняли ферментативну реакцію та розвиток забарвлення 100 мкл стоп-реагенту, перемішуючи протягом 15-20 секунд. Через 15 хвилин після зупинки ферментативної реакції, вимірювали величину поглинання вмісту лунок при 450 нм. [122].

2.2.5. Визначення рівня ІЛ-8 в крові методом ІФА

Після підготування реагентів у стріпи вносили по 100 мкл розчину для розведення сироватки, використовуючи піпетку з новим одноразовим наконечником вносили по 100 мкл калібрувальних проб зразків,. Дані зразки інкубували на 2 години при +37 оС і 700 об/хв за допомогою термошейкера

Після інкубації проби ретельно промили 5 разів по 350 мкл розчину для промивки. У попередньо очищені лунки додавали по 100 мкл кон'югату, та протягом 10 секунд ретельно перемішували, щоб досягти повного змішання.

Кожну лунку інкубували протягом 1 години при швидкості 700 об/хв за кімнатної температури. Після інкубації вміст лунок ретельно струсили для вилучення попередніх реагентів та промили 5 разів розведеним розчином для промивання (по 350 мкл в лунку). Далі до всіх лунок додавали по 100 мкл субстратного реагенту. За допомогою термошейкера інкубували планшет при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Після повторної інкубації промили стріпи по 5 разів розчином для помивки по 350 мкл. Достовірність та чутливість результатів залежать від якості промивання. В подальшому ретельно видаляли залишки рідини, після чого внесли по 100 мкл ТМБ у кожную лунку. Знову інкубували 25 хв при температурі +20-22 оС. Внесли по 100 мкл стоп-реагенту в кожную лунку, для зупинки ферментативної реакції. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм протягом 10 хвилин [123].

2.2.6. Визначення рівня ІЛ-10 в крові методом ІФА

У підготовлені заздалегідь лунки додали по 100 мкл РРС та по 100 мкл власне сироватки та калібрувальних проб, після чого отриману суміш помістили в термошейкер на 2 години при +37 оС і 700 об/хв. Промили 5 разів вносячи по 350 мкл розчину для промивки. Наступним кроком було додавання по 100 мкл ферментативного реагенту та подальша інкубація в термошейкері за попередньо виставленими нормами на 1 годину. Розчином для промивки по 350 мкл промили кожную лунку по 5 разів. У кожную лунку додавали по 100 мкл субстратного реагенту та інкубували ще на 30 хв. Промили 5 разів по 350 мкл розчину. У кожную лунку внесли по 100 мкл розчину ТМБ і інкубували на 25 хв без попереднього змішування. Після інкубації в лунки вносили по 100 мкл стоп-реагента з подальшим вимірюванням оптичної густини при довжині хвилі в 450 нм [124].

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Останні роки характеризуються стрімким збільшенням патологій печінки, які розвиваються на тлі нутрітивного дисбалансу харчового раціону [125]. Аліментарна депривація протеїну навіть при надлишку надходження енергетичних субстратів часто призводить до функціональної недостатності органів [126], що збільшує сприйнятливість до інфекцій та/або індукує жирову інфільтрацію печінки.

У літературі [127] нераціональне харчування розглядають як фактор ризику виникнення гепатопатологій, що характеризується гіперфагічною реакцією на дефіцит протеїну та проявляється гіперсенситивністю (імунологічно індуковане запалення) на зовнішні харчові тригери незалежно від стану гомеостатичних стимулів.

Водночас досить часто перебіг аліментарно-залежних захворювань посилюється внаслідок безсистемного використання широкого спектру загальнодоступних лікарських засобів, які використовують для корекції патологічних станів. Нині найпоширенішим безрецептурним анальгетиком-антипіретиком є парацетамол (ацетамінофен, N-ацетил-р-амінофенол), який вважають безпечнішим порівняно з нестероїдними протизапальними засобами (ацетилсаліцилова кислота, ібупрофен, диклофенак тощо) [128]. Збільшення частоти застосування препарату без дотримання вимог дозування та інтервалу між його прийомами в останні роки викликало занепокоєння щодо медикаментозного ураження організму. Потенційно токсичними вважаються дози, які перевищують 150 мг/кг для дітей і більше 7-10 г – для дорослих. У США в даний час доступні два препарати рідкої консистенції парацетамолу для немовлят, що ще більше збільшує ризик неправильного дозування [129].

Фактично, ацетамінофен-індуковані ураження вийшли у лідери серед причин гострої печінкової недостатності [130].

У зв'язку з цим дисбаланс нутрієнтів у харчовому раціоні, нераціональне використання терапевтичних засобів із протизапальною, анальгетичною та

жарознижувальною дією часто супроводжуються розвитком оксидативного ушкодження клітин, що підтверджено нашими попередніми дослідженнями [131].

У літературі зазначається, що токсичне ураження печінки може бути різного ступеня – від стеатозу печінки, що переходить у стеатогепатит та навіть закінчується цирозом печінки. Проте існуючі відмінні характеристики швидкості та характеру патологічних змін досить часто не мають наукового обґрунтування, що супроводжується важкістю встановлення критеріїв лабораторної діагностики біохімічних змін, за якими можна було б контролювати прогресування захворювання [132]. Тому доцільним в даному випадку є визначення маркерів запалення, зокрема, С-реактивного білка (СРБ).

Результати проведених нами досліджень показали, що в усіх дослідних групах щурів спостерігається підвищення С-реактивного білка в сироватці крові порівняно зі значеннями контрольної групи тварин (рис. 3.1). У групі тварин, які споживали низькопротеїну дієту, даний показник вдвічі перевищує значення контрольних величин.

С-реактивний білок – індикатор гострої фази запального процесу в організмі, який найшвидше реагує на пошкодження тканин. Синтезується в печінці під впливом цитокінів, як реакція у відповідь на запальні або некротичні процеси в будь-якому з органів. Продукування С-реактивного протеїну залежить від інтенсивності патологічного процесу, тобто чим більше він виражений, тим більше СРБ надходить у кровоплин у відповідь на запалення [133].

Можна припустити, що в групі протеїнодефіцитних щурів такі зміни пов'язані з розвитком метаболічного запалення, що порушує клітинний метаболізм. Печінка також робить певний внесок у розвиток цього типу запалення.

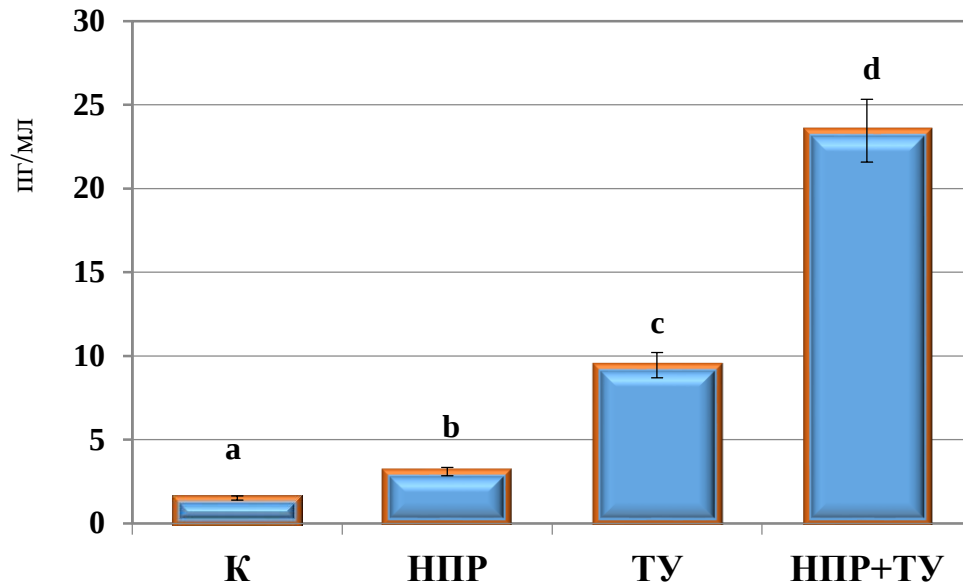


Рис. 3.1. Вміст С-реактивного білка в сироватці крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та токсичного ураження

Примітка (тут і надалі):

К – щури, які впродовж експерименту споживали напівсинтетичний повноцінний раціон (контроль);

НПР – щури, які отримували низькопротеїнову дієту;

ТУ – щури, яким моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном;

НПР+ТУ – щури, яким вводили токсичні дози ацетамінофену на тлі аліментарної нестачі протеїну;

a, b, c, d – статистично вірогідна різниця між групами та порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.

Дійсно, вироблення прозапальних цитокінів, що виділяються резидентними макрофагами в печінці, пов'язане з порушенням передачі сигналів інсуліну в печінці [134], що узгоджується з результатами наших попередніх досліджень щодо рівня С-пептиду та інсуліну за даних експериментальних умов. За даними літератури [135], посилена експресія генів запалення в печінці після годування дієтами, розбалансованими за кількістю макронутрієнтів, пов'язана зі зниженою чутливістю до інсуліну в мишей, що підтверджує взаємозв'язок метаболічного запалення з розвитком інсулінорезистентності.

