

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

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

**НЕІНВАЗИВНІ МАРКЕРИ ФІБРОЗУ У ТВАРИН ЗА УМОВ
ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ НА ТЛІ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ**

Дипломна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А група

Кобилянська Богдана Володимирівна

Керівник:

кандидат біологічних наук

доцент **Волощук О.М.**

До захисту допущено:

Протокол засідання кафедри № ____

від „____” _____ 2023 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена визначенню неінвазивних маркерів фіброзу, а саме S-індексу та APRI-індексу у тварин за умов токсичного ураження ацетамінофеном та аліментарного дефіциту протеїну.

Встановлено, що у тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, показники відносної маси печінки, APRI та S-індексів не відрізняються від контролю. Водночас у тварин, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном, спостерігається підвищення відносної маси печінки та достовірне підвищення APRI та S-індексів. Проте результати APRI та S-індексів не досягають критичних значень, котрі дозволяють виявити фіброз та діагностувати його мінімальний рівень. Отже, гостре токсичне ураження ацетамінофеном за умов повноцінного харчування не викликає фіброзні зміни у печінці тварин.

Встановлено, що у тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні з подальшим моделюванням токсичного ураження, отримані значення APRI-індексу вказують на наявність фіброзних змін, проте виключають значний фіброз. Показник S-індексу перевищує значення, які свідчать про мінімальний фіброз у тварин. Отримані результати свідчать про формування незначних фіброзних змін у частини тварин з інтоксикацією ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Ключові слова: ацетамінофен, аліментарний дефіцит протеїну, печінка, фіброз, APRI-індекс, S-індекс, відносна та абсолютна маси печінки.

ABSTRACT

Bachelor's thesis dedicated to determination of non-invasive fibrosis markers, such as S-index and APRI-index in animals under conditions of toxic damage caused by acetaminophen and alimentary deficiency of protein.

It is established that in animals that were on a low-protein diet, indicators of relative liver weight, APRI and S-index do not differ from the control sample. At the same time, animals that were on a balanced diet with modelled toxic damage by acetaminophen have increase of relative liver weight and a significant increase in APRI and S-indexes. However, the results of APRI and S-indexes do not reach critical values that allow to detect fibrosis and diagnose its minimum level. Therefore, acute toxic damage with acetaminophen under conditions of adequate nutrition does not cause fibrotic changes in the liver of animals.

It was established that in animals kept on a low-protein diet followed by simulation of toxic damage, the obtained APRI-index values indicate the presence of fibrotic changes, but exclude significant fibrosis. The S-index value exceeds the values that indicate minimal fibrosis in animals. The obtained results indicate the formation of minor fibrotic changes in some animals with acetaminophen intoxication against the background of dietary protein deficiency.

Key words: acetaminophen, dietary protein deficiency, liver, fibrosis, APRI-index, S-index, relative and absolute liver weights.

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

Б.В. Кобилянська

(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Особливості метаболічних процесів за умов низькопротеїнового раціону	7
1.2 Роль печінки у метаболічних перетвореннях ацетамінофену.....	13
1.3 Загальна характеристика, стадії та особливості розвитку фіброзу.....	18
1.4 Неінвазивні маркери фіброзу та їх класифікація.....	24
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	28
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	32
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	37
ДОДАТКИ.....	41

Вступ

Ацетамінофен (парацетамол, N-ацетил-пара-амінофенол; АРАР) є найпоширенішим безрецептурним жарознижуючим і болезаспокійливим препаратом у всьому світі. АРАР входить до складу багатьох ліків, окремо або в комбінації з іншими активними компонентами. Вважається, що АРАР добре переноситься в терапевтичних дозах з мінімальними побічними ефектами. Однак передозування АРАР може спричинити серйозне пошкодження різних органів, зокрема печінки [1]. Одним із проявів ушкоджень печінки є фіброз.

Фіброз – це надмірне накопичення протеїнів позаклітинного матриксу, включаючи колаген. Поширений фіброз печінки призводить до цирозу, печінкової недостатності та портальної гіпертензії та часто вимагає трансплантації печінки. Активовані зірчасті клітини печінки (HSC), портальні фібробласти та міофібробласти кісткового мозку були ідентифіковані як основні клітини, що виробляють колаген, у пошкодженій печінці. Ці клітини активуються фіброгенними цитокінами, такими як TGF- β 1, ангіотензин II і лептин [2]. Враховуючи те, що печінка виконує важливі функції, зокрема захисну, аміакдетоксикуючу, синтетичну, жовчоутворюючу, то наслідком ураження печінки може бути порушення її функціональної активності.

На сьогодні "золотим стандартом" діагностики фіброзу є біопсія печінки, але застосування цього методу є складним у виконанні та має певні обмеження: наявність асцити, печінкової недостатності, також можливі ускладнення (кровотечі), «помилки попадання», відмова хворого від проведення процедури. Тому існує потреба в надійних, простих і неінвазивних методах оцінки фіброзу печінки. Одним із неінвазивних методів діагностики є визначення біомаркерів у сироватці крові. Неінвазивні біомаркери фіброзу можна розділити на два класи. Маркери класу I є прямими сироватковими маркерами, що відображають обмін ЕСМ та фіброгенні зміни на клітинному рівні в печінці. Маркери фіброзу класу II –

це непрямі сироваткові маркери, засновані на алгоритмах і математичній моделі різної складності та отримані на основі змін функції печінки. До біомаркерів класу II належать розрахункові індекси, які є швидкими та зручними у практичній діагностиці – S- та APRI-індекси [3].

Мета роботи – розрахувати неінвазивні маркери фіброзу печінки за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

Для досягнення мети були поставлені **завдання**:

1. Визначити відносну та абсолютну маси печінки за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.
2. Розрахувати APRI та S-індекси як неінвазивні маркери фіброзу за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Особливості метаболічних процесів за умов низькопротеїнового раціону

Харчові протеїни виконують широкий спектр біологічних функцій. З поживної точки зору вони є важливими джерелами амінокислот і можуть забезпечувати енергією організм. Традиційно їх функцію та якість оцінюють насамперед за здатністю забезпечувати організм необхідними амінокислотами та підтримувати синтез білка [4].

Споживання білків викликає адаптаційні реакції в процесі травлення, витратах енергії та метаболізмі, які знаходяться під гомеостатичним контролем. Гіпотеза «використання білка» передбачає, що споживання білка суворо регулюється у тварин, зокрема щурів, мишей і людей. Збільшення кількості білка в раціоні зменшує споживання вуглеводів і жирів з подальшим зниженням споживання енергії. Є вагомі докази того, що дієти з високим вмістом білка сприяють зниженню ваги та покращують глікемічний контроль. Тобто зменшення кількості білків в їжі збільшує загальні енергетичні потреби через надмірне споживання вуглеводів і ліпідів, намагаючись задовольнити потребу організму в білках. У відповідності до цього було встановлено, що дієти з помірним дефіцитом білка викликають гіперфагію у гризунів і в деяких, але не у всіх дослідженнях, на людях. Водночас суворе обмеження білків нижче певного порогу призводить до зменшення споживання їжі у гризунів [5].

Однак мало відомо про основні механізми, за допомогою яких помірний дефіцит білка викликає поведінкові та метаболічні адаптації, сприяє позитивному енергетичному балансу з подальшою схильністю до ожиріння та інших метаболічних розладів. Вважається, що гіперфагічні ефекти дієт з помірно низьким вмістом білка виникають через кілька механізмів. До них відносяться дисбаланс концентрацій амінокислот у плазмі

крові та мозку щурів, модуляція енергетичних сигналів у гіпоталамусі та передній грушоподібній корі у щурів.

Дієти з низьким вмістом протеїнів також збільшують витрати енергії у гризунів, однак механізми, що лежать в основі, недостатньо вивчені. Потенційні механізми включають посилений симпатичний потік через β -адренергічний рецептор (β -AR), який передає сигнал до бурої жирової тканини з подальшою регуляцією експресії мітохондріального білка-1 (UCP1), а також збільшення фактора росту фібробластів 21 (FGF21). Однак, відносна важливість цих механізмів і те, чи сигнали, отримані з кишечника, пов'язані з гіперфагією та термогенезом, викликаними низьким вмістом протеїнів, здебільшого невідомі [6].

Ентероендокринні клітини кишечника виділяють кілька гормонів, включаючи пептид YY (PYY), який, як вважають, відіграє роль в анорексигенних ефектах дієт з високим вмістом білка. Показано, що крім цих гормонів, кишковий серотонін, який становить понад 95% серотоніну в організмі, викликає ожиріння, частково через знижений термогенез бурого жиру. В той же час отриманий із мозку серотонін індукує термогенез бурого жиру. Вплив серотоніну опосередковується декількома підтипами рецепторів, з яких рецептори 5-гідрокситриптаміну (5HT₃) опосередковують гіпофагічну дію вуглеводів і ліпідів. Невідомо, чи рецептори 5HT₃ впливають на енергетичний баланс дієти з низьким вмістом білка.

Окрім модуляції споживання та витрати енергії, помірне обмеження білка у раціоні щурів і мишей постійно асоціювалося зі змінами складу тіла, включаючи зменшення нежирової маси, збільшення вмісту жиру в організмі та розвиток ожиріння печінки. Щури з обмеженим споживанням білка намагались відновити масу тіла та жирові запаси після повторного годування на стандартній білковій дієті. Однак, менше відомо про тимчасові зміни в складі тіла, споживанні та витраті енергії після переведення тварин з обмеженим вмістом білка на стандартні білкові дієти.

Показано, що вплив низькопротеїнової дієти на витрати енергії опосередковується через посилену серотонінергічну та β -AR сигналізацію з супутньою регуляцією ключових термогенних маркерів у бурій жировій тканині та скелетних м'язах. Крім того, на відміну від зменшення сухої маси та збільшення ліпідозу печінки, що спостерігалось при білковому голодуванні, помірний дефіцит білка сприяв збільшенню маси тіла та жирових резервів [5].

Виявлено, що у периферичних тканинах у схильних до ожиріння щурів ізокалорійні дієти з градуйованими дозами білків спричиняють різний вплив на енергетичні потреби, амінокислотний склад в плазмі крові, концентрацію гормонів, а також метаболічні реакції. По-перше, безбілкова дієта (0% протеїнів, 0P) викликала зменшення енергетичних потреб та збільшила використання енергії. Водночас дієта з дуже низьким вмістом білка (5% протеїнів, 5P) збільшувала енергетичні потреби та витрату енергії. Дієта з помірно низьким вмістом білків (10% протеїнів, 10P) збільшувала енергетичні потреби без змін у витратах енергії. Під час переходу на контрольну дієту (15% протеїнів, 15P) у групи тварин, яка була на безбілковій дієті (0P) спостерігалася анорексія та збільшення витрат енергії. По-друге, посилення серотонінергічної та симпатичної передачі сигналів опосередковує диференціальний вплив дієт з низьким вмістом протеїнів на енергетичний баланс. Однак збільшення витрат енергії, ймовірно, опосередковується паралельними або взаємозалежними механізмами, оскільки велика кількість мРНК ключових термогенних маркерів у бурій жировій тканині (β 2-AR, β 3-AR, PGC1- α , UCP1, FGF21, β -Klotho, SERT, TRH1) і скелетних м'язів (PGC1- α , FGF21, іризин) зростала із зменшенням ступеня споживання білків. По-третє, споживання безпротеїнової дієти та дієти з дуже низьким вмістом білка супроводжується зниженням концентрації в плазмі крові кількох незамінних амінокислот, анорексигенних гормонів (PYY, лептину, інсуліну) та зростанням концентрації метаболічного гормону FGF21.

Окрім того, дефіцит протеїнів виявляв різний вплив на вагу та склад тіла. Під час обмеження протеїнів вага тіла, жир і нежирна маса зменшувались в 0P групі тварин. Підвищений вміст ліпідів печінки в 0P і 5P групах підтверджувався збільшенням кількості мРНК ключових ліпогенних маркерів (CD36, FAS) і реципрокним зниженням кількості ліполітичного білка (HADH). Таким чином, ці дані демонструють, що дефіцит харчового білка по-різному модулює енергетичний баланс і метаболізм у тварин.

Гіпофагічний ефект безпротеїнової дієти та гіперфагічний ефект дієт з дуже низьким і помірно низьким вмістом білка в поточному дослідженні узгоджуються з гіпотезою «протеїнового важеля», а також з попередніми дослідженнями щодо обмеження білка у щурів, мишей і людей [7].

Крім того, обмеження білка спричиняло дозозалежне зниження вмісту більшості незамінних амінокислот. Цікаво, що рівень аргініну, серину та гліцину збільшувався при супутній анорексії в групі тварин на безпротеїновій дієті. Відсутність білків у харчуванні викликало зниження у плазмі концентрації PYY та GIP, частково через споживання меншої кількості їжі тваринами цієї групи; отже, малоймовірно, що ці гормони опосередковують анорексійні ефекти безбілкових дієт. Попередні дослідження показали, що кишкова серотонінергічна передача сигналів на периферичних рецепторах 5HT₃ опосередковує гострі гіпофагічні ефекти харчових вуглеводів у щурів [4].

Продемонстровано, що ондансетрон, селективний антагоніст рецептора 5HT₃, збільшував енергетичні потреби у щурів, яких годували ізокалорійними дієтами, що містили 0%, 5% і 10% білка з 67%, 62% і 57% вуглеводів відповідно. Таким чином, оскільки кишечник є основним джерелом (~95%) серотоніну, посилене утворення ендogenous серотоніну переважно кишкового походження, що діє через рецептори 5HT₃, опосередковує вплив дієти з низьким вмістом білка на енергетичні потреби [8].

Потрібно відмітити, що вплив протеїнової дієти на метаболізм глюкози залежить від амінокислотного складу, кінетики перетравлення білків і утилізації амінокислот у шлунково-кишковому тракті. При споживанні з вуглеводами дієтичні білки знижують глікемічні реакції. Амінокислоти, що вивільняються з білків, мають як прямий (опосередкований субстратом), так і непрямий (опосередкований гормонами) вплив на метаболізм глюкози [9].

Підвищення рівня амінокислот у плазмі крові збільшує секрецію інсуліну і, отже, змінює метаболізм глюкози в печінці. Аргінін і амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (BCAA), лейцин відомі як найпотужніші амінокислоти, що стимулюють вивільнення інсуліну підшлунковою залозою і, отже, знижують концентрацію глюкози в плазмі. Лейцин також стимулює внутрішньоклітинну передачу сигналів інсуліну в м'язах і жировій тканині.

Крім того, вміст кетогенних і глюкогенних амінокислот у білках відображає їх вплив на глюконеогенез і, як наслідок, утилізацію глюкози. Швидкість перетравлення білків також є фактором, що впливає на метаболізм глюкози.

На молекулярному рівні відносний дефіцит амінокислот призводить до накопичення незарядженої цитоплазматичної тРНК, яка зв'язується з загальною недепресованою серин/треонін-протеїнкіназою (GCN2), яка, у свою чергу, фосфорилує еукаріотичний фактор ініціації трансляції α (eIF2 α), що призводить до активації фактора транскрипції 4 (ATF4) [10].

Крім того, GCN2 через інші посередники інактивує mTORC1, що призводить до дефосфорилювання 4E-зв'язуючого білка (4EBP1) для інгібування синтезу білка. У відповідності з цими дослідженнями, які здебільшого проводилися *in vitro* та з амінокислотами, виявлено, що подібний шлях формування дефіциту харчового білка також діє в печінці для підвищення експресії печінкового FGF21 [11].

Показано, що подібні шляхи сприйняття амінокислот також посилюються в дванадцятипалій кишці. Це може свідчити про те, що

кишечник може виявляти дефіцит білка раніше, ніж печінка, і відчуття в кишечнику може служити сигналом для посилення реакції печінки на обмеження споживання білка. Дефіцит амінокислот викликає швидку реакцію анорексії, яка запускається передачею сигналів GCN2 у корі головного мозку [12].

Дієти з дуже низьким вмістом білка (1% і 2,5% білка), незалежно від вмісту жиру в їжі, призводили до різкої втрати маси тіла та жиру. Ця втрата жиру викликала зниження рівня лептину та стимуляції канонічного гіпоталамічного сигнального шляху голоду. Проте миші зменшували споживання їжі та не показали гіперфагії, коли їх перевели на дієти з 20% білка. Показано, що передача сигналів лептину не змінюється при введенні екзогенного лептину. Аналіз RNA-seq вказав на інгібування гіпоталамічного шляху mTOR.

Таким чином, дієти з дуже низьким вмістом білка зменшують споживання їжі, незважаючи на зниження циркулюючого лептину та стимуляцію шляхів відчуття голоду, оскільки інгібування mTOR діє за цими шляхами в гіпоталамусі. Навпаки, інгібування сигнальних шляхів eIF2a, TRPML1 і Fgf21 не було пов'язане з втратою ваги, спричиненою низьким вмістом білка [13].

Показано, що зменшення споживання протеїнів або загальної кількості амінокислот знижує рівень глюкози в крові натщесерце та покращує толерантність до глюкози менш ніж за шість тижнів, а також зменшує ІМТ та жирову масу у людей, зменшує збільшення ваги та жирової маси у молодих мишей. Помірне зниження загального харчового білка/амінокислот збільшує циркулюючий FGF21 в обох видів так само ефективно, як і більш суворі форми обмеження білка [6].

Встановлено, що змінена якість харчування, точний амінокислотний склад раціону регулює метаболічний стан. Зокрема, зменшення трьох амінокислот з розгалуженим ланцюгом (лейцину, ізолейцину та валіну) до однакового рівня було достатнім для покращення багатьох аспектів

метаболічного здоров'я, включаючи толерантність до глюкози та структуру тіла. Три амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (ВСАА) роблять унікальний внесок у загальний вплив дієтичного обмеження білка на толерантність до глюкози, оскільки зменшення споживання інших шести незамінних амінокислот є недостатнім для покращення толерантності до глюкози. Це також чітко демонструє, що вплив ВСАА на гомеостаз глюкози не залежить від зміни складу тіла, оскільки дієти зі зниженим вмістом трьох ВСАА або інших шести незамінних амінокислот мають подібний вплив на склад тіла [14].