З'явилися дослідження, які відзначають, що рівень СРБ у крові справді підвищується у дітей з білково-калорійним недоїданням. Це спостереження свідчить про те, що навіть у періоди, коли печінковий глюконеогенез

активується для забезпечення метаболічного палива, потреба в СРБ витісняє потребу в постачанні метаболічної енергії [136].

Водночас у групах щурів, яким вводили токсичні дози ацетамінофену (ТУ та НПР+ТУ) рівень С-реактивного білка в сироватці крові перевищує значення контролю в 6,5 та 15,5 разів відповідно (рис. 3.1).

Ураження печінки, викликане ацетамінофеном (АРАР), є основною причиною гострої печінкової недостатності (ГПН). На ранній стадії ГПН при передозуванні АРАР метаболізується до N-ацетил-р-бензохінону ферментами цитохрому Р450 (СYP450) у гепатоцитах. Надлишок N-ацетил-п-бензохінону виснажує клітинні запаси глутатіону (GSH) і утворює аддукти з білками, що призводить до дисфункції мітохондрій і утворення активних форм кисню. Ці токсичні явища ще більше посилюються активацією внутрішньоклітинної сигналізації, такої як JNK, і врешті-решт призводять до некрозу гепатоцитів. Під час пізньої фази ГПН сигнали про небезпеку, що поширюються некротичними гепатоцитами, викликають вроджену імунну відповідь шляхом рекрутування та активації резидентних клітин Купфера та циркулюючих моноцитів і нейтрофілів. Ці запальні реакції викликають пошкодження сусідніх гепатоцитів, тим самим посилюючи ранню фазу гепатоцитарно-автономної токсичності, спричиненої АРАР [137].

С-реактивний білок не тільки зв'язується з фосфатидидхоліном після його впливу на мембрану пошкоджених гепатоцитів, але також регулює активацію комплементу шляхом залучення C1q і фактора H, що призводить до модуляції імунної клітинної відповіді через FcγR. Комплемент є важливим компонентом вродженого імунітету та опосередковує збірку мембранно-атакуючого комплексу, який може спричинити пряме пошкодження клітин і утворення анафілатоксинів, що додатково рекрутують і активують імунні клітини. Ацетамінофен-індукована гепатотоксичність, призводить до активації імунних клітин [138].

Синтез і секреція СРБ стимулюється інтерлейкіном-6, раннім плейотропним цитокіном, що виділяється макрофагами, ендотеліальними та

іншими клітинами, які активуються у відповідь на запалення, включаючи послідовні процеси у місці ушкодження. Ця метаболічна відповідь супроводжується зміною біосинтезу низки білків, які отримали назву «білки гострої фази». Тому підвищення рівня СРБ в крові корелює з початком і ступенем як активованого запалення, так і біохімічної відповіді гострої фази на ураження тканин [139].

С-реактивний білок (СРБ) є ключовим білком вродженого імунітету. Структурно це неглікозилований білок із п'яти гомологічних глобулярних субодиниць, розташованих у дископодібній симетрії. Кожна субодиниця має регульовану кальцієм неглибоку зв'язувальну кишеню для лігандів, що експресують фрагменти фосфатидилхоліну. Біологічна активність СРБ як ефекторної молекули передбачає його роль як ліганду розпізнавання фрагментів фосфатидилхоліну, що може бути експресовано в тейхоєвій кислоті грампозитивних бактерій або на активованих клітинних мембранах, де фосфоліпідні подвійні шари згинаються у відповідь на сигнали активації, такі як фосфоліпаза А2 або окислення ацильного ланцюга ліпідів. Повідомляється, що при зв'язуванні СРБ активує ендотеліальні клітини, тромбоцити, лейкоцити та систему комплементу, а також впливає на загальну запальну реакцію на будь-яку зміну гомеостазу тканин [140].

Ще одним відомим біомаркером системного запального процесу є прокальцитонін (РСТ), що використовується у діагностиці інфекцій бактеріального походження. Продукується у щитоподібній залозі за рахунок С-клітин, при цьому в дуже низькій концентрації (менше 0,05 нг/мл) у фізіологічних умов. Проте під час запальної реакції, викликаній інфекційними агентами невідомої етіології, численні клітини та тканини можуть продукувати з посиленням надходженням у кровоплин.

У літературі зазначається, що концентрації прокальцитоніну в крові зазвичай зростає при бактеріальній інфекції, але неспецифічні запальні чи вірусні захворювання характеризуються низькими концентраціями даного показника. Вважають, що на пізніх захворюваннях печінки РСТ має

діагностичне значення для оцінки бактеріальної інфекції. Нещодавно науковці встановили, що рівень прокальцитоніну може використовуватися як маркер гепатоцелюлярного пошкодження та відображає ступінь тяжкості патологічних станів печінки, що підвищує його діагностичну цінність [141].

Нами встановлено, що концентрація прокальцитоніну в сироватці крові зростає у всіх дослідних групах щурів з максимальними значеннями (> 10 разів порівняно з контролем) в тварин, яким на тлі аліментарної депривації протеїну моделювали гостре токсичне ураження ацетамінофеном (рис. 3.2).

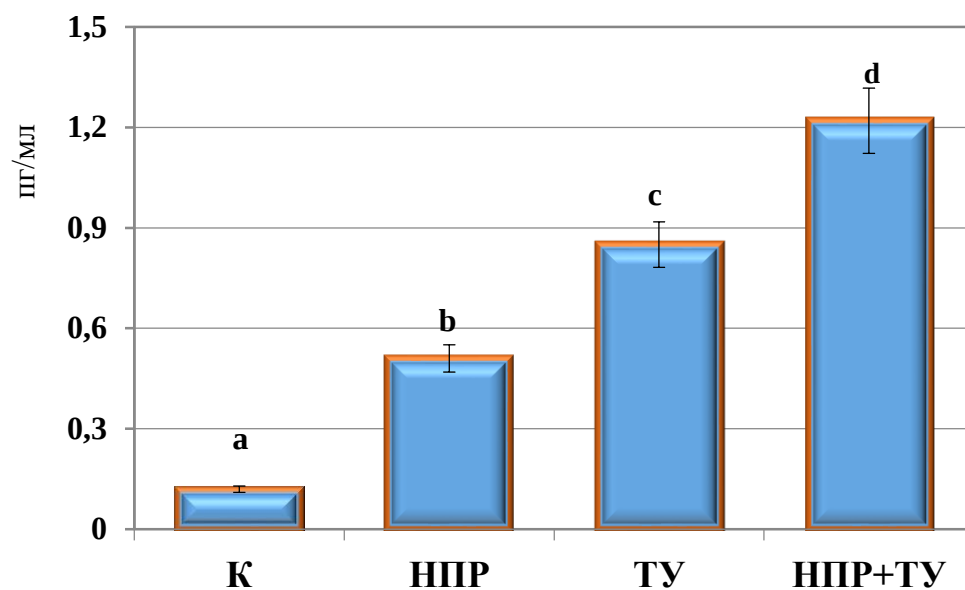


Рис. 3.2. Концентрація прокальцитоніну в сироватці крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та токсичного ураження

Прокальцитонін відщеплюється від пре-прокальцитоніну ендопептидазою в ендоплазматичному ретикулумі. Потім РСТ далі розщеплюється з утворенням N-кінцевого РСТ, С-кінцевого катакальцину та активного кальцитоніну. Оскільки весь РСТ, що утворюється в С-клітинах, розщеплюється на вищезазначені продукти, а РСТ не потрапляє в циркуляцію, вміст РСТ у сироватці за фізіологічних умов є нижчим рівня, який можна визначити. Окрім того, жодні ферменти плазми не здатні розщепити РСТ, коли

він потрапляє в кровоплин; отже, він залишається незмінним з періодом напіввиведення 25-30 годин [142].

Під час розвитку системної запальної реакції, що характерно для ацетамінофен-індукованого ураження, продукування РСТ відбувається зовсім іншим шляхом, деталі якого не повністю зрозумілі. Дослідники припускають повсюдну експресію гена кальцитоніну в багатьох тканинах у відповідь на сепсис, тоді як інші вважають, що специфічні органи, такі як гіпофіз, нейроендокринні клітини в легенях, кишечнику, печінці або гіпоталамусі, є джерелом РСТ при запаленні [143]. Декілька досліджень показали утворення РСТ у відповідь на бактеріальний ліпополісахарид (LPS) або інші ендотоксини та маркери запалення, такі як IL- β , IL-6, TNF- α , IL-2 тощо [144].

Отже, токсичне ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну супроводжується максимальним підвищенням рівня С-реактивного білка та прокальцитоніну в сироватці крові, що можна розглядати як прогностичні біомаркери системної запальної реакції за даних експериментальних умов.

Потім запальна реакція викликає вивільнення активних форм кисню, які, у свою чергу, сприяють секреції TNF- α та IL6 [145].

Печінка відіграє центральну роль у виявленні та реагуванні на запальні сигнали. На ранніх стадіях запалення цитокіни, що виробляються імунними клітинами, потрапляють у кров і виявляються гепатоцитами печінки, які ініціюють системну відповідь гострої фази. Тому гепатоцити на порядки збільшують продукування білків гострої фази.