Примітно, деякі інші дослідження показали, що дієта з низьким вмістом білка покращує метаболічний стан завдяки високому співвідношенню вуглеводів до низького вмісту білка [8]. Виявлено, що знижене споживання ВСАА покращує метаболічний стан навіть за відсутності суттєвих змін у співвідношенні вуглеводи/білки у раціоні. Цікавим залишається питання, чи є дієта з низьким вмістом амінокислот з розгалуженим ланцюгом, як і дієта з низьким вмістом протеїнів, найефективнішою для сприяння метаболічному здоров'ю.

1.2. Роль печінки у метаболічних перетвореннях ацетамінофену

Ацетамінофен (парацетамол, N-ацетил-пара-амінофенол; АРАР) є найпоширенішим безрецептурним жарознижувачем і безпечним препаратом у всьому світі. АРАР входить до складу багатьох ліків, окремо або в комбінації з іншими активними компонентами [1].

Після перорального прийому ацетамінофен легко всмоктується зі шлунково-кишкового тракту. Він метаболізується шляхом глюкуронізації та сульфатації в печінці. На глюкуронізацію припадає 55-66 % метаболізму парацетамолу, у той час як на сульфатацію припадає від 20% до 30% метаболізму парацетамолу у дорослих [15].

АРАР потрапляє в печінку через печінкові порталні вени, де протікає через синусоїди в напрямку центральної вени. Синусоїди вистилають

гепатоцити, які поглинають приблизно 95 – 98% АРАР, тоді як приблизно 2 – 5% препарату виводиться з організму із сечею в незміненому вигляді [16].

Ацетамінофен метаболізується шляхом кон'югації з сульфатом і глюкоронідатом, які є інертними і виводяться з сечею. Залежно від дози, частина АРАР перетворюється на високореактивний токсичний проміжний продукт, N-ацетил-пара-бензохінонімін (NAPQI) за допомогою кількох цитохромів Р450. Значні кількості NAPQI ефективно виводяться шляхом кон'югації з глутатіоном (GSH). Приблизно 47-62% абсорбованого ацетамінофену виводиться у вигляді глюкуроніду, тоді як 25-36% виводиться у вигляді сульфату парацетамолу. Проте лише 1-4% ацетамінофену виводиться з сечею в незміненому вигляді. У результаті метаболізму парацетамол кон'югується з глутатіоном і виводиться із сечею у вигляді метаболітів цистеїну та меркаптурату.

Однак після великої дози АРАР реакція сульфування стає насиченою, і висока концентрація NAPQI виснажує GSH у печінці, викликаючи подальше накопичення NAPQI. Некон'югований NAPQI зв'язується з білками та субклітинними структурами й індукує швидку загибель клітин і некроз, що може призвести до печінкової недостатності [17].

Деякі дослідження показали, що ураження печінки є результатом зв'язування N-ацетил-пара-бензохіноніміну (NAPQI) з клітинними білками та ініціювання пероксидного окислення ліпідів. У великих кількостях печінкова ферментна система цитохрому Р450 метаболізує парацетамол до реактивного метаболіту N-ацетил-пара-бензохіноніміну.

NAPQI є сильним окислювачем і сприяє пероксидному окисленню ліпідів і пошкодженню макромолекул. Крім того, метаболіт може одночасно посилювати утворення АФК, таких як супероксидного аніон радикалу, гідроксил радикалу та пероксиду водню, активних радикалів азоту, таких як оксид азоту. Цей мінорний метаболіт зазвичай нешкідливий, оскільки він в основному кон'югований з глутатіоном і виводиться з жовчю. Однак навіть при таких низьких терапевтичних дозах відбувається дуже обмежена реакція

з сульфгідрильними групами білка, що призводить до ковалентного зв'язування та утворення білкового адукту [18].

Лише тоді, коли рівень АРАР високий, відбувається надлишкове утворення реактивного метаболіту NAPQI, що в свою чергу викликає виснаження запасів відновленої і окисленої форм глутатіону.

Швидкість відновлення GSH може суттєво вплинути на пошкодження, оскільки індукція глутамат-цистеїнової лігази, яка корелює з швидшим відновленням GSH, є одним із механізмів, за допомогою яких самки мишей захищені від АРАР-індукованого пошкодження печінки [15]. Виснаження глутатіону після низької дози АРАР (150 мг/кг) відбувається паралельно з підвищенням вмісту аналога глутатіону – офтальмічної кислоти, де SH-група залишку цистеїну GSH замінюється групою CH_3 з 2-амінобутирату. Коли відбувається виснаження глутатіону, спостерігається посилення реакції NAPQI з сульфгідрильними групами білків з утворенням білкових аддуктів [17].

Вважається, що АРАР добре переноситься в терапевтичних дозах з мінімальними побічними ефектами. Однак передозування АРАР може спричинити серйозне пошкодження печінки, яке прогресує до гострої печінкової недостатності (ГПН) і смерті. Токсичність, спричинена передозуванням АРАР, може виникнути як наслідок гострого або повторного/поступового передозування протягом короткого періоду часу. На даний момент передозування АРАР є головною причиною ГПН у західному світі, на яку припадає майже 50% усіх випадків ГПН у Сполучених Штатах і 60% у Сполученому Королівстві [1].

Ключову роль у пошкодженні печінки АРАР є цитохром P450 2E1 (CYP2E1), фермент, який каталізує окислення АРАР до NAPQI. Дійсно, NAPQI є високореактивним метаболітом, який викликає мітохондріальну дисфункцію, надлишкове продукування АФК і активацію c-jun N-кінцевої кінази (JNK), що згодом призводить до виснаження АТФ і масивного гепатоцелюлярного некрозу. Важливо, що мітохондріальний CYP2E1 може

відігравати важливу роль у АРАР-індукованій цитотоксичності. Нарешті, CYP3A4 (відомий як CYP3A2 у щурів і CYP3A11 у мишей) і CYP1A2 також можуть відігравати роль у перетворенні АРАР на NAPQI, хоча в меншій мірі, ніж CYP2E1 у нормальних фізіологічних умовах [19].

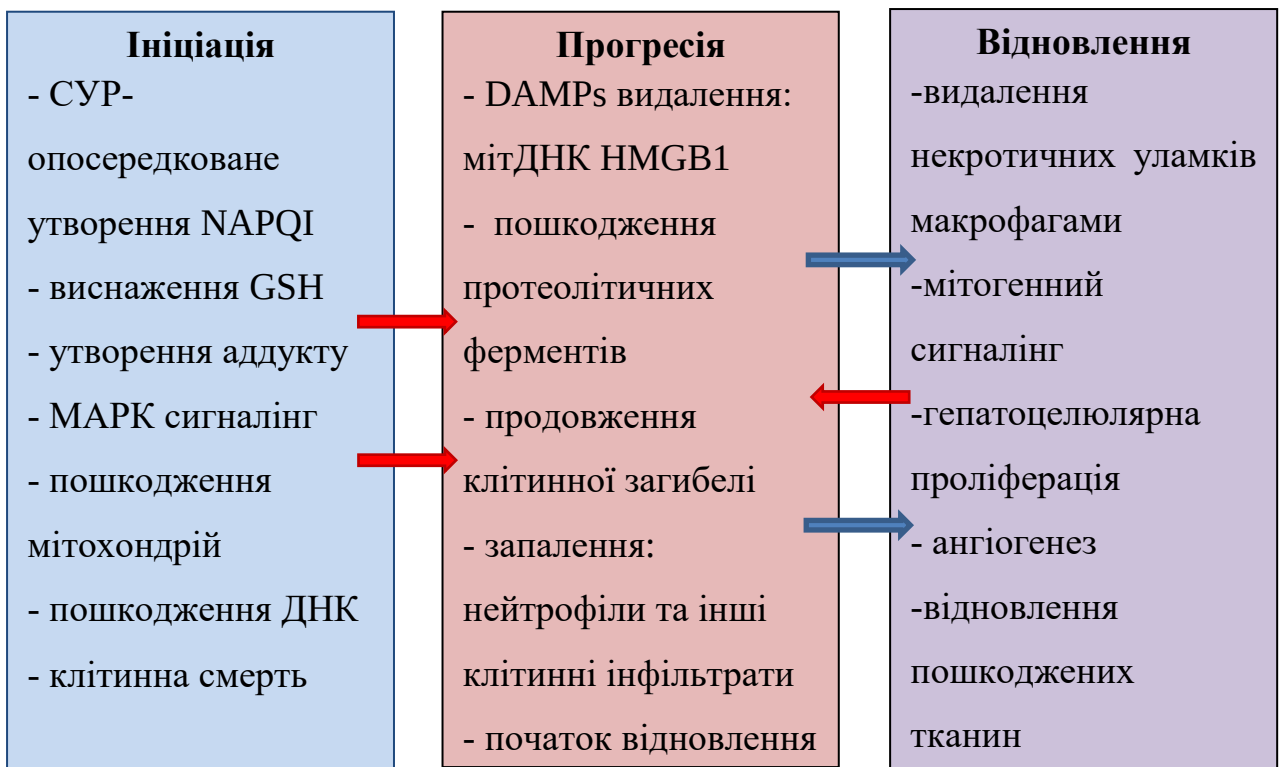


Рис. 1 Три фази ураження печінки ацетамінофеном (N-ацетил-пара-амінофенол; АРАР) [1]

Початкова генерація АФК у мітохондріях посилюється низкою внутрішньоклітинних сигнальних подій, включаючи активацію N-кінцевої кінази c-Jun, що призводить до порушення проникності мембран мітохондрій і вивільнення ендонуклеаз, які викликають пошкодження ДНК. Усі ці події в кінцевому підсумку призводять до гепатоцелюлярного некрозу [20].

Під час фази прогресування початкове гостре ураження печінки далі розвивається за допомогою позаклітинних механізмів, які не зовсім зрозумілі. Некротичні клітини вивільняють молекулярні структури, пов'язані

з пошкодженням, такі як білок блоку 1 високої мобільності та фрагменти ДНК, які спричиняють залучення запальних клітин (наприклад, нейтрофілів) і генерацію цитокінів, що зрештою призводить до стерильного запалення. Повідомляється, що стерильне запалення бере участь як у прогресуванні АРАР-індукованої гепатотоксичності, так і в її зникненні.

Вивільнення протеолітичних ферментів, таких як кальпаїни, з відмираючих гепатоцитів також може опосередковувати прогресування АРАР-індукованого ураження печінки шляхом пошкодження сусідніх гепатоцитів. Крім того, швидкість поповнення клітинних запасів GSH після початкового виснаження може вплинути на ступінь окисного пошкодження та змінити перебіг АРАР-індукованого ураження печінки [19].

Крім того, нещодавнє дослідження показало, що клітинний О-зв'язаний N-ацетилглюкозамін (O-GlcNA) може порушити регуляцію реакції поповнення запасів GSH у печінці. Фаза пошкодження гепатотоксичності АРАР згодом супроводжується фазою відновлення, під час якої починається компенсаторна гепатоцелюлярна проліферація; мертві клітини замінюються новоутвореними клітинами, що призводить до регенерації та відновлення печінки. У випадках, коли ініціюється потужна відповідь регенерації печінки, пошкодження печінки усувається, і функція печінки відновлюється спонтанно. У випадках, коли регенерація печінки не відбувається, початкове гостре ураження печінки може прогресувати до ураження з мультиорганною недостатністю та смертю.

Токсичність парацетамолу призводить до підвищення рівня аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази та концентрації білірубину в сироватці крові. Крім того, передозування препаратом призводить до підвищення рівня ферменту лужної фосфатази в сироватці крові. Передозування парацетамолом призводить до зниження рівня альбуміну та незначних змін активності гамма-глутамілтрансферази [1]. У щурів токсичність парацетамолу також проявляється аномальними гістологічними змінами в печінці, які залежать від дози. Повідомлялося, що

надмірне дозування парацетамолу викликає вакуолізацію, крововилив і некроз клітин печінки.

Отже, низка механізмів є пов'язаними з розвитком ураження печінки, включаючи розвиток окиснювального стресу, мітохондріальної дисфункції, надмірне утворення АФК, реактивних форм азоту, порушення енергетичного метаболізму.

1.3 Загальна характеристика, стадії та особливості розвитку фіброзу

Цироз і рак печінки наразі займають 11-те та 16-е місце серед найпоширеніших причин смерті у світі. У Латинській Америці цироз є 9-ю причиною смерті, що становить 2,7% від загальної кількості смертей. Надмірне вживання алкоголю є найчастішою причиною цирозу печінки у світі, іншими причинами є віруси, прийом ліків [21].

Фіброз печінки – це надмірне накопичення протеїнів екстрацелюлярного матриксу (ЕСМ), включаючи колаген, що виникає внаслідок хронічного пошкодження печінки. Основними причинами фіброзу печінки в промислово розвинутих країнах є зловживання алкоголем і неалкогольний стеатогепатит (НАСГ). Накопичення білків ЕСМ спотворює архітектуру печінки, утворюючи фіброзний рубець, а подальший розвиток вузликів регенеруючих гепатоцитів визначає цироз. Цироз печінки викликає гепатоцелюлярну дисфункцію та підвищений внутрішньопечінковий опір кровотоку, що призводить до печінкової недостатності та портальної гіпертензії відповідно.

Фіброз печінки є результатом регенерації печінки на повторне пошкодження. Після гострого ураження печінки (наприклад, вірусного гепатиту) клітини паренхіми регенерують і замінюють некротичні або апоптотичні клітини. Цей процес пов'язаний із запальною реакцією та обмеженим відкладенням ЕСМ. Якщо ураження печінки зберігається, то врешті-решт регенерація печінки припиняється, і гепатоцити замінюються

великою кількістю ЕСМ, включаючи фібрилярний колаген. Розподіл цього волокнистого матеріалу залежить від походження ураження печінки. При хронічному вірусному гепатиті та хронічних холестатичних розладах фіброзна тканина спочатку локалізується навколо портальних шляхів, тоді як при алкогольному ураженні печінки вона локалізується в перицентральної та перисинусоїдній областях. У міру прогресування фіброзних захворювань печінки відбувається прогресування захворювання від колагенових смуг до перехідного фіброзу і явного цирозу.

Фіброз печінки пов'язаний із серйозними змінами як кількості, так і складу ЕСМ. На пізніх стадіях печінка містить приблизно в 6 разів більше ЕСМ, ніж зазвичай, включаючи колагени (I, III і IV), фібронектин, ундулін, еластин, ламінін, гіалуронан і протеоглікани. Накопичення ЕСМ є результатом як збільшення синтезу, так і зниження деградації. Знижена активність MMP, що видаляє ЕСМ, головним чином зумовлена надмірною експресією специфічних інгібіторів металопротеїнази (TIMP). Зірчасті клітини печінки (HSC) є основними клітинами, що продукують ЕСМ у пошкодженій печінці. У нормальній печінці HSC знаходяться в просторі Діссе і є основними місцями зберігання вітаміну А. Після хронічного пошкодження HSC активуються або трансдиференціюються в міофібробластоподібні клітини, набуваючи скорочувальних, прозапальних і фіброгенних властивостей. Активовані HSC мігрують і накопичуються в місцях відновлення тканин, секретуючи велику кількість ЕСМ і регулюючи деградацію ЕСМ. Тромбоцитарний фактор росту (PDGF), який в основному продукується клітинами Купфера, є переважаючим мітогеном для активованих HSC. Синтез колагену в HSCs регулюється на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях. Підвищена стабільність мРНК колагену опосередковує підвищений синтез колагену в активованих зірчастих клітинах печінки. У цих клітинах посттранскрипційна регуляція колагену регулюється послідовностями в 3'-нетрансльованій області через РНК-зв'язуючий білок α CP2, а також структурою стовбурової петлі в 5'-кінці

мРНК колагену. HSC експресують ряд нейроендокринних маркерів (наприклад, рілін, нестин, нейротрофіни, синаптофізин і гліально-фібрилярний кислий білок) і несуть рецептори для нейромедіаторів. Неактивні HSC експресують маркери, характерні для адипоцитів (PPAR γ , SREBP-1c і лептин), тоді як активовані HSC експресують міогенні маркери (α гладком'язовий актин, c-myb і фактор енхансера міоцитів-2). Типи клітин печінки, відмінні від HSC, також можуть мати фіброгенний потенціал. Міофібробласти, отримані з дрібних портальних судин, проліферують навколо жовчовивідних шляхів при фіброзі печінки, індукованому холестазом, щоб ініціювати відкладення колагену. HSC і портальні міофібробласти відрізняються специфічними клітинними маркерами та відповіддю на апоптотичні стимули. Культура гемопоетичних стовбурових клітин CD34⁺CD38⁻ з різними факторами росту генерує HSC і міофібробласти, які походять з кісткового мозку, інфільтрують печінку людини під час ремоделювання тканин. Ці дані свідчать про те, що клітини, що походять з кісткового мозку, можуть бути джерелом фіброгенних клітин у пошкодженій печінці. Відносна важливість кожного типу клітин у фіброгенезі печінки може залежати від походження ураження печінки. Хоча HSC є основним типом фіброгенних клітин у перицентральных областях, портальні міофібробласти можуть переважати, коли ураження печінки відбувається навколо портальних трактів.