Гостре запалення печінки призводить до рекрутування та активації популяції лейкоцитів, а також до індукції фіброзних реакцій у місці запалення. Фіброз, що розсмоктується під час гострого ушкодження, захищає гепатоцити, що вижили, зменшуючи проапоптозну передачу сигналів і підвищуючи стійкість до ряду токсинів. Цей фіброзний процес регулюється запальними цитокінами та факторами росту, що виділяються лейкоцитами, які переміщуються до пошкодженої тканини. Ці цитокіни включають TNF- α , IL-

6, тромбоцитарний фактор росту та TGF- β . Фіброз печінки часто вважається ознакою патології, коли змінює структуру та функцію тканини через порушення регуляції або надмірне запалення [146].

Отримані нами результати щодо рівня медіаторних протеїнів запальної відповіді організму С-реактивного білка та прокальцитоніну узгоджуються зі змінами вмісту фактору некрозу пухлин-альфа (TNF- α) в сироватці крові щурів усіх дослідних груп (рис. 3.3). З даного рисунку видно, що максимальне зростання концентрації даного показника зареєстровано за умов введення токсичних доз ацетамінофену (ТУ та НПР+ТУ), що в 10 та 13 разів перевищує значення контрольних величин (рис. 3.3).

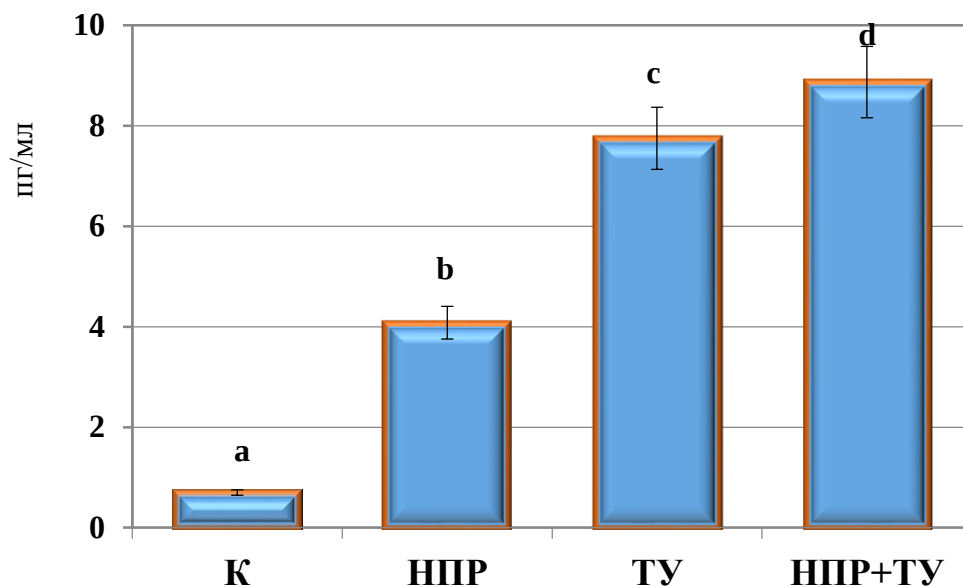


Рис. 3.3. Рівень фактору некрозу пухлини-альфа (TNF- α) в сироватці крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та токсичного ураження

Передбачається, що фактор некрозу пухлини-альфа (TNF-альфа) діє як медіатор при токсичному ураженні печінки, посилюючи первинне пошкодження паренхіматозних клітин печінки.

TNF- α повсюдно експресується в імунних і гемопоетичних клітинах. TNF- α в основному експресується та секритується кістковим мозком,

лімфатичними вузлами, особливо макрофагами. Синтез і секреція TNF- α є багатоетапним процесом, керованим кластером регульованих ферментів і білків.

TNF- α є добре відомим основним регулятором запалення через його класичні функції в активації шляху NF- κ B. Сигнальні каскади TNF- α активуються, а активований NF- κ B згодом переміщується до ядра, щоб сприяти транскрипції асоційованих із запаленням білків, таких як IL-6, CXCL10 і CCL2, що, у свою чергу, посилює передачу сигналів TNF- α і утворює порочне коло.

Нові клінічні дані підтверджують гіпотезу про те, що передача сигналу TNF- α може відігравати істотну роль у прогресуванні стеатогепатиту, оскільки рівні TNF- α в печінці та циркулюючій крові корелюють із тяжкістю перебігу захворювання [147].

Під час розвитку гепатопатологій важливу роль у модуляції експресії TNF- α відіграють клітини Купфера. Ці клітини є макрофагами, які розташовані в синусоїдах печінки, що становлять майже 15% від загальної популяції клітин печінки. На клітинному рівні клітини Купфера відіграють ключову роль у відповіді на запалення. Показано, що в умовах харчового стресу (таких як стимуляція ВЖК) експресія запальних цитокінів (TNF- α та ін.) значно посилювалася в гепатоцитах, що ще більше посилювало стеатоз печінки та активувало клітини Купфера.

Клітини Купфера можуть диференціюватися в класично активовані макрофаги (тип M1) за допомогою багатьох активаторів, таких як LPS та інших факторів стресу, і, у свою чергу, вони сприяють апоптозу гепатоцитів, що згодом призводить до вивільнення, по суті, прозапальних факторів, особливо TNF- α , щоб стимулювати залучення та інфільтрацію циркулюючих моноцитів і макрофагів.

Цікаво, що нещодавнє дослідження показало, що В-лімфоцити мігрували до печінки раніше, ніж Т-лімфоцити та макрофаги під час

прогресування стеатогепатиту, що сприяло експресії запальних цитокінів, включаючи TNF- α у гепатоцитах.

Підсумовуючи, можна сказати, що гепатоцити та клітини Купфера є основними джерелами продукції TNF- α на початковій стадії токсичного ураження печінки, тоді як інфільтровані моноцити та макрофаги пізніше беруть участь у порочному колі сигнального каскаду TNF- α під час прогресування захворювання [148].

Крім того, TNF- α може індукувати експресію тканинного інгібітора металопротеїнази 1 (TIMP-1) для прояву антиапоптозного ефекту в активованих зірчастих клітинах, про що свідчить знижена активність каспази-3. Причинний вплив TNF- α на опосередкування апоптозу клітин печінки було додатково підтверджено лікуванням LPS у мишачої моделі NASH, враховуючи те, що викликаний LPS апоптоз клітин печінки блокувався антитілами проти TNF- α [149].

Таким чином, гостра гепатотоксичність асоціюється з індукцією прозапальних цитокінів, включаючи фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α). Прозапальні цитокіни активують мітоген-активовану протеїнкіназу, c-Jun-N-кінцеву кіназу (JNK) у печінці. Недавні дослідження показали, що JNK може регулювати гепатотоксичність анальгетика ацетамінофену (APAP). Кілька звітів показали, що запалення, спричинене ендотоксином, ліпополісахаридом, посилює токсичну відповідь на гепатотоксиканти *in vivo*. Однак механізм, за допомогою якого запалення змінює спричинену лікарськими засобами гепатотоксичність, невідомий. Наукові результати засвідчують, що TNF- α є основним цитокіном, який бере участь у сенсibilізації гепатоцитів до APAP-індукованої гепатотоксичності, ймовірно, за допомогою механізму, що включає тривалу активацію JNK [150].

Як уже згадувалося, основним індуктором білків гострої фази печінки є цитокін IL-6, який секретується нейтрофілами, моноцитами та макрофагами при стимуляції TLR (Toll-подібний рецептор), наприклад, ліпополісахаридом. Крім того, активовані мієлоїдні клітини вивільняють запальні цитокіни IL-1 і

TNF- α , що може призвести до масового виробництва та секреції IL-6 з інших клітин, таких як ендотеліальні клітини та фібробласти, таким чином функціонуючи як позитивна петля прямого живлення [151].

Результати проведених нами досліджень засвідчують підвищення рівня інтерлейкіну-6 (IL-6) в сироватці крові щурів, яким вводили токсичні дози ацетамінофену (ТУ та НПР+ТУ) в 3 та 5 разів відповідно порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.4). Біологічна роль IL-6, в першу чергу, полягає в індукції відновлювальних механізмів та активації імунного захисту (активація та диференціювання Т-клітин, дозрівання В-клітин, синтез С-реактивного білка у печінці, посилення гемопоєзу)/

Підвищення рівня інтерлейкіну-6 як одного з цитокінів дозволяє спрогнозувати можливий розвиток «цитокінової бурі». Це патологічна реакція імунної системи, яка не захищає організм, а неконтрольовано активує цитокінами імунні клітини у вогнищі запалення. Надлишкова продукція інтерлейкіну-6 може викликати пошкодження тканин внаслідок аутоімунної реакції.