Під час печінкового фіброгенезу відбувається складна взаємодія між різними типами клітин печінки. Гепатоцити є мішенями для більшості гепатотоксичних агентів, включаючи віруси гепатиту, метаболіти алкоголю та жовчні кислоти. Пошкоджені гепатоцити вивільняють АФК і фіброгенні медіатори та індукують залучення лейкоцитів клітинами запалення. Апоптоз пошкоджених гепатоцитів стимулює фіброгенну дію міофібробластів печінки. Запальні клітини, лімфоцити або поліморфноядерні клітини, активують HSC для секреції колагену. Активовані HSC секретують хемокіни запалення, експресують молекули клітинної адгезії та модулюють активацію

лімфоцитів. Тому, ймовірно, виникне коло, в якому запальні та фіброгенні клітини стимулюють одна одну. На фіброз впливають різні субгрупи Т-хелперів, також клітини Купфера є резидентними макрофагами, які відіграють важливу роль у запаленні печінки, вивільняючи АФК і цитокіни. Зміни в складі ЕСМ можуть безпосередньо стимулювати фіброгенез. Колаген типу IV, фібриноген і активатор плазміногену типу урокінази стимулюють резидентні HSC шляхом активації латентних цитокінів, таких як TGF- β 1. Фібрилярні колагени можуть зв'язувати та стимулювати HSC через рецептор дискоїдинового домену DDR2 та інтегрини. Крім того, змінений ЕСМ може служити резервуаром для факторів росту та MMP [2].

1.3.1 Механістичні концепції фіброзу печінки

Загибель гепатоцитів є важливою початковою подією при всіх захворюваннях печінки. Мертві гепатоцити вивільняють внутрішньоклітинні сполуки, які називаються DAMP, які посилають сигнали про небезпеку навколишнім клітинам, включаючи HSC і клітини Купфера, і тому відіграють важливу роль у розвитку фіброзу та запалення. Ця родина молекул включає нуклеїнові кислоти, внутрішньоклітинні білки, аденозинтрифосфат (АТФ) або мітохондріальні, нуклеїнові сполуки, такі як High-Mobility Group Box-1 (HMGB1). DAMP можуть пасивно вивільнятися некротичними гепатоцитами внаслідок руйнування плазматичної мембрани. HMGB1 є одним із найбільш досліджених DAMP у контексті захворювань печінки. Це ДНК-зв'язуючий негістоновий ядерний білок, повсюдно експресований в еукаріотичних клітинах. HMGB1 активно вивільняється некротичними гепатоцитами як небезпечна молекула. Крім того, він може секретуватися стресовими клітинами та сприяти імунним реакціям і запаленню шляхом взаємодії з Toll-подібними рецепторами (TLR) 4 і 9. Крім того, авторами доведено, що HMGB1 безпосередньо активує HSC, регулюючи аутофагію HSC у моделі прогресування фіброзу печінки [22].

Перевантаження ліпідів у гепатоцитах є одним із основних чинників гепатотоксичності, що прискорює розвиток прогресуючого запалення,

окисного стресу та фіброзу. У печінці ліпіди в основному зберігаються у вигляді триацилгліцеролів, інертної та нецитотоксичної форми ліпідів. Ліпотоксичність швидше пов'язана з накопиченням токсичних проміжних продуктів синтезу триацилгліцеролів, таких як насичені вільні жирні кислоти (ВЖК) та їх похідні, накопиченням вільного холестеролу або комплексних ліпідів, таких як лізофосфатидилхолін і цераміди [23, 21]. Накопичення цих ліпідів впливає на клітинну функцію через різні механізми, включаючи окиснювальний і ендоплазматичний стрес ретикулуму, мітохондріальну дисфункцію та індукцію апоптозу [24]. Порушення регуляції метаболізму холестеролу в печінці також є ключовою подією, що призводить до загибелі гепатоцитів. Вільний холестерол викликає апоптоз і некротичну смерть гепатоцитів.

Авторами показано, що макрофаги відіграють центральну роль у запаленні та фіброзі печінки. Печінкові макрофаги включають печінкові резидентні клітини Купфера та моноцитарні макрофаги, що походять із кісткового мозку. Активація клітин Купфера та залучення макрофагів, отриманих з моноцитів, викликаються вивільненням DAMPs, виробництвом АФК, протівірусною відповіддю, а також метаболічною передачею сигналів, викликаною накопиченням жиру [22].

Виявлено, що окислювальний стрес (ОС) є ключовим процесом, що призводить до пошкодження печінки та ініціації фіброзу печінки. Це відповідає змінену балансу між клітинними прооксидантними та антиоксидантними факторами, що призводить до виробництва АФК та активних форм азоту (RNS). АФК утворюють родину профіброзних медіаторів, включаючи супероксиди, пероксид водню (H_2O_2) і гідроксильні радикали. Вони утворюються під час нормального клітинного метаболізму і, зокрема, під час окисного фосфорилування та пероксидного окислення ліпідів у гепатоцитах, HSC та макрофагах. На низьких рівнях АФК можуть слугувати вторинними месенджерами для активації різних клітинних реакцій. Однак при високих рівнях вони провокують руйнування клітинних

ліпідів, білків і ДНК і призводять до некрозу та апоптозу гепатоцитів. Крім того, АФК стимулюють вироблення прозапальних і профіброгенних факторів активованими HSC, клітинами Купфера та іншими прозапальними клітинами. Виробництво АФК посилюється етанолом, відкладенням заліза та хронічною вірусною інфекцією. НАДФН-оксидази (NOX) є основним джерелом АФК у печінці та опосередковують фіброгенні відповіді, індуковані ангіотензином II, PDGF і TGF- β у HSC і макрофагах. Фактор транскрипції NF- κ B відіграє ключову роль у регуляції загибелі клітин, запалення та загоєння ран і, отже, є важливим модулятором прогресування фіброзу печінки. Дійсно, декілька досліджень показали, що інгібування активності NF- κ B захищає від фіброзу печінки *in vivo*. Крім того, на відміну від тихих HSC, де активність NF- κ B пригнічена, міофібробласти демонструють високу активність NF- κ B, що свідчить про те, що активність NF- κ B пов'язана з проліферацією HSC. Відповідно до цього спостереження було продемонстровано, що активація клітин Купфера підвищує активність NF- κ B у HSC, що, у свою чергу, сприяє секреції прозапальних цитокінів [2].

1.3.2 Стадії фіброзу

Першу спробу напівкількісної системи оцінки хронічного гепатиту запропонували на початку 1980-х років. З тих пір були запропоновані інші методи оцінювання оцінок і стадій окремо, включаючи систему Шойера, систему Баттса-Людвіга, систему Ішака та систему METAVIR. Хоча існують незначні відмінності між різними системами для стадії фіброзу, основна концепція подібна : фіброз починається в портальних трактах, поширюється на суміжні портальні тракти та термінальні печінкові венули, що призводить до архітектурних спотворень і, зрештою, до цирозу. Незалежно від того, яка схема визначення стадії використовується для хронічного вірусного гепатиту, жирової хвороби печінки, жовчного холангіту та застійного фіброзу печінки, остаточна оцінка «стадія 4» стосується цирозу печінки для всіх систем. Система Laennec додатково класифікує ступінь цирозу печінки шляхом поділу METAVIR стадії 4 на стадії 4A, 4B і 4C на основі товщини

фіброзних перетинок і розміру вузликів на біопсії печінки. Стадія 4А характеризується легким цирозом (певним або ймовірним), де більшість перегородок тонкі. Стадія 4В – це помірний цироз печінки, який демонструє принаймні дві широкі фіброзні перегородки, тоді як стадія 4С відноситься до тяжкого цирозу, при якому присутня принаймні одна дуже широка перегородка або багато мікровузликів. Було продемонстровано, що ця система визначення стадій добре корелює з клінічною стадією цирозу, ступенем портальної гіпертензії та ризиком рецидиву гепатоцелюлярної карциноми після лікувальної резекції [25].

Бальна система Баттса-Людвіга використовується для визначення стадії фіброзу. Значення стадій коливаються від 0 до 4, стадіювання базується на наявності портального/перипортального фіброзу та утворення перегородок з/без цирозу, що відповідає стадії 4. Система Баттса-Людвіга також відома як модифікована система Шойера [26].

1.4 Неінвазивні маркери фіброзу та їх класифікація

Біопсія печінки вважається «золотим стандартом» для оцінки фіброзу печінки. Однак його інвазивність викликає біль і значні потенційні ускладнення, що призводить до поганого сприйняття пацієнтом. Існують певні обмеження проведення процедури: наявність асцити, печінкової недостатності, також можливі ускладнення (кровотечі), «помилки попадання», та відмова хворого від проведення процедури. Тому існує потреба в надійних, простих і неінвазивних методах оцінки фіброзу печінки [2].

Неінвазивні біомаркери фіброзу можна розділити на два класи. Маркери класу I є прямими сироватковими маркерами, що відображають обмін ЕСМ та/або фіброгенні зміни на клітинному рівні в печінці. Маркери фіброзу класу II – це непрямі сироваткові маркери, засновані на алгоритмах і математичній моделі різної складності та отримані на основі змін функції печінки.

- Клас I (прямі) біомаркери фіброзу печінки

Біомаркери класу I є прямими маркерами фіброзу та відображають молекулярний патогенез ЕСМ печінки. Основним джерелом фіброзу в печінці є зірчасті клітини печінки (HSC) і міофібробласти. Маркери класу I можна розділити на ферментативні маркери, маркери колагену (та споріднених), маркери глікопротеїнів і матриксних металопротеїназ, а також маркери глікозаміногліканів. З цих різних класів маркери, отримані з колагену, і глікозаміноглікани (гіалуронова кислота) виявилися найбільш широко використовуваними для розробки нових біомаркерів фіброзу. Небагато маркерів класу I використовуються в повсякденній клінічній практиці, оскільки вони в основному не корелюють безпосередньо з функцією цілої тканини або організму, а тому надають дані обмеженої клінічної цінності. Таким чином, їхній час виконання вищий, доступність обмежена переважно дослідницькими та спеціалізованими установами, а витрати на дослідження загалом збільшені порівняно з маркерами класу II. Іншим обмеженням є те, що маркери класу I не є ані печінковими, ані специфічними для печінки, тому вимірювання сироватки не завжди безпосередньо пов'язані з активністю печінки.

- II клас (непрямі) біомаркери фіброзу печінки

Біомаркери класу II забезпечують опосередковане відображення активності ЕСМ печінки та фіброзу шляхом вимірювання функції або пошкодження печінки. Оскільки ці тести відображають зміни у функції печінки та часто корелюють з ознаками та симптомами захворювання, вони добре відомі та регулярно використовуються в клінічній практиці як для діагностики, так і для моніторингу захворювань печінки. Широкий спектр функцій, які виконує печінка, включає термостаз, енергетичний баланс, вуглеводний, жировий і білковий обмін, гемокоагуляцію, метаболізм заліза і гемоглобіну, імунний баланс, виробництво жовчних кислот, очищення від токсинів. Таким чином, кількість біомаркерів класу II, які можна перевірити, є великою.

У повсякденній клінічній практиці серологічні дослідження функції печінки можна розділити на такі категорії:

– ферменти печінки, включаючи аланінамінотрансферазу (АЛТ), аспартатамінотрансферазу (АСТ), лужну фосфатазу (АЛФ) і гамма-глутамілтрансферазу (ГГТ).

– маркери синтетичної функції, такі як протромбіновий час (PT/INR), білірубін, гаптоглобін, альбумін, аполіпопротеїн A1, α 2-макроглобулін, церулоплазмін, трансферин і гепсидин.

– інші непрямо виміряні маркери, такі як кількість тромбоцитів, α 1-антитрипсин, феритин і певні адипокіни.

- Комбіновані або панельні неінвазивні біомаркери

Прості комбіновані тести широко використовують біомаркери класу II для непрямой оцінки фіброзу печінки. Найпростішим з них є співвідношення АСТ/АЛТ. Іншим простим тестом є індекс співвідношення AST до тромбоцитів (APRI), який використовує кількість тромбоцитів на додаток до AST для прогнозування фіброзу. Інші прості непрямі комбіновані маркери включають індекси PGA (протромбіновий час, γ -глутамілтрансфераза та аполіпопротеїн A1) і PGAA (PGA плюс α -2 макроглобулін), шкалу Pohl та індекс Форна.

Більш складні комбіновані біомаркери включають панель тестів або складні алгоритми, деякі з яких запатентовані для оцінки фіброзу печінки. До них належать Fibrotest/Fibrosure, Fibrometer і Hepascore. Оскільки ці тести зазвичай включають деякі маркери класу I, а також маркери класу II, вони мають підвищену діагностичну точність, однак це пов'язано з підвищенням вартості та зменшенням доступності тесту в деяких випадках, а також вимагає від лікаря більше часу та зусиль для обчислення та подальшої інтерпретації. Тим не менш, оскільки ці панелі продовжують удосконалюватися, вони набувають все більшого визнання в клінічній практиці, а великі поздовжні дослідження продемонстрували їх здатність передбачати прогноз і результати, пов'язані з печінкою.

Таким чином, пошуки ідеального неінвазивного серологічного біомаркера або комбінації маркерів для діагностики та прогнозування результатів фіброзу печінки тривають, і за останнє десятиліття було досягнуто значного прогресу. Тим не менш, ці дослідження залишаються недосконалими, особливо для виявлення проміжних ступенів фіброзу, і вимагають розумного використання, адаптованого до індивідуального випадку, і детального розуміння, щоб переконатися, що їх використання обґрунтоване. Оскільки ці дослідження продовжують удосконалюватися, потреба в постановці біопсії печінки з часом буде продовжувати зменшуватися [3].

В літературі показано, що модель APRI-індексу був розроблений як простий, легко розрахований метод прогнозування значного, важкого фіброзу (або цирозу печінки). Загалом, APRI має хорошу діагностику для прогнозування важкого фіброзу/цирозу або низький ризик значного фіброзу, але не дозволяє точно диференціювати проміжні стадії фіброзу від легкого або важкого фіброзу. Таким чином, лікарі повинні використовувати APRI в комбінації з іншими неінвазивними маркерами фіброзу, а не як єдиний метод визначення стадії [27, 28]. В залежності від значень APRI-індекса, визначають наявність та відсутність фіброзу, цирозу: $< 0,2$ – виключає фіброз; $\leq 0,3$ – виключає значний фіброз; $\leq 0,5$ – виключає цироз [29].

S-індекс – це проста математична модель, що містить рутинні лабораторні маркери, яка має вищу точність порівняно з APRI у прогнозуванні стадій значного фіброзу та цирозу печінки у пацієнтів із високим ступенем точності. В залежності від значень S-індекса, виділяють 4 стадії фіброзу: мінімальний фіброз (F1) – $\geq 0,02$; виражений фіброз (F2) – $\geq 0,5$; важкий фіброз (F3) – $\geq 0,6$; цироз (F4) – $\geq 1,5$ [28].

Отже, актуальним залишається питання використання неінвазивних маркерів фіброзу, а саме розрахункових індексів, оскільки вони є більш доступними і практичними у використанні.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти та методи досліджень

Дослідження проводились на білих безпородних щурах масою 120-160 г, віком 2,5-3 місяці. Всі маніпуляції з тваринами, які здійснювались в ході експерименту, відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і наукових цілей», та рекомендаціям VII Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах».

Моделювання токсичного ураження викликали пероральним введенням ацетамінофену з розрахунку 1250 мг на кг маси тварини у вигляді суспензії в 2 %-му розчині крохмального гелю 1 раз на день впродовж 2 діб.

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи:

I група – щури, які перебували на повноцінній напівсинтетичній дієті (К),

II група – щури, які перебували на низькопротеїновому раціоні (НПР),

III група – тварини з ацетомінофен-індукованим ураженням, які перебували на повноцінному раціоні (ТУ),

IV група – тварини, яким моделювали токсичне ураження на тлі утримання на низькопротеїновому раціоні (НПР/ТУ).

Експеримент тривав 28 діб, наприкінці всіх щурів виводили з експерименту за допомогою декапітації під легким ефірним наркозом.

Визначення відносної маси печінки

Відносну масу печінки розраховували за формулою [30]:

$$M_b = (M_a/M_t) \times 100, \text{ де}$$

M_a – абсолютна маса печінки, г;

M_t – маса тіла тварини, г.

Перед декапітацією кожного щура зважували і записували масу тіла, після того як здійснювали розтин і відділяли органи, зважували масу кожного органа, зокрема печінки.

Визначення S-індексу

S-індекс розраховували за формулою [31]:

$$\frac{1000 \times \text{GGT}(\text{МОд/л})}{\text{PLT}(10^9/\text{л}) \times \text{Albumin}^2(\text{г/дл})}, \text{ де}$$

GGT – активність гама-глутамілтранспептидази, МОд/л;

PLT – вміст тромбоцитів, $10^9/\text{л}$.

Визначення активності гама-глутамілтранспептидази

Принцип методу базується на накопиченні хромоген – *p*-нітроаніліну, який утворюється в ході ферментативної реакції, оптичну щільність вимірювали фотоелектроколориметрично при довжині хвилі 405 нм.

В пробірки – дослідні, холосту, калібрувальну, порівняльну проби додавали 0,5 мл робочого субстратного розчину, інкубували 5 хв при температурі плюс 37°C. Далі в дослідні проби додавали 0,05 мл сироватки крові, інкубували 15 хв при температурі плюс 37°C, після чого послідовно додавали: 0,025 мл калібратора в калібрувальну пробу, по 3,0 мл розчину оцтової кислоти в кожену пробу, 0,05 мл сироватки крові в холосту пробу, 0,025 мл дистильованої води в калібрувальну пробу і 0,05 мл в пробу порівняння. Витримували 5 хв при кімнатній температурі і вимірювали оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$) проти холостої проби, оптичну щільність калібрувальної проби ($E_{\text{кал.}}$) проти проби порівняння при довжині хвилі 405 нм.

Активність гама-глутамілтранспептидази розраховували за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 3,0, \text{ де}$$

C – активність гама-глутамілтранспептидази, МОд/л;

Z – фактор перерахування, МОд/л;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{кал}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

Визначення кількості тромбоцитів

На стерильне підготовлене предметне скло, ближче до одного кінця скельця, наносили невелику краплю крові. Залишали скло в горизонтальному положенні та готували мазок крові. Мазки висушували на повітрі і маркували. Мазки зафарбовували барвником Романовським-Гімзе.

Безпосередньо перед фарбуванням готували робочий розчин фарбника по Романовському-Гімзе. Для цього змішували дистильовану воду з азуро-еозином, далі добавляли фарбник по Романовському (концентрат) у співвідношенні 1:9. Отриманий робочий розчин наносили на висушені мазки крові і витримували 25-40 хвилин. Потім промивали дистильованою водою, висушували і обстежували під мікроскопом. Обрахунок здійснювали шляхом зміни поля зору 12 разів. Отримані результати переводили в 10^9 /л.

Визначення концентрації альбуміну

Принцип методу базується на накопиченні кольорового продукту при взаємодії альбуміну з індикатором бромкрезоловим зеленим. Оптичну щільність розчинів вимірювали фотоелектроколориметрично при довжині хвилі 625 нм.

В калібрувальну пробу додавали 0,02 мл калібрувального розчину, в дослідні – по 0,02 мл сироватки крові, в холосту пробу 0,02 мл фізіологічного розчину, і по 2,0 мл робочого розчину в усі проби. Змішували, витримували 10 хв при кімнатній температурі (від плюс 18°C до плюс 25°C). Вимірювали оптичну щільність калібрувальної ($E_{\text{кал.}}$) та дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$) проти холостої проби.

Концентрацію альбуміну розраховували за формулою:

$$\underline{E_{\text{досл.}}}$$

$$C = E_{\text{кал}} \times 50, \text{ де}$$

C – концентрація альбуміну в дослідній пробі, г/л;

50 – концентрація альбуміну в калібрувальному розчині г/л;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична щільність дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична щільність калібрувальної проби.

Отриману концентрацію альбуміну в г/л перераховували в г/дл.

Визначення APRI-індексу

APRI-індекс розраховували за формулою [28]:

$$\frac{\text{AST/ верхня межа AST (МОд/л)}}{\text{PLT (10}^9\text{/л)}} \times 100\%, \text{ де}$$

AST – активність аспартатамінотрасфери, МОд/л;

PLT – вміст тромбоцитів, 10^9/л .

Визначення активності аспартатамінотрасфери

Принцип методу базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в лужному середовищі.

В дослідну та холосту проби додавали 0,20 мл субстратно-буферного розчину, інкубували 3 хв при плюс 37°C , додавали в холосту пробу 0,20 мл стоп-реагенту і 0,04 мл сироватки крові в обидві проби, далі інкубували 60 хв при плюс 37°C і додавали 0,20 мл стоп-реагенту. Проби витримували 20 хв при кімнатній температурі та додавали по 2,00 мл розчину гідроокису натрію 0,4 Н в кожную пробу. Витримували 10 хв при кімнатній температурі та вимірювали оптичну щільність дослідної проби проти холостої проби (для кожної сироватки – по 10 з кожної групи тварин) фотоелектроколориметрично при довжині хвилі 520 нм.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel*. Статистичну значимість різниці

середніх показників оцінювали за допомогою стандартного t -критерію Стьюдента. Результати вважали статистично вірогідними при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що печінка бере участь у підтримці багатьох важливих функцій, зокрема синтетичної, захисної, аміакдетоксикуючої, жовчоутворюючої, тому наслідком ураження печінки може бути порушення її функціональної активності. Передозування АРАР може спричинити пошкодження печінки, одним із проявів якого є фіброз. Відомо, що ацетамінофен індукує запалення у гепатоцитах, стійке запалення веде до фіброгенного ремоделювання печінки аж до цирозу. Одночасно активуються регенеративні сигнали. Прогресування хвороби відображає баланс між чинниками, що сприяють розвитку фіброзу або відновленню нормальної функції та структури печінки [32]. Фіброз печінки є зворотнім процесом, особливо на ранніх стадіях розвитку. Тому рання діагностика та профілактика фіброзу печінки має велике значення в клінічній практиці.

Результати проведених досліджень показали, що за умов нестачі протеїну у раціоні відносна маса печінки порівняно з контролем достовірно не змінюється (рис. 3.1).

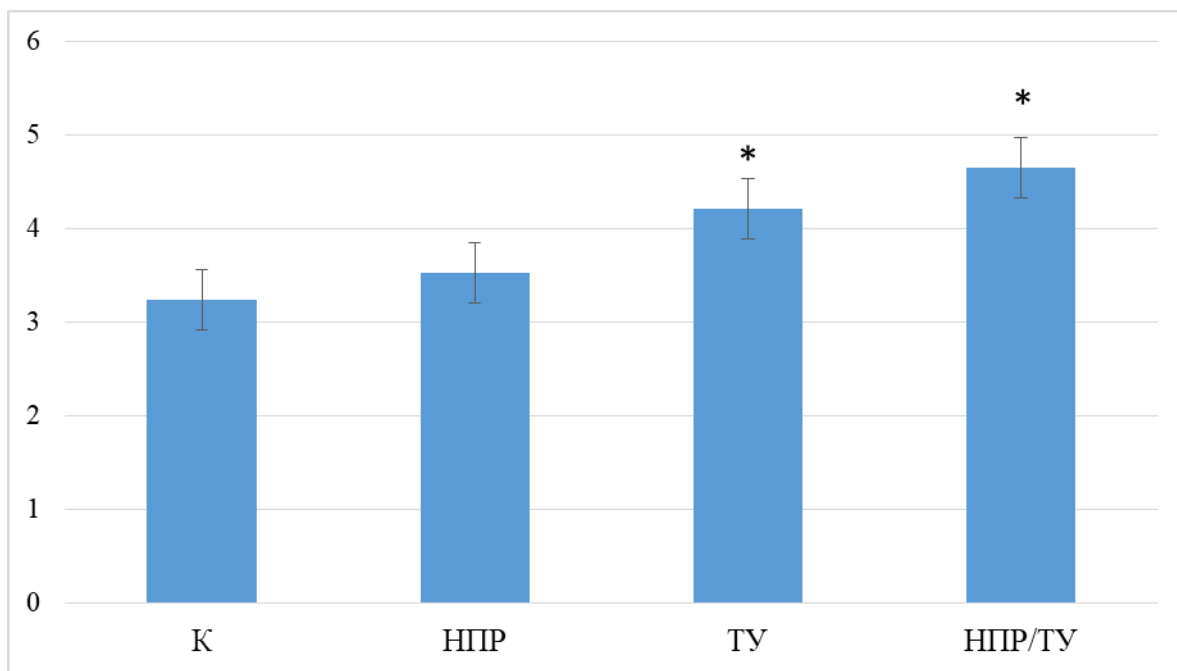


Рис. 3.1 Відносна маса печінки за умов токсичного ураження на тлі аліментарного дефіциту протеїну

*Примітка (тут і надалі): К – група тварин, які отримували повноцінний раціон; НІР – тварини, яких утримували на низькопротеїновому раціоні; ТУ – тварини з ацетамінофен-індукованим ураженням, які перебували на повноцінному раціоні; НІР/ТУ – тварини, яким моделювали токсичне ураження на тлі утримання на низькопротеїновому раціоні; * – достовірна різниця порівняно з контролем, $P < 0,05$.*

Проте у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном відносна маса печінки підвищується, досягаючи максимальних значень у тварин групи НІР/ТУ. Слід зазначити, що у тварин дослідних груп знижується абсолютна маса тіла, тоді як абсолютна маса печінки підвищується.

Як біомаркери фіброзу використовують APRI та S-індекси, при цьому APRI використовують для прогнозування важкого фіброзу/цирозу або низького ризику значного фіброзу. Проте APRI-індекс не дозволяє точно диференціювати проміжні стадії фіброзу, тоді як S-індекс дозволяє з високим ступенем точності прогнозувати стадії фіброзу. Отже, рекомендовано використовувати APRI в комбінації з іншими неінвазивними маркерами фіброзу, а не як єдиний метод [27]. В залежності від значень APRI-індекса, визначають наявність та відсутність фіброзу, цирозу печінки: $< 0,2$ – виключає фіброз; $\leq 0,3$ – виключає значний фіброз; $\leq 0,5$ – виключає цироз [29]. Для оцінки стадії фіброзу використовують шкалу значень S-індекса: мінімальний фіброз (F1) – $\geq 0,02$, виражений фіброз (F2) – $\geq 0,5$, важкий фіброз (F3) – $\geq 0,6$, цироз (F4) – $\geq 1,5$ [28].

Результати проведених досліджень показали, що у тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, APRI та S-індекси не відрізняються від показників контролю (рис. 3.2, рис. 3.3). Отримані результати вказують, що у тварин вказаної групи ознак фіброзних змін у печінці не спостерігається.

Водночас, у тварин з токсичним ураженням ацетамінофеном спостерігається достовірне підвищення як APRI-індексу (рис.3.2), так і S-індексу (рис. 3.3). Проте APRI-індекс не перевищує значень 0,2, що виключає фіброз, а S-індекс не досягає критичних значень, які дозволяють

діагностувати мінімальний рівень фіброзу. Отже, гостре токсичне ураження ацетамінофеном за умов повноцінного харчування не викликає фіброзні зміни у печінці тварин.

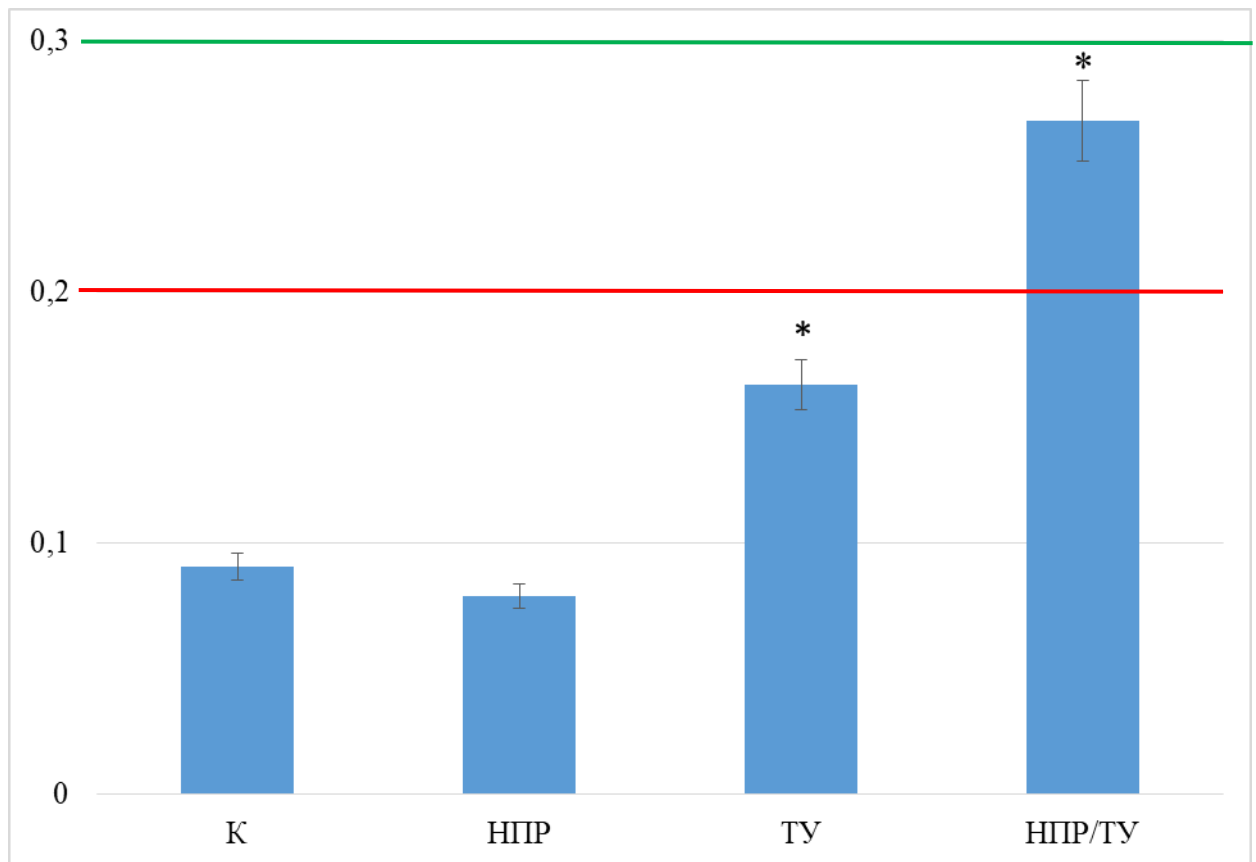


Рис. 3.2 Показники APRI-індексу як неінвазивного маркера фіброзу у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

Проте у тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні з подальшим моделюванням токсичного ураження, спостерігається формування фіброзних змін у печінці. Зокрема, APRI-індекс перевищує значення 0,2, проте не досягає значень 0,3 (рис. 3.2), що вказує на наявність фіброзних змін, проте виключає значний фіброз. Водночас розрахунок APRI-індексу не дозволяє встановити стадію фіброзу.

При цьому в групі НІР/ТУ показник S-індексу досягає максимальних значень (рис.3.3) і перевищує значення 0,02, що свідчить про мінімальний фіброз, тобто стадію F1. Отримані результати свідчать про формування

незначних фіброзних змін у частини тварин з інтоксикацією ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.

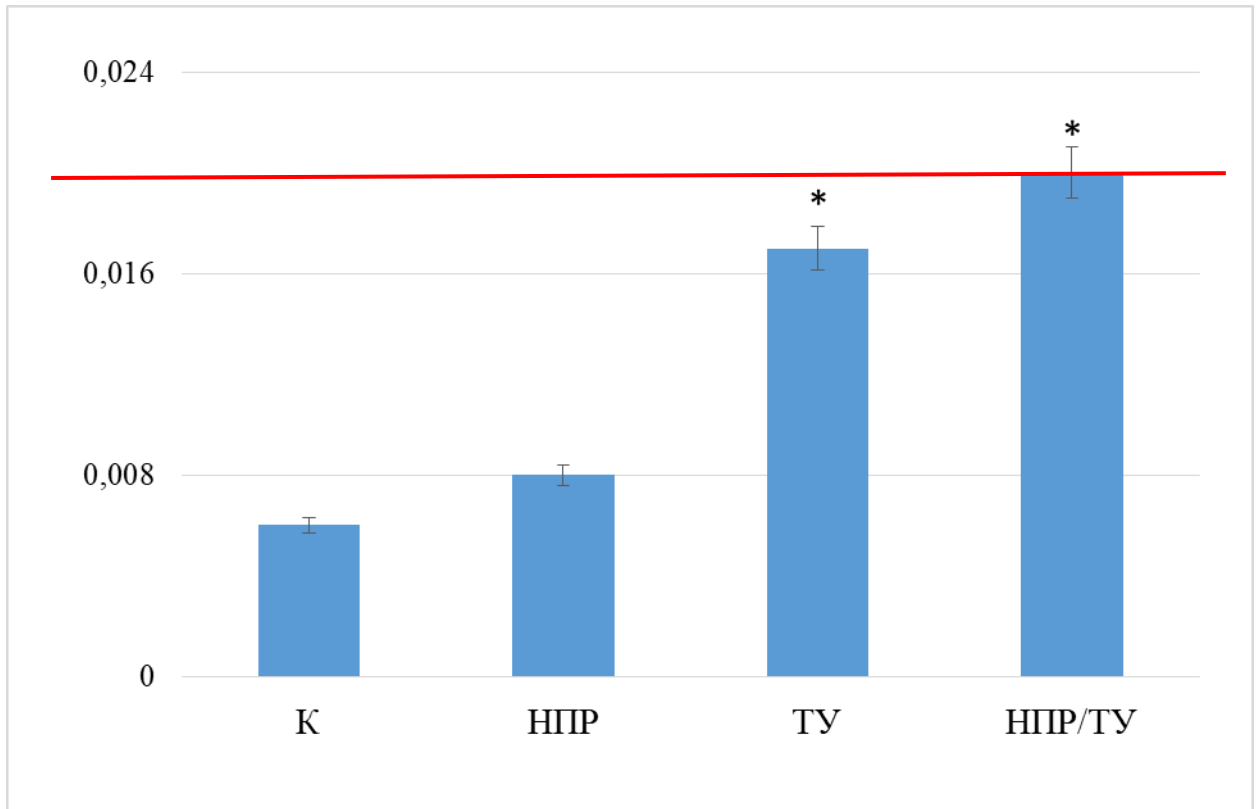


Рис. 3.3 Показники S-індексу як неінвазивного маркера фіброзу у щурів за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі білкової недостатності

Відомо, що за умов інтоксикації ацетамінофеном відбувається порушення структурно-функціональної організації печінки, індукується запальний процес, збільшується проникність мембран гепатоцитів та утворюються гепатоцелюлярні некротичні ділянки [33]. Некроз печінкових клітин запускає процес відкладення екстрацелюлярного матриксу, що розглядається як основна причина формування фіброзних змін у печінці.

Отже, за умов токсичного ураження ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну спостерігається підвищення APRI та S-індексів, що свідчить про початок формування фіброзних змін у печінці тварин.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що у тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, показники відносної маси печінки, APRI та S-індексів не відрізняються від контролю. Отримані результати вказують, що у тварин вказаної групи ознак фіброзних змін у печінці не спостерігається.

2. Показано, що у тварин, яким моделювали токсичне ураження ацетамінофеном, спостерігається підвищення відносної маси печінки та достовірне підвищення APRI та S-індексів. Проте результати APRI та S-індексів не досягають критичних значень, котрі дозволяють виявити фіброз та діагностувати його мінімальний рівень. Отже, гостре токсичне ураження ацетамінофеном за умов повноцінного харчування не викликає фіброзні зміни у печінці тварин.

3. Встановлено, що у тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні з подальшим моделюванням токсичного ураження, спостерігається значне підвищення відносної маси печінки, APRI та S-індексів. Зокрема, отримані значення APRI-індексу вказують на наявність фіброзних змін, проте виключають значний фіброз. Показник S-індексу перевищує значення, які свідчать про мінімальний фіброз у тварин. Отримані результати свідчать про формування незначних фіброзних змін у частини тварин з інтоксикацією ацетамінофеном на тлі аліментарного дефіциту протеїну.