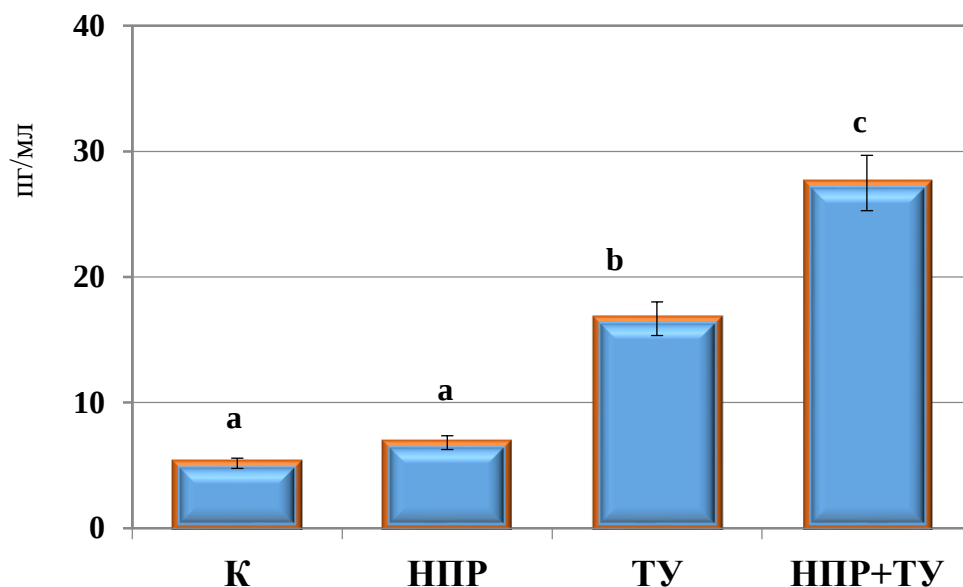


Рис. 3.4. Рівень інтерлейкіну-6 (IL-6) в сироватці крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та токсичного ураження

Так, запальні цитокіни проникають у кровоплин, викликаючи системні цитокінові бурі та, зрештою, поліорганну дисфункцію. У цьому випадку IL-6 впливає на процес зсідання крові, викликаючи ДВС-синдром. Дане припущення узгоджується із результатами досліджень наукової групи щодо порушення тромбоцитарної та коагуляційної ланок системи гемостазу за даних експериментальних умов.

Отже, токсичне ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну призводить до гіперпродукції фактора некрозу пухлини-альфа (TNF- α) та інтерлейкіну-6 (IL-6) в сироватці крові щурів.

Водночас нами встановлено, що в сироватці крові усіх дослідних груп щурів спостерігається зростання кількостей IL-8 та IL-10 порівняно зі значеннями контролю (рис. 3.5). Найвищі значення досліджуваних показників зареєстровано за умов ацетамінофен-індукованого ураження у протеїнодефіцитних щурів. Проте, слід зазначити, що ключовим чинником встановлених в більшій мірі виступає саме надходження токсичних доз медикаментозного ксенобіотика.

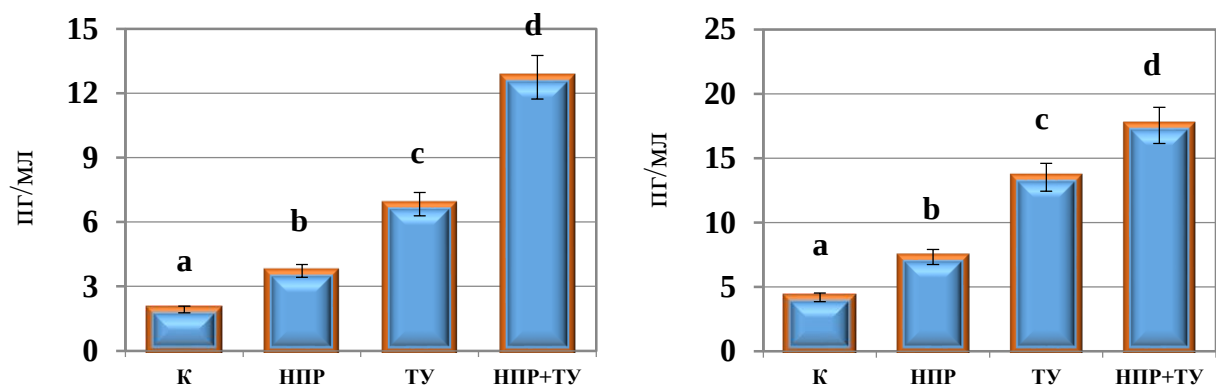


Рис. 3.5. Рівень інтерлейкіну-8 (а) та інтерлейкіну-10 (б) в сироватці крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та токсичного ураження

Окрім «класичних» медіаторів запалення, таких як IL-1, TNF- α , хемокіни беруть важливу участь у спрямуванні трафіку нейтрофілів до місць

ушкодження тканин. IL-8 (CXCL8) є одним з важливих членів сімейства хемокінів CXC з додатковим характерним мотивом глутамат-лейцин-аргінін (ELR) біля N-кінця молекули. Ключовою функцією цих ELR⁺-хемокінів, таких як CXCL8/IL-8, є залучення поліморфноядерних клітин до місць пошкодження тканини та запалення. Цитокіни, такі як IL-1 і TNF- α , є сильними індукторами ELR⁺-хемокінів. IL-8 синтезується величезною кількістю різних клітин. Практично всі підгрупи клітин, що володіють Toll-подібними рецепторами (TLR), здатні продукувати IL-8, серед них моноцити та макрофаги [152].

Декілька спостережень свідчать про те, що шляхи IL-8 також можуть брати участь у патогенезі хронічного захворювання печінки. Наприклад, рівень IL-8 підвищується внутрішньопечінково та в сироватці крові пацієнтів з алкогольною хворобою печінки, ймовірно, сприяючи накопиченню нейтрофілів у печінці, а також надаючи системну дію. У пацієнтів із хронічним гепатитом С рівень IL-8 у сироватці пов'язаний із прогресуванням захворювання та пов'язаний із відсутністю реакції на інтерферон. Цікаво, що експериментальна робота підняла ймовірність того, що IL-8 може не тільки діяти як простий білок-хімоатрактант у печінці, але й виконувати прямі профіброгенні функції. Таким чином, клітини Nuh-7, трансдуковані ядром HCV, були здатні стимулювати зірчасті клітини печінки (HSC) залежним від IL-8 способом. Подібним чином передача сигналів IL-8 була пов'язана з фіброзом у підшлунковій залозі та легенях [153].

У дослідженні [154] продемонстровано, що IL-8 активується як у кровоплинні, так і в печінці пацієнтів із хронічною печінковою недостатністю залежно від тяжкості та етіології захворювання. Активація IL-8 пов'язана з прогресуванням фіброзу печінки. Цікаво, що моноцити/макрофаги, а не нейтрофіли, виявляються головними реакторами на IL-8 при фіброзі/цирозі печінки через CXCR1. Крім того, некласична підгрупа моноцитів CD16⁺ також є потужним продуцентом цього хемокіну у людей.

Щодо IL-10, то його продукують в організмі різні клітинні популяції, включаючи субгрупи Т-клітин (Th 2, Tc 2, Tr 1 тощо), моноцити та

макрофаги. IL-10 також виробляється різними типами клітин в інших органах, включаючи печінку. Крім того, вісь стресу відіграє значну роль у регуляції експресії IL-10 *in vivo*. Опосередкована активація стресових реакцій через ендотоксемію/бактеріємію викликає вивільнення катехоламінів, які посилюють вироблення IL-10 у макрофагах, особливо в печінці. У печінці задокументовано продукування IL-10 у гепатоцитах, синусоїдальних ендотеліальних клітинах, клітинах Купфера, зірчастих клітинах печінки та асоційованих з печінкою лімфоцитах. Ці клітини стимулюються виробляти IL-10 через передачу сигналів цАМФ/протеїнкінази A/CREB-1/ATF-1 кількома ендогенними та екзогенними факторами, такими як стрес, фактор некрозу пухлини- α , катехоламіни та препарати, що підвищують цАМФ. . Останні дані свідчать про те, що мітоген-активованій кіназний шлях p38 також регулює промотор людського IL-10 через активацію фактора транскрипції *sp1*. Активність IL-10 опосередкована його специфічним рецептором клітинної поверхні – рецептором IL-10, який експресується в різних клітинах, особливо в імунних клітинах [155]

Підвищення рівнів IL-6 та IL-10 можуть бути частиною стратегії захисту господаря для відновлення пошкодженої печінки та контролю запалення, відповідно. Цікаво, що IL-10 інгібує прозапальні цитокіни, такі як TNF- α , тим самим покращуючи перебіг ушкодження печінки, але він інгібує й гепатопротекторні цитокіни, такі як IL-6, тим самим потенціюючи розвиток гепатопатологій та зменшуючи регенераційний потенціал печінки. Таким чином, IL-10, ймовірно, відіграє подвійну роль у контролі прогресування ацетамінофен-індукованого ураження печінки [156].

Печінка – основний метаболічний орган в організмі, що володіє здатністю до регенерації. Тоді як часткова гепатектомія (ЧГЕ) є популярною моделлю для вивчення регенерації печінки, печінка також регенерує після гострого ушкодження, але менше відомо про механізми, які керують цим процесом.

Нещодавні дослідження показали, що регенерація печінки має вирішальне значення для виживання при гострій печінковій недостатності (ГПН), яка зазвичай виникає внаслідок медикаментозного ураження печінки. Іноді припускають, що задіяні сигнальні шляхи подібні до тих, які регулюють регенерацію після ЧГЕ, але, ймовірно, існують критичні відмінності. Краще розуміння механізмів регенерації після гепатотоксичності загалом може призвести до розробки нових методів лікування для пацієнтів з ГПН та нових біомаркерів для прогнозування результатів захворювань.

Тому наступним етапом нашої роботи стало дослідження рівнів прорегенеративних цитокінів та медіаторних протеїнів системної запальної відповіді організму в сироватці крові інтактних тварин та щурів за умов ацетамінофен-індукованого ураження після часткової резекції.

Процес регенерації печінки зазвичай поділяють на три фази: початкова фаза/фаза ініціації, фаза прогресування/підтримки та фаза завершення. У складному процесі регенерації печінки беруть участь різні сигнальні шляхи, рецептори та їх ліганди. Крім того, між цими шляхами існує складний перехресний зв'язок, який іноді має загальний маршрут; отже, може бути важко визначити, який шлях конкретно регулює яку фазу клітинного циклу. Однак ця складність означає, що в процесі регенерації печінки немає єдиної вузлової точки, яка в кінцевому підсумку сприяє виживанню господаря.

Часткова гепатектомія та токсичне пошкодження печінки викликають сигнали в печінці, які призводять до швидких змін у транскрипційному середовищі, включаючи активацію латентних транскрипційних факторів NF-каппа В і STAT3, а також індукцію експресії генів ранньої відповіді. Деякі з цих змін у гепатоцитах, включаючи індукцію STAT3 та NF-каппа В, залежать від цитокінів, TNF-альфа та інтерлейкіну-6 (IL-6), які, ймовірно, вивільняються з непаренхіматозних клітин печінки протягом кількох хвилин після гепатектомії.

Нами встановлено, що в обох групах дослідних щурів після проведення часткової гепатектомії до 48 год спостерігалася практично однакова тенденція змін рівня TNF-альфа в сироватці крові (рис. 3.6). Варто відзначити, що якщо в

тварин групи К/ЧГЕ концентрація TNF- α в сироватці крові на 72 год регенерації (зупинка проліферації) відновлюється до значень контролю, то в групі тварин із токсичним ураженням (ТУ/ЧГЕ) значення даного показника все ж зберігається на високому рівні порівняно як з групою ТУ, так і з контролем (рис. 3.6).

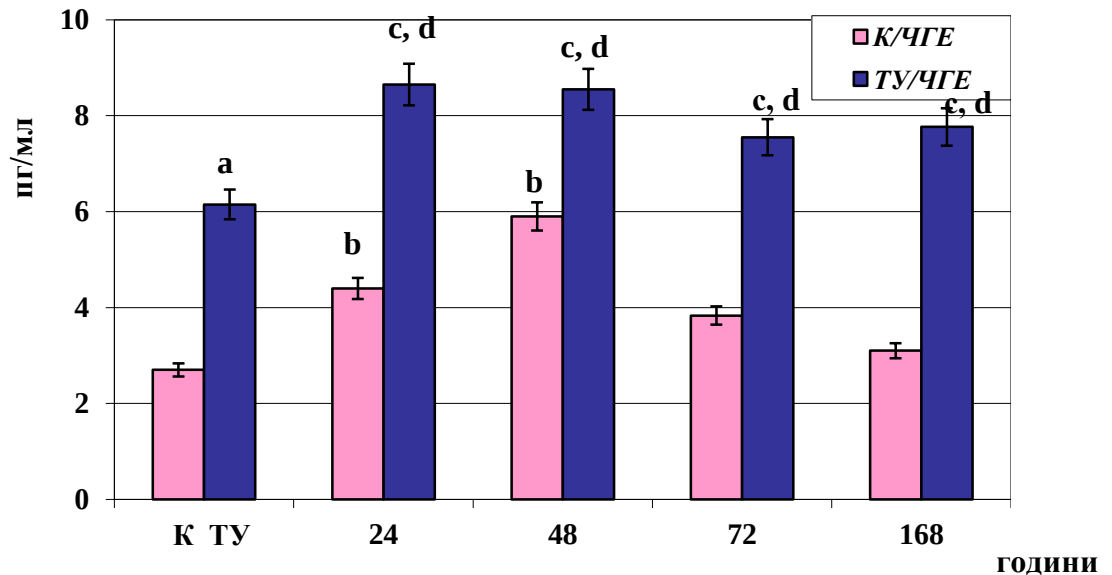


Рис. 3.6. Рівень TNF- α в сироватці крові щурів за умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії

Примітка (тут і надалі):

К/ЧГЕ – інтактні тварини, яким проводили резекцію 2/3 тканини печінки;

ТУ/ЧГЕ – щури, яким після токсичного ураження ацетамінофеном проводили часткову гепатектомію;

a – статистично вірогідні відмінності між групами щурів ТУ порівняно з контролем (К), $P \leq 0,05$;

b – статистично вірогідні відмінності між групами тварин К/ЧГЕ порівняно з контрольними величинами, $P \leq 0,05$;

c – статистично вірогідні відмінності між групами ТУ/ЧГЕ порівняно зі значеннями щурів групи ТУ, $P \leq 0,05$;

d – статистично вірогідні відмінності між групами щурів ТУ/ЧГЕ порівняно з показниками К/ЧГЕ, $P \leq 0,05$.

Під час регенерації гіпертрофія гепатоцитів є першою відповіддю, а потім проліферація неепітеліального відділу (гіперплазія). Однак резецовані частки ніколи не відростають. Найкращим порівнянням цієї моделі на людях є часткова гепатектомія. Найбільш поширеним показанням до часткової гепатектомії є резекція первинної або вторинної пухлини печінки. Серед

первинного раку печінки найбільш поширеною є гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК), за якою слідує внутрішньопечінкова холангіокарцинома. Крім того, печінка є типовим місцем метастазування інших пухлин, переважно шлунково-кишкового походження. Під час гепатектомії, оскільки обсяг залишків печінки зменшується, ризик критичної печінкової недостатності зростає [157].

Ініціація відновлення та регенерація тканин печінки супроводжується розвитком запальних реакцій із залученням, проліферацією та активацією низки запальних та імунних меліаторів, що насамперед спрямоване на усунення пошкоджених клітин. Етапи регенераційного каскаду, спричинені запаленням, насамперед індукуються цитокінами та факторами росту, які вивільняються із запальних клітин. Найбільш детально вивченими прозапальними цитокінами є фактор некрозу пухлини- α та інтерлейкін-6.

На початковій фазі регенерації печінки клітини Купфера активуються LPS або TNF- α для подальшого вивільнення TNF- α та IL-6. Цей процес регулюється сигнальним шляхом ядерного фактора NF- κ B. Після активації рецепторів IkB фосфорилується та видаляється I κ k, дозволяючи NF- κ B мігрувати до ядра, посилюючи експресію TNF, IL-1, IL-6 та VEGF. Також показано, що шлях NF- κ B має перехресні перешкоди, наприклад, з шляхами JAK/STAT, PI3K/Akt/mTOR і Wnt/ β -катеніну [158].

Інші дослідження висунули гіпотезу про імунну дисфункцію та зміну процесу відновлення печінки, викликану імунорегуляторними властивостями TNF- α . Дійсно, TNF- α може опосередковувати подвійний і протилежний ефект, діючи на два рецептори TNF (TNFR1 і TNFR2), що експресуються на Т-клітинах, і сприяючи як некрозу гепатоцитів у відповідь на токсини, так і, навпаки, посилюючи проліферацію клітин печінки у відповідних умовах [159], що узгоджується з отриманими нами результатами досліджень. Зокрема, TNF- α здатний стимулювати ефекторні Т-клітини, головним чином через TNFR1, який викликає запальну відповідь.

Тому дослідження специфічних змінних, які пов'язані з участю $\text{TNF-}\alpha$ у запальних захворюваннях печінки, може відкрити нові терапевтичні горизонти для відбору хворих, яким буде корисно використання анти- $\text{TNF-}\alpha$.

Щодо рівня інтерлейкіну-6 в сироватці крові інтактних тварин та щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії, то у групі К/ЧГЕ даний показник підвищується лише через 24 год (початкова фаза регенерації, фаза праймінгу) та на 48 год (період активної проліферації) (рис.3.7).

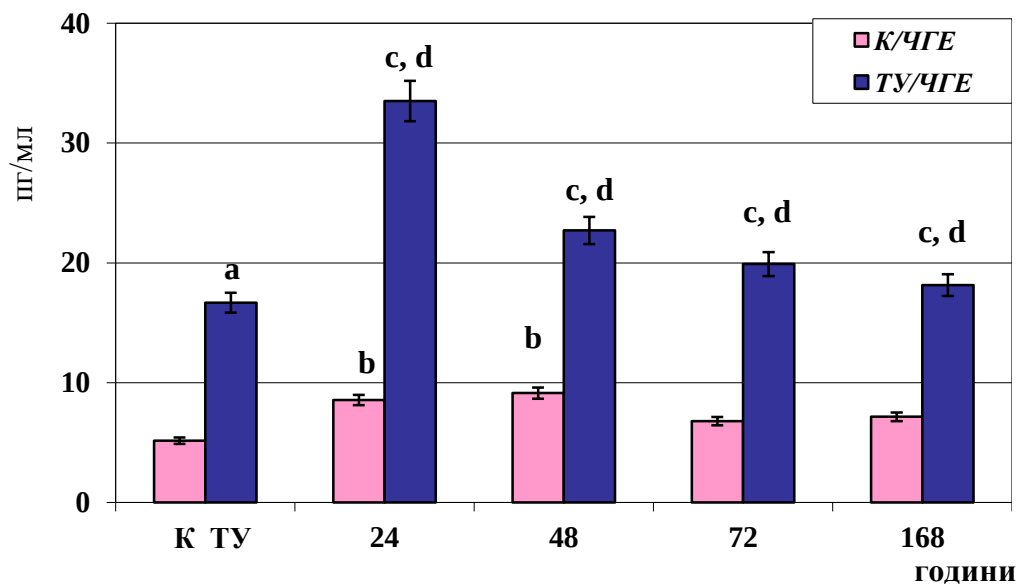


Рис. 3.7. Рівень ІЛ-6 в сироватці крові щурів за умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії

ІЛ-6 є критичним фактором мітогенної відповіді під час регенерації печінки і важливий як для прогресування клітинного циклу, так і для захисту від пошкодження печінки. Однак це не повний фактор, оскільки він відповідає лише за підмножину змін експресії генів, які відбуваються після гепатектомії.

Відомо, що розчинні позапечінкові фактори забезпечують стимул для проліферації гепатоцитів. За даними літератури [160] уже через 2 години після гепатектомії рівень $\text{TNF-}\alpha$ підвищується з наступним різким підвищенням рівня ІЛ-6 у вені печінки. Після гепатектомії або пошкодження печінки фактори кишкового походження, такі як ліпополісахариди (ЛПС), активують

резидентні клітини Купфера в печінці, що призводить до TNF- α -залежної секреції IL-6. Тоді IL-6 стимулює проліферацію гепатоцитів. Трансигналізація IL-6 посилює регенерацію печінки

Таким чином, нами зареєстровано, що в групі інтактних тварин після ЧГЕ впродовж рівень TNF- α підвищується з наступним різким підвищенням рівня IL-6 лише впродовж 48 год.

Водночас у групі тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії нами зареєстровано зростання даного показника впродовж всього терміну регенераційного процесу аж до 168 год (рис. 3.7).

Найперші наукові дослідження регенерації після передозування ацетамінофеном на мишах показали, що експресія IL-6 зростає вже через 4 години після передозування ксенобіотиком. При цьому Ju et al. продемонстрували, що «виснаження клітин Купфера ліпосомальним клондронатом знижує експресію TNF α , IL-6 та інших цитокінів і посилює токсичність як на ранніх, так і на пізніх термінах. Цікаво, що виявляється, за відсутності IL-6 інші цитокіни можуть підвищуватися для компенсації» [161].

Необхідно наголосити, що IL-6 є цитокіном з плейотропними функціями в організмі. За фізіологічних умов він необхідний для належного гомеостазу печінкової тканини, регенерації печінки, захисту від інфекції та регуляції метаболічних функцій. Однак постійна активація шляху IL-6, що встановлено нами в групі ТУ/ЧГЕ, є згубною, оскільки може навіть призвести до гострої печінкової недостатності з наступним розвитком раку печінки.

Отже, у групі інтактних щурів після ЧГЕ рівень цитокінів TNF- α та IL-6 зростає лише на початковій стадії (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год), що можна розглядати як активну запальну відповідь після оперативного втручання для переведення гепатоцитів в активну фазу клітинного циклу. У групі щурів ТУ/ЧГЕ стимуляція TNF- α та IL-6 впродовж всього експерименту вказує на некерований процес регенерації печінки внаслідок чого порушення архітектоніки органу може призвести до формування фіброзних тяжів.

Водночас нами встановлено, що рівень ІЛ-8 в сироватці крові інтактних тварин після часткової резекції тканин печінки підвищується на 48, 72 та 168 год регенераційного процесу (рис. 3.8). Тоді як у щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після ЧГЕ спостерігається абсолютно інша тенденція змін: інтенсивне зростання рівня даного показника на стадії праймінгу (24 год) з наступним зниженням порівняно зі значеннями групи ТУ впродовж 48–168 год експерименту (рис. 3.8).

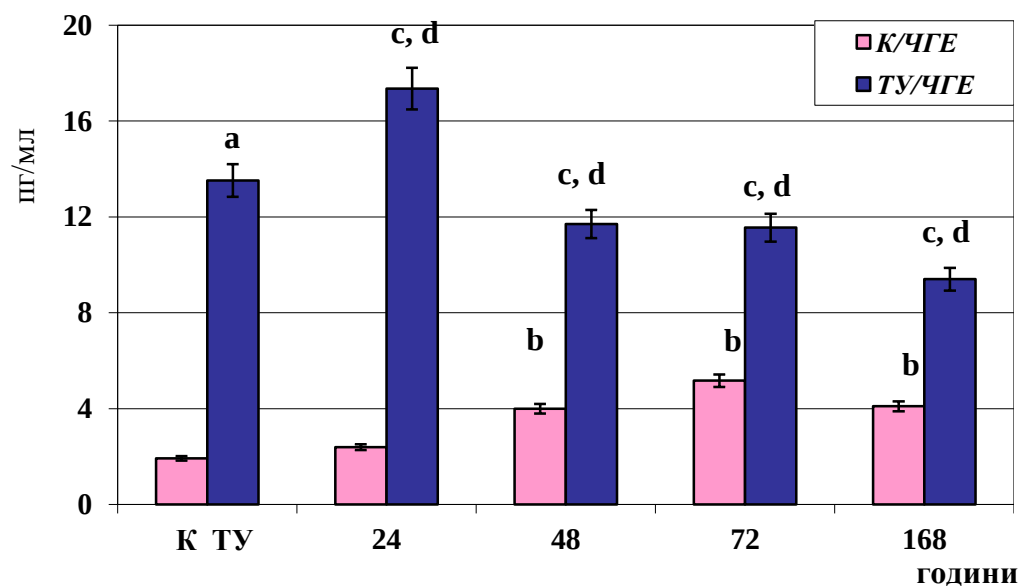


Рис. 3.8. Рівень ІЛ-8 в сироватці крові щурів за умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії

Нами показано, що рівні ІЛ-8 у сироватці крові підвищуються після передозування N-ацетил-р-амінофенолом, і це є ознакою гепатоцелюлярного пошкодження. Крім того, в літературі [162] зазначено, що рівні ІЛ-8 значно підвищені у пацієнтів з хронічними захворюваннями печінки залежно від стадії цирозу.

Базуючись на попередніх дослідженнях, деякі паренхіматозні (пошкоджені гепатоцити, епітеліальні клітини жовчних шляхів) і непаренхіматозні (ендотелій) клітини печінки, а також інфільтруючі імунні клітини є основними джерелами ІЛ-8 при пошкодженні печінки.

Печінка дорослих ссавців демонструє чудову регенеративну здатність із різними способами регенерації відповідно до типу та ступеня пошкодження. Гепатоцит-холангіоцитарні біфенотипові популяції клітин-попередників печінки з'являються в умовах надмірного пошкодження. Повідомлялося, що зрілі гепатоцити можуть трансдиференціюватися до фенотипу холангіоцитів і бути клітинним джерелом популяцій клітин-попередників [163].

Враховуючи встановлений нами факт зниження рівня IL-8 в період зупинки термінації та на віддалених етапах регенерації печінки, можна припустити, що порушується регуляція фенотипового перетворення зрілих гепатоцитів у фенотип холангіоцитів, що може в подальшому виражатися розвитком синдрому холестазу та узгоджується з результатами, отриманими науковою групою щодо зміни співвідношення вмісту загального білірубіну та його фракцій.

З іншого боку, IL-8 функціонально пов'язаний з інфільтрацією нейтрофілів печінки, запаленням печінки та активацією профіброгенних зірчастих клітин печінки, що продукують колаген. Таким чином отримані нами результати можуть вказувати на пригнічення синтезу білків екстрацелюлярного матриксу, що призводитиме до недостатнього відновлення паренхіми печінки у групі щурів ТУ/ЧГЕ.

Щодо рівня IL-10, який є протизапальним цитокином, то в групі щурів К/ЧГЕ даний показник зростає лише під час фази праймінгу (24 год) та активної проліферації клітин (48 год) (рис. 3.9). Тоді як у тварин із ацетамінофен-індукованим ураженням після ЧГЕ на 24 год концентрація IL-10 різко підвищується, тоді як починаючи з 48 год і аж до віддалених термінів регенерації печінки рівень досліджуваного показника виявляється вищим за значення, отримані у групі ТУ (рис. 3.9).

Слід відмітити, що IL-10 має провзаємодіяти з іншими прозапальними цитокинами для того, щоб забезпечити точну регуляцію та синхронізацію проліферації гепатоцитів за умов регенерації. IL-10 має здатність пригнічувати

запальну відповідь цитокінів, з наступною регуляцією активності STAT3 печінки.

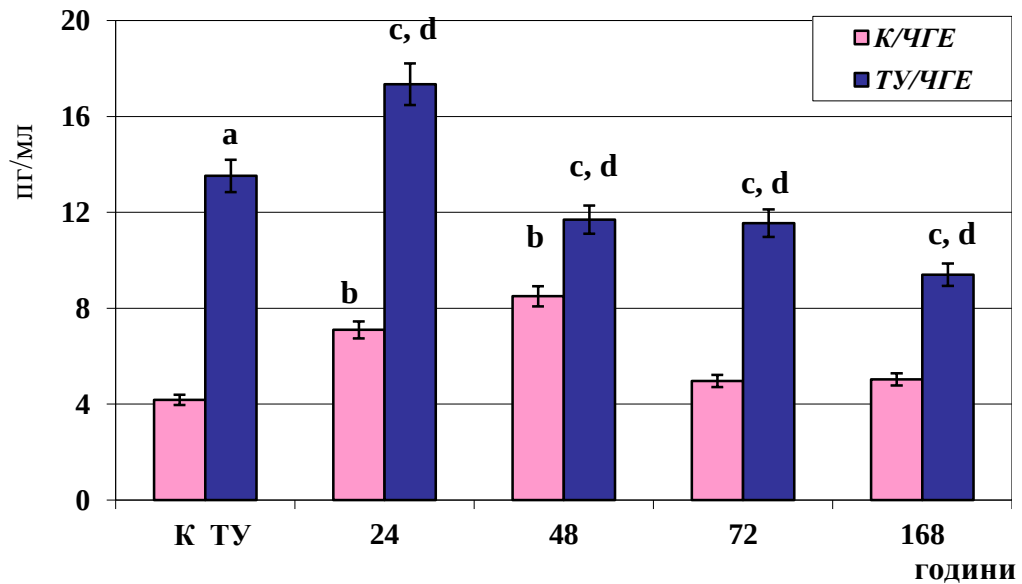


Рис. 3.9. Рівень ІЛ-10 в сироватці крові щурів за умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії

Тому підвищення рівня ІЛ-10 в сироватці крові щурів групи К/ЧГЕ може проявляти ключову роль не лише для зниження активності запального процесу уже на початкових етапах, але й для організації активного процесу регенерації печінки, тоді як зниження рівня даного показника у щурів групи ТУ/ЧГЕ супроводжуватиметься нерегельованою запальною відповіддю, що може призвести до пухлинної трансформації за даних експериментальних умов.

У здоровій печінці постійні зміни метаболізму та активності ремоделювання тканин у поєднанні з регулярним впливом мікробних продуктів призводять до постійного регульованого запалення. Ці запальні процеси відбуваються під жорстким контролем і стимулюються до додаткової активності лише тоді, коли печінка вимагає звільнення від гепатотропних патогенів, злоякісних клітин або токсичних продуктів метаболічної діяльності. Нездатність усунути такі небезпечні подразники та запалення призводить до хронічної інфекції, аутоімунітету або пухлинної трансформації. Це неминуче пов'язано з хронічним патологічним запаленням і порушенням тканинного

гомеостазу, що може прогресувати до фіброзу, цирозу та печінкової недостатності.

У печінці гомеостатичні запальні процеси контролюють гемодинамічні зміни, проникність капілярів, міграцію лейкоцитів у тканини та секрецію медіаторів запалення. Тому активація процесів гомеостатичного запалення сприяє регенерації тканин печінки.

Нами встановлено, що в сироватці крові інтактних щурів, яким здійснювали часткову резекцію печінки (К/ЧГЕ), спостерігається однакова тенденція змін вмісту С-реактивного білка (рис. 3.10) та концентрації прокальцитоніну (рис. 3.11)

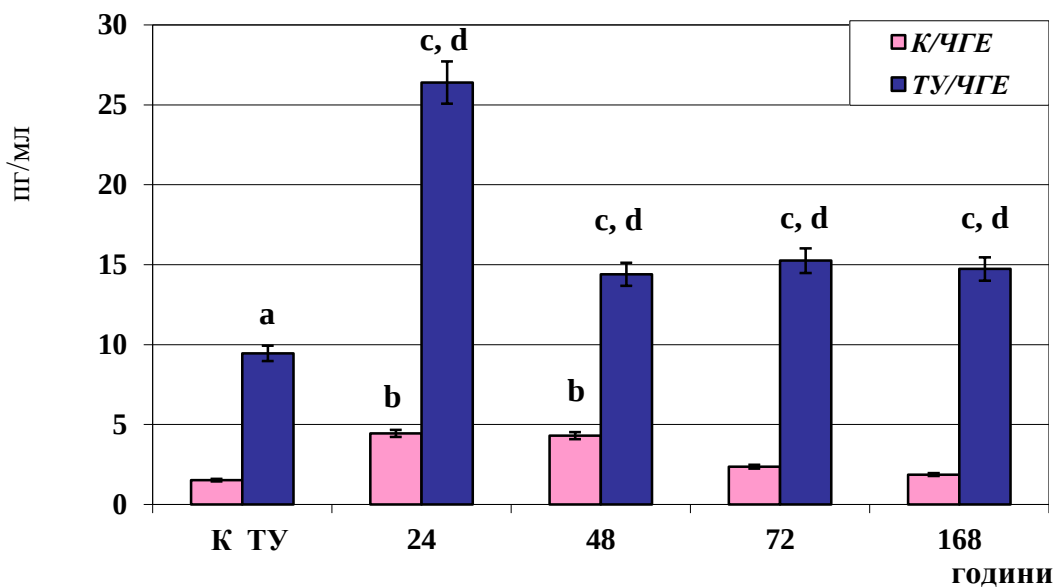


Рис. 3.10. Вміст С-реактивного білка в сироватці крові щурів за умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії

Рівні СРБ у крові помітно змінюються протягом декількох годин або днів після будь-якої події, яка включає патологію, що пошкоджує тканини. У відповідь на травму тканин рівень СРБ у крові зростає протягом 6–48 годин до рівнів, які загалом залежать від ступеня пошкодження тканини. Оскільки запалення є природною захисною реакцією організму на пошкодження тканин, рівень СРБ історично діагностично асоціювався із запаленням, а не з пошкодженням тканин. Більш прямо, рівні СРБ змінюються

у відповідь на наявність і ступінь пошкодження тканини, що, у свою чергу, активує гостру фазу запальної відповіді на пошкодження. Гостре запалення, що виникає протягом декількох хвилин або годин після пошкодження тканини, зазвичай вважається сприятливим для захисної реакції організму. Хронічне запалення, яке може тривати днями, тижнями, місяцями або роками, може призвести до пошкодження та руйнування здорових тканин, ослаблення захисних сил організму та проблемної реакції. Це розрізнення є актуальним для обговорення СРБ, оскільки тепер відомо, що СРБ існує принаймні у двох ізомерних структурних формах з протилежною дією на запальну відповідь. Ізоформа СРБ, яка розпізнається та вимірюється в крові, є високорозчинним, нековалентно зв'язаним циклічним пентамером («пСРБ»). Нещодавно було показано, що пСРБ має слабку протизапальну біоактивність. Однак, коли пентамер змушують дисоціювати на окремі субодиниці, він зазнає непротеолітичної, суттєвої конформаційної зміни в структурно, антигенно та біологічно відмінну молекулу, описану як модифікований мономерний СРБ (тобто «мСРБ»). мСРБ є короткоживучою ізоформою з потужною прозапальною біоактивністю підсилення гострої фази, яка пов'язана з ранніми фазами гострої запальної відповіді [164].

Так, у групі тварин ТУ/ЧГЕ рівень С-реактивного протеїну максимально зростає на 24 год (експерименту) та залишається вищим значень групи ТУ та К впродовж всього регенераційного процесу (рис. 3.10).

Відомо, що перетворення пСРБ в мСРБ індукує запальний сигнал. Моноацилфосфатидилхолін, що утворюється фосфоліпазою A2 у ліпідному подвійному шарі або шляхом окислення ацильних ланцюгів ліпідів активними формами кисню, сприяє зв'язуванню та дисоціації пентамерного СРБ до мономерного. Утворення мСРБ відкриває послідовність зв'язування холестеролу, так що мСРБ потрапляє в багаті холестероом ліпідні рафти, активуючи внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, що включають NF- κ B-регульовану трансляцію білків, залучених у прозапальні реакції [165].

Оскільки печінковий синтез пСРБ регулюється цитокінами, що вивільняються пошкодженими ендотеліальними клітинами, стійко підвищений синтез і рівні СРБ у сироватці крові швидше за все пов'язані безпосередньо з патологіями, що пошкоджують тканини, а не із запаленням, що характерно для групи тварин із ацетамінофен-індукованим ураженням після ЧГЕ (рис. 3.10) Хронічне (непосилене) запалення може зберігатися в такій ситуації, загострюючи процеси деструкції тканин і погіршуючи їх відновлення.

У сукупності рівні СРБ, які залишаються підвищеними у групі К/ЧГЕ впродовж 48 год після оперативних утручань, зазвичай вважаються діагностичними для поточних запальних реакцій і відображають не наявність генералізованого запалення, а скоріше ступінь стимуляції гострого, посиленого (корисного) запалення. Вищі рівні СРБ у тварин групи ТУ/ЧГЕ впродовж всього експерименту можуть бути показником неефективних або пригнічених процесів, за допомогою яких пСРБ перетворюється на мСРБ. Якщо мСРБ не утворюється, запалення не може посилитися до його гострої фази, що призводить до стійкої хронічної реакції та патологічних ускладнень [166].

Результати досліджень засвідчують підвищення концентрація прокальцитоніну в сироватці крові здорових щурів, яким проводили часткову гепатектомію (К/ЧГЕ), лише протягом 48 год після резекції 2/3 печінкової тканини порівняно зі значеннями контролю. Водночас у щурів групи ТУ/ЧГЕ аж до 168 год (7 день експерименту) відстежується зростання рівня даного показника (рис. 3.11). У період праймінгу (24 год) та під час активної проліферації клітин за умов репаративної регенерації (48 год) нами зареєстровано значно інтенсивніше зростання вмісту прокальцитоніну в сироватці крові щурів групи ТУ/ЧГЕ (рис. 3.11). Встановлений факт, ймовірно, слугує відображенням значно важчих постопераційних пошкоджень паренхіми печінки та вказує на вищу чутливість органу до розвитку гострого

ураження після введення токсичних доз медикаментозного ксенобіотику – ацетамінофену.

Цитокін-активовані макрофагами продукують РСТ ще на початкових стадіях розвитку прозапальних станів, взаємодіючи з ендотеліальними клітинами.

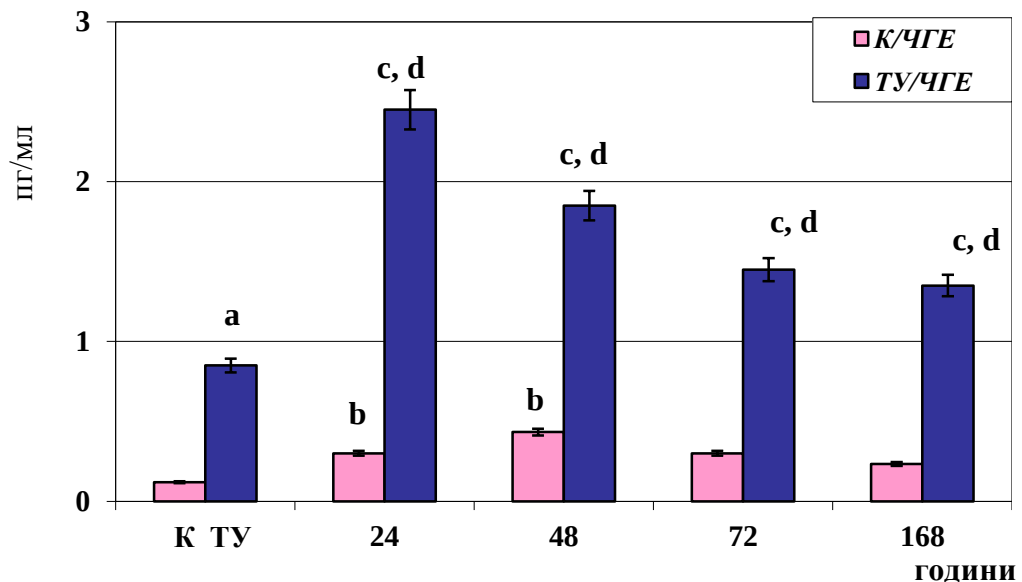


Рис. 3.11. Рівень прокальцитоніну в сироватці крові щурів за умов репаративної регенерації після часткової гепатектомії

За дії довготривалої концентрації прозапальних цитокінів у крові посилене утворення прокальцитоніну відбувається в паренхіматозних клітинах різних органів, зокрема, печінці, легенях, тонкому кишечнику, надниркових залозах нирках, що супроводжується збільшення концентрації РСТ у сироватці крові в від 10 до 100 тисяч разів [167].

Існує декілька потенційних причин підвищення рівня прокальцитоніну, зареєстровані за умов прогресуючих захворювань печінки. Ендотоксин – ліпополісахарид зовнішньої клітинної мембрани в грамнегативних бактерій – може розпізнаватися Toll-подібним рецептором господаря. Це трансмембранний рецептор, який експресується в різних імунних клітинах, зокрема нейтрофілах, моноцитах, макрофагах та дендритних клітинах. Після активації ці клітини виробляють медіатори запалення (наприклад, фактор

некрозу пухлини- α та інтерлейкін-6, -8, -10), що супроводжується індукцією запальних процесів.

Наприклад, після трансплантації печінки у пацієнтів ендogenous токсини мають здатність надходити в кровоплин через кишечник, внаслідок чого підвищується їх рівень в сироватці крові. При цьому спроможність печінки до детоксикації після трансплантації знижується, що слугує причиною продукування значної кількості прокальцитоніну. Як зазначено в літературі [168] внаслідок пошкодження кишкового бар'єру при виникненні цирозу печінки печінкової недостатності пацієнти також зазнають розвитку ендотоксемії, що ініціює підвищення синтезу прокальцитоніну.

Необхідно відмітити, якщо що в групі інтактних щурів (К/ЧГЕ) концентрація прокальцитоніну на 168 год регенераційного процесу практично відповідає значенням контролю (група К), то в тварин із ацетамінофен-індукованим ураженням рівень даного показника перевищує значення групи ТУ впродовж експерименту (рис. 3.11). Проте, враховуючи здатність печінки до регенерації, необхідно мати на увазі не лише відновлення гемостату, але й з можливості здійснювати функціональне навантаження, що забезпечує гомеостазну підтримку в організмі.

Відомо, ушкодження печінки супроводжується загибеллю значної маси паренхіматозних та непаренхіматозних печінкових клітин, в процесі чого вивільняються в процесі DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). Ці структури через спеціальні сенсорні та ефекторні клітини мають здатність вивільняти медіатори та біомаркери, таким чином проявляючи вплив на функції даного органу. Даний процес не є специфічним для печінки., тому що DAMP індукують аутоімунну відповідь або імунну толерантність через рецептори розпізнавання, які знаходяться на патогенах. Коли відбувається активація шляху DAMP/молекулярних структур при взаємодії з патогенами, це може призвести до розвитку системного запалення. Високі рівні інтерлейкінів-6 та -8, а також TNF- α підтверджують наявність системної запальної реакції. Водночас зростання рівня TNF- α супроводжується

індукцією прокальцитоніну [169]. Тому розвиток запальної реакції при пошкодженні клітин печінки може корелювати між показниками прокальцитоніну та ступенем тяжкості патологій печінки. Це може в певній мірі пояснити механізм підвищення рівня прокальцитоніну у пацієнтів з печінковою недостатністю після часткової непатектомії.

Отже, незначне зростання вмісту прокальцитоніну в сироватці крові інтактних щурів після ЧГЕ відбувається впродовж початкової стадії (24 год) та період проліферації (48 год) репаративної регенерації, тоді як у тварин із ацетамінофен-індукованим ураженням після ЧГЕ високі рівні даного біомаркера зареєстровано протягом всього експерименту.

ВИСНОВКИ

1. Токсичне ураження ацетамінофеном на тлі аліментарної нестачі протеїну супроводжується максимальним підвищенням рівня С-реактивного білка та прокальцитоніну в сироватці крові, що можна розглядати як прогностичні біомаркери системної запальної реакції за даних експериментальних умов.

2. Токсичне ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну призводить до гіперпродукції фактора некрозу пухлини-альфа, інтерлейкіну-6, інтерлейкіну-10 та інтерлейкіну-8 в сироватці крові щурів.

3. У групі інтактних щурів після ЧГЕ рівень цитокінів TNF- α , IL-6 та IL-10 зростає лише на початковій стадії (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год), що можна розглядати як активну запальну відповідь після оперативного втручання для переведення гепатоцитів в активну фазу клітинного циклу. У групі щурів ТУ/ЧГЕ стимуляція синтезу даних цитокінів впродовж всього експерименту вказує на некерований процес регенерації печінки внаслідок чого порушення архітекτονіки органу може призвести до формування фіброзних тяжів.

4. У сироватці крові інтактних щурів після ЧГЕ незначне зростання вмісту С-реактивного білка та прокальцитоніну відбувається лише впродовж 48 год регенеративного процесу, тоді як у тварин із токсичним ураженням після ЧГЕ високі рівні даних показників впродовж всього експериментального періоду можуть слугувати маркерами посиленої та некерованої системної запальної реакції у щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії.