

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
“ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ”**

ЯРОВЕНКО ЛЮДМИЛА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 591.436:599.323.4:615.099:616-08

**ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ УШКОДЖЕННЯ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ ПЕЧІНКИ
У ЩУРІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ АЛКОГОЛЬНІЙ ІНТОКСИКАЦІЇ, ШЛЯХИ
КОРЕКЦІЇ ВИЯВЛЕНИХ ПОРУШЕНЬ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Тернопіль – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті імені М. І. Пирогова МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Рикало Надія Анатоліївна,
завідувач кафедри патологічної фізіології,
Вінницький національний медичний
університет імені М.І. Пирогова МОЗ України

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Кучмеровська Тамара Муратівна,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії вітамінів і коензимів,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

доктор медичних наук, доцент
Марушак Марія Іванівна,
завідувач кафедри функціональної діагностики
та клінічної патофізіології
ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України”

Захист дисертації відбудеться “30” червня 2016 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 у ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України” за адресою: 46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1.

Із дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України” за адресою: 46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розіслано “28” травня 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, доцент

Т.Я. Ярошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Алкогольне ушкодження печінки є однією з актуальних медико-соціальних проблем через значну поширеність цієї патології серед населення різних країн світу, зокрема і в Україні (Давидова Н.В., 2013; Запорожець Т.Ю., 2014; O'Shea R.S. et al., 2010; Bruha R. et al., 2012).

У сучасному світі зберігається стійка тенденція до зростання алкоголізму (Степанець І.О., 2013; Bruha R. et al., 2012). За даними ВООЗ близько 2 млрд людей на Земній кулі вживають алкогольні напої та 76,3 млн мають захворювання, які пов'язані із їх зловживанням (Азжаргал Б., 2013). Серед причин смертності населення алкоголізм у більшості країнах світу знаходиться на 4 місці після серцево-судинних та онкологічних захворювань, а також цукрового діабету, уражаючи найбільш дієздатну частину населення (Єщенко А.В., 2013; Запорожець Т.Ю., 2014).

Сучасні наукові літературні джерела достатньо широко висвітлюють вплив на печінку різних екзогенних чинників, зокрема етанолу, проте результати досить часто є суперечливими та потребують додаткових досліджень, особливо при хронічному алкоголізмі в залежності від віку. Численними дослідженнями встановлено, що одним із основних механізмів токсичної дії етанолу на організм є активація процесів вільнорадикального окиснення біомолекул. Це призводить до порушення рівноваги прооксидантно-антиоксидантних процесів і розвитку оксидативного стресу у клітинах (Давидова Н.В., 2013; Максимчук О.В., 2013; Das S.K., 2007; Cederbaum A.I. et al., 2009; Gao B. et al., 2011; Emanuele A., 2015). Взаємодія вільних радикалів із ненасиченими жирними кислотами, протеїнами, нуклеїновими кислотами призводить до незворотних молекулярних змін у гепатоцитах. Доведено, що збільшення вмісту ацетальдегіду викликає дисбаланс фракцій фосфоліпідів мембран гепатоцитів (Степанов Ю.М. та ін., 2015; Crawford J.M., 2012), пошкодження мітохондрій, порушення утилізації триацилгліцеролів із їх відкладенням у клітинах, розвитку імунно-запальних реакцій, трансформації ендотеліальних клітин у фібробласти із продукцією колагену, що призводить до ушкодження і загибелі гепатоцитів (Бычков Е.Н., Бычков А.Е., 2013; Bruha R. et al., 2012). У результаті таких метаболічних та функціональних порушень відбувається активація каскаду молекулярних та клітинних процесів, які спрямовані на їхнє відновлення шляхом репарації та регенерації (Dooley S. et al., 2012).

Незважаючи на численні наукові роботи, присвячені дослідженню різних аспектів алкогольного ураження печінки (Запорожець Т.Ю., 2014; Животовська Л.В., 2014; O'Shea R.S. et al., 2010; Bruha R. et al., 2012), питання стосовно вікових особливостей хронічної алкогольної інтоксикації та запобігання виникненню можливих ускладнень залишається актуальним. Етанол-індуковане ураження гепатоцитів може мати тривалий безсимптомний перебіг. Тому комплексне дослідження й аналіз основних біохімічних показників функціонального стану печінки та молекулярних механізмів токсичної дії алкоголю на її клітини потребує особливої уваги з огляду на можливість виявлення ранніх високочутливих маркерів ушкодження гепатоцитів, що матиме важливе значення для розробки ефективних підходів діагностики та корекції виявлених порушень. Саме тому

дослідження вікових особливостей ураження печінки щурів за хронічної алкогольної інтоксикації та процесів її регенерації за таких умов, а також при корекції кверцетином і глутаргіном є актуальними, оскільки вони доповняють відомості щодо біохімічних механізмів впливу алкоголю за його хронічної дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України на тему “Вікові особливості патогенезу гострої і хронічної патології внутрішніх органів. Патогенетичні підходи до лікування”, затвердженої Президією НАН України (№ державної реєстрації 0111U00867), у якій здобувач є співвиконавцем.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – дослідити біохімічні та клітинно-ядерні особливості вікових змін за експериментального хронічного алкогольного ураження печінки (ХАУП) у щурів та за їх корекції.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

1. Визначити біохімічні показники у сироватці крові самок щурів різного віку, характерні хронічному алкогольному ушкодженню печінки, та дослідити функціональний стан органу, а саме протеїнсинтезуючу функцію печінки, синдром цитолізу, холестазу та мезенхімального запалення.

2. Оцінити вплив кверцетину та глутаргіну на досліджувані біохімічні показники функціонального стану печінки у щурів різного віку при хронічній алкогольній інтоксикації.

3. Визначити рівень інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-1) у сироватці крові щурів різного віку на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та за її корекції, а також з'ясувати його роль у процесах регенерації тканини печінки.

4. Охарактеризувати фази клітинного циклу, фрагментацію та плоідність ядерної ДНК гепатоцитів в експериментальних тварин при хронічному алкогольному ураженні печінки залежно від віку.

5. З'ясувати морфологічні особливості структури печінки у щурів різного віку при хронічному алкогольному ураженні печінки та при корекції кверцетином і глутаргіном.

6. Встановити можливі кореляційні зв'язки між біохімічними, цитофлуориметричними, імуноферментними та морфометричними показниками у щурів різних вікових категорій при хронічній алкогольній інтоксикації та за корекції.

Об'єкт дослідження. Вікові особливості хронічного алкогольного ураження печінки у самок щурів.

Предмет дослідження. Біохімічні та морфологічні показники функціонального стану печінки, фаз клітинного циклу, плоідності та фрагментації ядерної ДНК клітин печінки, вмісту IGF-1 у сироватці крові щурів різних вікових категорій при хронічній алкогольній інтоксикації, шляхи корекції кверцетином і глутаргіном.

Методи дослідження. У роботі були використані біохімічні (для визначення активності ензимів, загального білірубину, білків та альбумінів, β -ліпопротеїнів у сироватці крові), імуноферментні (для визначення рівню IGF-1), цитофлуориметричні (для визначення фаз клітинного циклу, фрагментації та плоідності ДНК ядер

гепатоцитів) та морфологічні методи для дослідження функціонального стану печінки і статистичний аналіз отриманих даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Установлено зміни характерних біохімічних показників функціонального стану печінки на тлі хронічної алкогольної інтоксикації у щурів різного віку. У всіх вікових категоріях тварин із хронічним алкогольним ураженням печінки виявлено кількісне збільшення маркерів синдрому цитолізу, холестазу, дисфункцію печінки, при чому більш виражено у статевонезрілих та старих щурів порівняно із статевозрілими.

Уперше з'ясовано, що дія кверцетину та глутаргіну на функціональний стан печінки щурів реалізується в залежності від віку тварин при хронічній алкогольній інтоксикації. Глутаргін суттєво пригнічував біохімічні показники синдромів холестазу та цитолізу (достовірно зменшувалась активність трансаміназ та вміст білірубіну), кверцетин – мезенхімального запалення з відновленням протеїнсинтезуючої функції печінки у всіх тварин незалежно від віку.

Установлено, що рівень IGF-1 у сироватці крові всіх вікових категорій щурів із хронічним алкогольним ушкодженням печінки достовірно зменшувався порівняно із контролем. Введення кверцетину статевозрілим тваринам призводило до зниження рівня IGF-1, застосування глутаргіну навпаки – до достовірного збільшення його порівняно із контролем відповідного віку, що свідчить про активацію процесів регенерації тканини печінки.

Уперше досліджені механізми ушкодження та регенерації ядер клітин печінки на основі змін фаз клітинного циклу, фрагментації та плоідності ядерної ДНК гепатоцитів у статевонезрілих, статевозрілих та старих самок щурів. Установлено, що хронічна інтоксикація етанолом може призводити до апоптичної загибелі гепатоцитів (посилена фрагментація ДНК) унаслідок пригнічення біосинтетичних процесів у ядрах гепатоцитів із переважанням процесів поліплоїдизації. Кверцетин і глутаргін сприяють регенерації печінки шляхом проліферації, про що свідчить достовірне збільшення диплоїдних ядер клітин печінки.

Оцінено вікові особливості морфофункціонального стану печінки та виявлено структурні зміни паренхіми у щурів різних вікових категорій на тлі хронічної дії етанолу. Показана здатність глутаргіну нормалізувати морфофункціональний стан печінки, сприяючи репарації клітин печінки.

Установлено, що існує взаємозв'язок характерних біохімічних показників функціонального стану печінки та рівня IGF-1 сироватки крові із фазами клітинного циклу, фрагментацією ДНК, плоідністю ядер клітин печінки, морфометричними показниками у щурів різного віку на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та при введенні кверцетину та глутаргіну, який найбільш виражений у статевозрілих щурів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати доповнюють існуючі дані щодо біохімічних механізмів алкогольного ушкодження і репаративної регенерації печінки щурів різного віку та поглиблюють відомості щодо біохімічних механізмів, порушення яких призводить до дисфункції печінки за хронічної алкогольної інтоксикації у залежності від віку. Одержані результати свідчать про протекторну дію кверцетину та глутаргіну за умов хронічного алкогольного ушкодження печінки, що може знайти застосування під час лікування хронічного алкоголізму. Запропоновано спосіб лікування патогенно індукованого

апоптозу гепатоцитів при алкогольних ушкодженнях печінки (Патент № 99811 від 25.06.2015 р., Україна).

Результати досліджень впроваджено у науково-навчальний процес кафедр біологічної та загальної хімії, патофізіології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова МОЗ України, кафедри медичної хімії Одеського національного медичного університету, кафедри медичної біохімії ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”, кафедри біологічної та медичної хімії імені академіка Г.О. Бабенка ДВНЗ “Івано-Франківський національний медичний університет МОЗ України”.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено патентно-інформаційний пошук та проаналізовано наукову літературу з теми дисертаційної роботи. Опановано нові методи досліджень та проведено експерименти. За консультативної допомоги наукового керівника та безпосередньої участі автора виконано всі дослідження і проаналізовано одержані результати. Самостійно проведено систематизацію отриманих даних та їх статистичну обробку. Дисертантом здійснено аналіз та узагальнення результатів дослідження, сформульовано основні положення та висновки, підготовлено до друку результати досліджень. Експериментальні та цитофлуорометричні дослідження проведено на базі Науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (свідоцтво про атестацію № 003/10 від 11.01.2010 р.), а також деякі біохімічні та імуноферментні дослідження – на базі клініко-діагностичної лабораторії Вінницького обласного клінічного високоспеціалізованого ендокринологічного центру (свідоцтво про атестацію № 003007 від 21.12.2012 р.), морфологічні – на кафедрі патологічної анатомії ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського”.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи апробовано на Міжнародній науково-практичній конференції “Особливості модернізації предмету досліджень представників медичних наук” (Київ, 2013); IV міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених “Актуальні питання експериментальної, клінічної та профілактичної медицини” (Вінниця, 2013); міжнародній науково-практичній конференції “Роль та місце медицини у забезпеченні здоров’я людини у сучасному суспільстві” (Львів, 2014); V міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених “Актуальні питання експериментальної, клінічної та профілактичної медицини” (Вінниця, 2014); Міжнародному конгресі “Людина та Ліки – Україна” (Київ, 2015); VIII науково-практичній конференції “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм” (Тернопіль, 2015); Міжнародній науково-практичній конференції “Молекулярні механізми патологічних процесів” (Харків, 2015); VIII міжнародній науково-практичній конференції “Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини” (Вінниця, 2015).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 19 наукових праць: 10 статей, із яких 4 – у наукових фахових виданнях України, 1 – у періодичному іноземному виданні, 5 – у наукових виданнях України, 8 тез доповідей – у матеріалах

вітчизняних та міжнародних наукових конгресів, конференцій та з'їздів, 1 деклараційний патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена українською мовою на 158 сторінках друкованого тексту (основний обсяг становить 120 сторінок) і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел (252 найменування, з яких 129 – латиницею), 8 додатків. Робота містить 6 таблиць та проілюстрована 27 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 144 нелінійних щурах-самках різного віку. Всі експерименти виконано з дотриманням норм Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), Ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р. Комісією з питань біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 11 від 19.11.2015 р.). Порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

У відповідності до мети та завдань роботи використовували самки щурів трьох вікових категорій: I вікова категорія – статевонезрілі щури віком 1,5 міс. із початковою середньою масою тіла 50 – 60 г, n = 48; II вікова категорія – статевозрілі щури віком 6 міс. із початковою масою тіла 180 – 200 г, n = 48; III вікова категорія – старі тварини, віком 20 міс., початковою середньою масою тіла 300 – 320 г, n = 48. Кожну вікову категорію було розподілено на 4 групи по 12 дослідних тварин у кожній: 1) контрольні тварини (щури однакового віку); 2) тварини з ХАУП, 3) тварини з ХАУП, яким через 1 год. після введення етанолу per os вводили ангіопротектор кверцетин (“Кверцетин”, ЗАТ НВЦ “Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод”, Україна) у дозі 100 мг/кг маси тіла тварин (Пахомова А. та ін., 2009); 4) тварини з ХАУП, яким через 1 год. після введення етанолу per os вводили гепатопротектор глутаргін (“Глутаргін”, ТОВ Фармацевтична компанія “Здоров’я”, Україна) у дозі 35 мг/кг маси тіла тварин (Рикало Н.А., 2011).

У тварин 2, 3 і 4 груп кожної вікової категорії перших два тижні моделювали ХАУП за методикою Г. А. Ковальова та А. Ю. Петренка (2004), протягом цього періоду тварини отримували 5 % та 15 % етанол, починаючи із третього тижня – щоденно, per os вводили 96,0 % розчин етанолу в дозі 16 г/кг маси тіла на добу протягом 12 тижнів (Ковалёв Г.А. и др., 2004). Введення кверцетину і глутаргіну на моделі ХАУП проводили через 2 тижні від початку експерименту щоденно 1 раз на добу через годину після введення етилового спирту впродовж 12 тижнів.

Після закінчення терміну експерименту проводили евтаназію тварин під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом декапітації та здійснювали забір крові та печінки щурів.

Біохімічний аналіз крові проводили на автоматичному біохімічному аналізаторі “Beckman Coulter AU-480” (США) відповідно до інструкції приладів із використанням реактивів “Beckman Coulter” (США) за загальними методиками

(Камышников В.С., 2004). Активність аланінамінотрансферази (КФ 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (КФ 2.6.1.1) у сироватці крові визначали кінетичними методами за стандартними наборами реактивів “ALT”, Кат. № OSR6107+P-5-P, “AST” Кат. № OSR6109+P-5-P (Beckman Coulter, США). Активність лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1) та γ -глутамілтрансферази (КФ 2.3.2.2) у сироватці крові визначали за стандартними наборами реактивів (Beckman Coulter, США) “ALP” (Кат. № OSR6204) та “GGT” (Кат. № OSR6119). Рівень загального (ЗБ) та прямого білірубину (ПБ) у сироватці крові визначали DPD-методом з 3,5-дихлорфенілдіазоною сіллю (Кат. № OSR6112 і OSR6111); вміст загального білка визначали біуретовим методом (Кат. № OSR6132), концентрацію альбумінів – методом із бромкрезоловим зеленим (Кат. № OSR6102) на біохімічному аналізаторі “Beckman Coulter AU-480” (США). Рівень β -ліпопротеїнів і тимолову пробу визначали фотоколориметричними методами за стандартними наборами ТОВ НВП “Філісіт-Діагностика” на КФК-2 (Україна) (Камышников В.С., 2004).

Рівень IGF-1 у сироватці крові визначали імуноферментним методом за комерційним набором реактивів “EIA-4140, IGF-I 600 ELISA” (“DRG”, Німеччина) відповідно до інструкції. Вимірювання проводили на імуноферментному аналізаторі Humareader 2106 (США).

Для визначення фаз клітинного циклу, фрагментації, плідності ядерної ДНК клітин печінки після розтину черевної порожнини негайно вилучали печінку у тварин усіх дослідних груп. У стерильних умовах під капсулою з лівої великої частки зі свіжого матеріалу вирізали шматочок тканини розміром 0,5 см³, який промивали 0,9 % розчином NaCl і занурювали у фосфатно-сольовий буфер рН 7,4 (Sigma) для подальшого цитофлуориметричного аналізу, який проводили на багатофункціональному проточному цитометрі “Partec PAS” фірми Partec (Німеччина). Суспензії ядер виділяли за допомогою набору CyStain DNA фірми Partec (Німеччина), відповідно до протоколу-інструкції виробника. До подрібненої печінки додавали розчин діамідинофеніліндолом, що дозволяє швидко й одночасно екстрагувати ядра і мічення ядерної ДНК (Krishan A., Dandekar P. D., 2005). Фрагментацію ядерної ДНК досліджували шляхом виділення Sub-G1 % ділянки на ДНК-гістограмах (інтервал RN1).

Морфологічні методи дослідження тканини печінки експериментальних тварин проводили згідно методики Сорочинникова А.П. (2000). Фрагменти печінки, фіксованої у 10 % розчині забуференого нейтрального формаліну (рН=7,0), проводили через батарею спиртів і заключали в парафін. Забарвлення препаратів здійснювали гематоксиліном і еозином за методом Ван Гізон (Van Gieson) та суданом III. Для здійснення світлооптичного дослідження використовували мікроскоп “Olympus BN-2” зі збільшенням від 100 до 200 разів. Діаметр гепатоцитів, діаметр їхніх ядер, відносний об’єм двоядерних гепатоцитів та відносний об’єм пошкоджених гепатоцитів визначали згідно отриманих морфологічних даних структури печінки.

Статистичний аналіз отриманих результатів у ході виконання дисертаційної роботи здійснений згідно з комп’ютерною програмою “Statistica 6.1” (ліцензійний номер ВХХR901E246022FA), із використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. Підраховували показники середньої арифметичної (M) і похибку

середнього арифметичного ($\pm m$). Варіаційно-статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали із застосуванням непараметричного U-критерію Мана-Уїтні (Реброва О.Ю., 2006; Мармоза А.Т., 2013). Аналіз кореляцій між показниками проводили за методом Спірмена. Статистично достовірною вважали різницю $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При оцінці розвитку ХАУП вивчено показники цитолізу гепатоцитів – активності амінотрансфераз у сироватці крові. Установлено, що у щурів активність АлАТ та АсАТ була більшою у порівнянні із контролем: у статевонезрілих – на 57,8 % та 47,8 %, у статевозрілих – на 49,8 % та 35,2 %, у старих тварин – на 100,0 % та 46,5 %, відповідно ($p < 0,05$).

Отримані результати є свідченням наявності синдрому цитолізу, що узгоджується з даними інших авторів (Das S. K. et al., 2008; Reimann M. et al., 2013), та підтверджують виражений гепатотоксичний ефект етанолу. Було доцільним обрахувати коефіцієнт Де Рітиса (КДР), який характеризує ступінь інтенсивності цитолізу. Так, у статевонезрілих щурів цей коефіцієнт збільшувався на 31,5 %, у старих – навпаки – зменшувався на 25,1 %, тоді як у статевозрілих щурів він не змінювався. Не виключено, що такі зміни інтенсивності цитолізу за ХАУП обумовлені різним гормональним статусом тварин у цих вікових категоріях.

Встановлено, що глутаргін суттєво пригнічував біохімічні маркери синдрому цитолізу, достовірно зменшував активність АлАТ і АсАТ у статевонезрілих щурів на 35,9 % і 30,3 %, у статевозрілих – на 35,6 % і 26,8 %, у старих – на 43,3 % і 25,7 %, відповідно ($p < 0,05$), порівняно із показниками за ХАУП, оскільки містить у своєму складі L-глутамат, який виступає основним субстратом для реакцій дезамінування із підвищенням ефективності окиснення аміаку ферментною системою синтезу сечовини та антиоксидантної системи.

На тлі ХАУП спостерігали розвиток холестазу, про що свідчать зміни активності ЛФ та ГГТ у сироватці крові щурів. Дійсно, як свідчать дані (табл. 1), їхня активність зростала на 75,3 та 48,1 % у статевонезрілих тварин, на 75,6 % та 26,3 % – у статевозрілих щурів, на 76,0 та 52,2 % ($p < 0,05$) – у старих тварин.

Таким чином, підвищення активності ферментів АлАТ, АсАТ, ЛФ та ГГТ свідчить про порушення цілісності мембран гепатоцитів та розвиток некротичних змін у паренхімі печінці, можливо, у результаті активації процесів ПОЛ. Зважаючи на те, що розвиток холестазу печінки супроводжується змінами вмісту білірубину та його фракцій важливо було виміряти їх вміст. Було виявлено, що вміст загального білірубину (ЗБ), прямого (ПБ) і непрямого (НБ) білірубину в сироватці крові щурів із ХАУП був більшим у порівнянні з контролем: у статевонезрілих щурів – на 52,5 %, 50,4 % і 52,8 %, у статевозрілих – на 48,4 %, 30,9 % і 50,5 % та у старих тварин – на 58,2 %, 91,0 % і 53,3 % ($p < 0,05$) відповідно (табл. 1).

Таким чином, підвищення активності ферментів АлАТ, АсАТ, ЛФ та ГГТ свідчить про порушення цілісності мембран гепатоцитів та розвиток некротичних змін у паренхімі печінці, можливо, у результаті активації процесів ПОЛ. Зважаючи на те, що розвиток холестазу печінки супроводжується змінами вмісту білірубину та його фракцій, важливо було виміряти їх вміст. Було виявлено, що вміст загального білірубину (ЗБ), прямого (ПБ) і непрямого (НБ) білірубину у сироватці крові щурів із

ХАУП був більшим у порівнянні із контролем (табл. 1) у статевонезрілих щурів на 52,5 %, 50,4 % і 52,8 %, у статевозрілих – на 48,4 %, 30,9 % і 50,5 % та у старих тварин – на 58,2 %, 91,0 % і 53,3 % відповідно ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Біохімічні показники, які характеризують синдром холестазу в щурів різних вікових категорій за умов ХАУП і корекції ($M \pm m$)

Вік	Група, n=12	ЗБ, мкмоль/л	ПБ, мкмоль/л	НБ, мкмоль/л	ЛФ, У/л	ГГТ, У/л
I статевонезрілі	Контроль	47,35±3,21	4,23±0,31	43,12±3,68	242,80±31,69	7,90±0,55
	ХАУП	72,19±4,64 *	6,36±0,52 *	65,89±4,51 *	425,70±29,06 *	11,70±0,85 *
	ХАУП+кверцетин	54,80±5,50 *#	5,76±0,52 *	49,17±4,03 **	379,20±36,8 *#	8,50±0,37 #
	ХАУП+глутаргін	49,47±4,0 **&	4,42±0,40 #&	45,15±0,40 **&	283,60±28,80 #&	7,50±0,54 #&
II статевозрілі	Контроль	48,30±3,42	5,12±0,37	43,18±3,77	200,5±11,20	8,00±0,59
	ХАУП	71,67±4,02 *	6,70±0,47 *	64,97±4,70 *	352,10±27,21 *	10,10±0,71 *
	ХАУП+кверцетин	68,73±6,08 *	6,45±0,55 *	62,28±5,10 *	299,50±34,70 *	9,00±0,40
	ХАУП+глутаргін	49,24±4,30 #&	5,95±0,46 #	43,28±3,72 #&	238,60±20,40 #&	7,62±0,54 #&
III старі щури	Контроль	51,58±3,11	6,71±0,45	44,88±3,44	236,10±15,86	9,84±0,75
	ХАУП	81,63±5,31 *	12,81±0,52 *	68,81±4,79 *	415,60±29,50 *	14,98±0,96 *
	ХАУП+кверцетин	69,72±7,06 **	8,26±0,92 **	61,46±5,32 **	260,90±24,51 *#	11,85±0,42 **
	ХАУП+глутаргін	53,46±4,90 #&	6,66±0,32 #&	46,81±4,11 #&	219,40±21,90 #	8,90±0,53 #&

Примітка. Достовірність відмінностей ($p < 0,05$) порівняно: * – з контрольною групою; # – з ХАУП; & – між кверцетином і глутаргіном.

Установлено, що глутаргін достовірно зменшував біохімічні маркери синдрому холестазу. Так, достовірно активність ЛФ і ГГТ була меншою: у статевонезрілих щурів – на 33,4 % і 35,9 %, у статевозрілих – на 32,2 % і 24,6 %, у старих – на 47,2 % і 40,6 % відповідно, у порівнянні з ХАУП (табл. 1). Під впливом цього препарату знижувався рівень білірубину в сироватці крові у порівнянні із ХАУП: у статевозрілих щурів – на 31,5 %, у статевозрілих – на 31,3 %, у старих – на 34,5 % (табл. 1). Виявлені нами зміни досліджуваних показників у сироватці крові тварин із ХАУП за впливу глутаргіну узгоджуються із даними інших авторів (Скрипник І.М., 2004; Харченко Н.В., 2012), які на моделі токсичного гепатиту показали мембраностабілізуючий ефект глутаргіну.

За розвитку ХАУП істотно змінювався вміст β -ліпопротеїнів. Так, було встановлено значне зростання його рівня у порівнянні із контролем: у статевонезрілих щурів – на 77,4 % ($p < 0,05$), у статевозрілих – на 41,5 % ($p < 0,05$) та у старих тварин – на 58,0 % ($p < 0,05$), що є доказом алкогольного ураження гепатоцитів, та, не виключено, дистрофічно-некротичних змін печінки. При введенні кверцетину рівень β -ліпопротеїнів у статевонезрілих, статевозрілих і старих щурів був меншим порівняно із ХАУП на 39,6 %, 27,9 % і 38,2 % відповідно ($p < 0,05$).

На тлі ХАУП за умов наших досліджень встановлено зменшення вмісту загального білка й альбумінів сироватки крові. Так, рівень загального білка у щурів різного віку на тлі ХАУП був достовірно меншим порівняно із контролем: у статевонезрілих – на 25,1 %, у статевозрілих – на 29,7 % та у старих щурів – на 21,2 %. Вміст альбумінів у сироватці крові щурів із ХАУП у всіх вікових категоріях тварин був також зниженим: у статевонезрілих – на 31,8 %, у статевозрілих – на 35,3 % та у старих тварин – на 30,8 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні із контролем, що характеризує недостатність синтетичної функції печінки. Рівень ТП був більшим у статевонезрілих – на 79,7 %, у статевозрілих – на 53,2 % та у старих тварин – на 55,6 % порівняно із контролем ($p < 0,05$), що може свідчити про розвиток мезенхімального запалення.

Кверцетин сприяв частковому відновленню протеїнсинтезуючої функції печінки внаслідок достовірного підвищення рівня загального білка й альбумінів сироватки крові на 22,8 та 27,6 % у статевонезрілих щурів, на 51,1 та 63,6 % – у статевозрілих щурів, на 44,4 і 66,4 % – у старих тварин, порівняно зі хронічною алкогольною інтоксикацією ($p < 0,05$). Було виявлено, що кверцетин може інгібувати мезенхімальне запалення, про що свідчить достовірне зменшення ТП у статевонезрілих щурів на 53,5 %, у статевозрілих – на 43,4 %, у старих – на 25,5 %. Виявлена нами дія кверцетину може реалізуватися як завдяки його антиоксидантним властивостям, так і внаслідок його здатності інгібувати ліпоксигеназу (Харченко Н.В., 2013; Слесарчук В.Ю., 2014; Tai S.H. et al., 2011).

Виявлено, що у статевонезрілих і старих щурів порівняно із статевозрілими тваринами на тлі ХАУП вміст ЗБ та його фракцій, загального білка й активність ферментів у сироватці крові змінюється більш виражено. Установлено, що на тлі введення кверцетину та глутаргіну на тлі ХАУП у щурів ці показники частково нормалізувались, що може свідчити про їхню цитопротекторну, антицитолітичну й антихолестатичну дію із відновленням протеїнсинтезуючої функції печінки. Так, під час порівняння ефективності кверцетину та глутаргіну останній проявляє більш виразний ефект антицитолітичної і антихолестатичної дії, не виключено, що внаслідок відновлення цілісності мембран гепатоцитів.

За використання імуноферментного аналізу встановлено, що рівень сироваткового IGF-1 в інтактних тварин різного віку відрізнявся (рис. 1). При цьому вміст IGF-1 у сироватці крові контрольних статевонезрілих щурів був меншим на 62,2 % ($p < 0,05$) за показники статевозрілих тварин. У старих тварин контрольної групи вміст IGF-1 дещо перевищував відповідний показник статевозрілих тварин, але при цьому статистично достовірної різниці не встановлено.

Установлено, що на тлі ХАУП у щурів різного віку відбувається достовірне зменшення вмісту IGF-1 у сироватці крові порівняно із контролем відповідних за віком тварин: у статевозрілих щурів – на 54,8 % та у старих – на 16,3 % (рис. 1). Отримані дані свідчать про токсичну дію етанолу, ураження паренхіми печінки з порушенням білоксинтезуючої функції, у тому числі зі зменшенням синтезу ростового цитокіну IGF-1, оскільки 90 % циркулюючого IGF-1 синтезується печінкою (Economidou M.A. et al., 2005), тому виявлене зменшення рівня цього показника вказує на значне ушкодження печінки (Журавльова Л.В., 2012; Alderete T.L. et al., 2010).

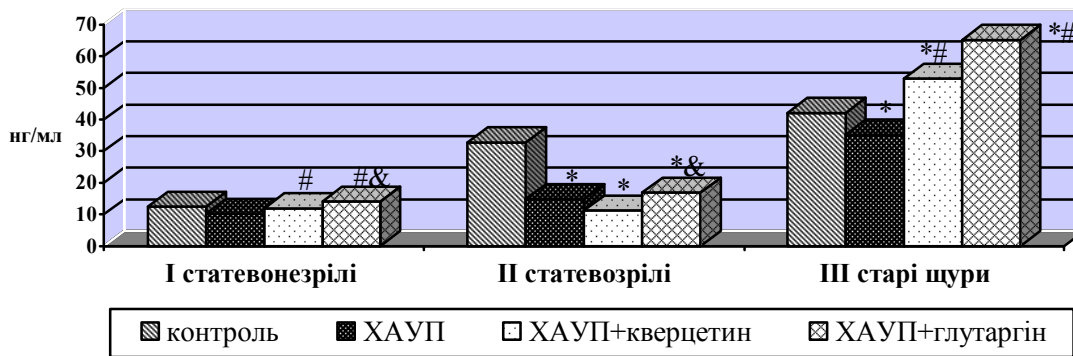


Рис. 1. Концентрація IGF-1 у сироватці крові щурів різного віку на тлі ХАУП та при застосуванні кверцетину та глутаргіну ($M \pm m$, $n=12$).

Примітка. Достовірність відмінностей ($p < 0,05$) порівняно: * – з контрольною групою; # – з ХАУП; & – між кверцетином та глутаргіном.

Найвищий рівень IGF-1 на тлі ХАУП спостерігали у старих тварин, що, на нашу думку, може виступати компенсаторно-захисним механізмом на токсичну дію етанолу. Кверцетин у статевозрілих тварин знижував рівень IGF-1 на 24,2 % ($p < 0,05$), що може свідчити про його здатність інгібувати IGF-1. При застосуванні глутаргіну вміст IGF-1 був більшим за відповідні показники з ХАУП: у I-й віковій категорії – на 37,4 % ($p < 0,05$) та у III-й – на 85,2 % ($p < 0,05$). Враховуючи дані літературних джерел щодо протизапальної, гепатопротекторної, а також антиапоптичної дії IGF-1 (Lorenzo-Zuniga V. et al., 2006), виявлене збільшення його рівня на тлі введення глутаргіну може свідчити про активацію регенерації печінки.

Згідно з цитофлуориметричними дослідженнями встановлено, що у старих тварин контрольної групи відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у фазі G_0G_1 , був найвищим проти показників статевозрілих і статевонезрілих щурів. Відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у G_2M -фазі та S-фазі з віком зменшувався, відповідно, індекс проліферації у старих тварин також мав найнижче значення (табл. 2), що узгоджується із даними (Koteish A. et al., 2006; Gao B., 2011). Отримані дані можуть свідчити про зниження процесів регенерації у печінці з віком через накопичення продуктів вільнорадикального окиснення, порушення елімінації продуктів життєдіяльності гепатоцитів, зменшення довжини теломера, розвитку апоптозу, а також зниження процесів проліферації гепатоцитів унаслідок зниження чутливості до факторів росту (Diehl A. M., 2005; Schmucker D.L., 2011).

Зменшення кількості ядер гепатоцитів, що перебувають у S-фазі клітинного циклу, може бути внаслідок природного зниження мітотичної активності гепатоцитів з віком. Збільшення кількості ядер гепатоцитів, що перебувають у G_0G_1 -фазі та взаємопов'язане з цим зменшення кількості ядер клітин печінки, що перебувають у G_2M -фазі клітинного циклу у старих тварин, може бути через знижену відповідь на оксидативний стрес, зменшення експресії ростових регуляторних генів та темпів репарації ДНК гепатоцитів у тварин цієї вікової категорії, що узгоджується із висновками інших науковців (Schmucker D.L., 2011).

Установлено, що при ХАУП відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у фазі G_0G_1 був меншим за контроль відповідного віку: у I-й віковій категорії – на 3,1 %, у II-й – на 7,6 % та у III-й – на 4,2 % ($p < 0,05$). На тлі ХАУП у всіх дослідних тварин

відсоток ядер клітин печінки, які перебувають у S-фазі був меншим за контроль: у щурів I-ї вікової категорії – на 56,2 %, у II-й – на 51,9 % та у III-й – на 56,5 % ($p<0,05$), що може бути ознакою зниження біосинтетичних процесів у гепатоцитах. Вміст ядерної ДНК клітин печінки, які перебувають у G₂M-фазі був більшим у щурів на тлі ХАУП: у I-й віковій категорії – на 26,7 %, у II-й – на 53,1 %, та в III-й – на 46,7 % ($p<0,05$) порівняно із контролем (табл. 2).

Таблиця 2

Фази клітинного циклу та плоідності ядерної ДНК клітин печінки у щурів різного віку на тлі ХАУП та при корекції (M±m)

Вік	Показники клітинного циклу	Контроль, n=6	ХАУП, n=6	ХАУП+ кверцетин, n=6	ХАУП+ глутаргін, n=6
I статевонезрілі	G ₀ G ₁ , %	85,46±0,35	82,79±0,42*	81,70±0,76*	83,38±1,02
	S, %	1,30±0,13	0,572±0,08*	1,40±0,20 [#]	1,05±0,06 [#]
	G ₂ M, %	13,24±0,38	16,77±0,53*	16,90±0,84*	15,57±1,05
	IP, %	14,54±0,35	17,34±0,49*	18,30±0,76*	16,60±1,02
	BP, %	0,10±0,01	0,035±0,006*	0,09±0,01 [#]	0,07±0,01 ^{#&}
	2c, %	82,42±1,18	75,78±1,71*	78,95±0,96*	81,51±1,28 ^{#&}
	4c, %	15,47±1,44	17,31±0,94*	17,28±0,70	15,45±1,38 [#]
II статевозрілі	G ₀ G ₁ , %	85,11±0,44	78,60±0,57*	81,80±1,02 ^{#&}	83,02±1,51 [#]
	S, %	1,31±0,15	0,63±0,03*	1,24±0,22 [#]	1,00±0,06 [#]
	G ₂ M, %	13,57±0,86	20,77±0,99*	16,95±0,96 ^{#&}	15,98±1,53 [#]
	IP, %	14,89±0,74	21,40±0,96*	18,20±1,02 ^{#&}	16,98±1,51 [#]
	BP, %	0,10±0,02	0,03±0,003*	0,07±0,01 [#]	0,06±0,01 [#]
	2c, %	81,78±0,72	75,00±1,65*	81,51±0,92 [#]	82,15±0,92 [#]
	4c, %	15,30±0,10	19,45±0,80*	17,89±0,90	15,86±1,16 [#]
III старі щури	G ₀ G ₁ , %	89,88±0,51	86,11±0,66*	84,88±1,35*	88,90±1,06 ^{&}
	S, %	0,92±0,05	0,40±0,04*	0,53±0,08*	0,43±0,05*
	G ₂ M, %	9,23±0,50	13,54±0,89*	14,59±1,39*	10,67±1,06 ^{&}
	IP, %	10,15±0,50	13,93±0,81*	15,12±1,35*	11,10±1,06 ^{&}
	BP, %	0,10±0,008	0,03±0,004*	0,04±0,01*	0,04±0,01*
	2c, %	80,95±1,97	74,60±1,45*	78,68±1,74	81,88±0,36 ^{#&}
	4c, %	13,32±0,93	19,65±0,79*	15,66±0,48 [#]	13,74±0,39 ^{#&}

Примітка. Достовірність відмінностей ($p<0,05$) порівняно: * – з контрольною групою; # – з ХАУП; & – між кверцетином та глутаргіном.

Таким чином, встановлено, що при алкогольному ушкодженні печінки щурів синтез ядерної ДНК гепатоцитів зменшувався, на нашу думку, внаслідок прямої цитотоксичної дії етанолу на гепатоцити. Більше того, токсична дія утвореного із етанолу ацетальдегіду буде посилювати токсичні ефекти етанолу, що, в свою чергу, призводитиме до пригнічення процесів реплікації, репарації ДНК і дисфункції гепатоцитів. Саме дія цих двох токсичних чинників і буде призводити до ушкодження гепатоцитів та прогресування алкогольних захворювань печінки.

На тлі введення кверцетину та глутаргіну відсоток ядер гепатоцитів, які перебували у G₀G₁-фазі, був більшим у статевозрілих щурів на 4,1 і 5,6 % ($p<0,05$), порівняно із значеннями ХАУП. Відсоток ядер гепатоцитів, які перебували у S-фазі, був більшим на тлі застосування кверцетину порівняно із показниками тварин із ХАУП: у I-й віковій категорії – у 2,5 рази ($p<0,05$), у II-й – у 2 рази ($p<0,05$) та у III-й

– лише у 0,3 рази. При введенні глютаргіну у статевонезрілих щурів відсоток ядер клітин печінки, які перебували у фазі S також був більшим на 84,2 % у статевонезрілих та на 58,7 % – у статевозрілих щурів, ($p < 0,05$) у порівнянні із ХАУП. На тлі введення кверцетину та глютаргіну у старих щурів отримані дані при порівнянні із ХАУП не відрізняються, що може відбуватись унаслідок виснаження захисних механізмів та зниження резистентності організму в процесі старіння, оскільки знижується синтез ДНК та мітотична активність гепатоцитів (Schmucker D.L., 2006; 2011).

Установлено, що застосування глютаргіну достовірно відновлювало наступні показники фаз клітинного циклу у порівнянні із ХАУП: відсоток ядер гепатоцитів, які перебувають у G_0G_1 -фазі, G_2M -фазі, та нормалізувало індекс проліферації, що може бути ознакою репаративної регенерації печінки за механізмом проліферації. Дійсно, у щурів на тлі введення глютаргіну відсоток ядер клітин печінки, які перебували у G_2M -фазі, був меншим у всіх вікових категоріях тварин.

При аналізі рівня фрагментації ядерної ДНК клітин печінки у контрольних групах щурів різного віку виявлено, що у старих тварин цей показник був найвищим. Такі особливості, на нашу думку, свідчать, що з віком відсоток ядер клітин печінки, які мають набір ДНК $< 2c$, збільшується, що може вказувати на значну загибель клітин печінки шляхом апоптозу. На тлі експериментального ХАУП у щурів усіх вікових категорій встановлено, що рівень фрагментації ядерної ДНК гепатоцитів був більшим у порівнянні з контролем ($p < 0,05$) у тварин I-ї вікової категорії на 21,7 %, у II-й – на 39,5 % та у III-й – на 70,7 % (рис. 2). Фрагментація ядерної ДНК гепатоцитів у старих щурів була найбільшою, що вказує на її залежність від віку та дії токсичних чинників. Отримані дані свідчать про розвиток незворотного алкогольного ушкодження гепатоцитів із найважчим ураженням паренхіми печінки у старих щурів, оскільки фрагментація ядерної ДНК гепатоцитів у цій віковій категорії була найбільшою та відрізнялася від відповідних значень у статевонезрілих щурів на 41,7 % ($p < 0,05$) та статевозрілих тварин – на 37,5 % ($p < 0,05$). Водночас фрагментація ДНК ядер гепатоцитів у статевозрілих тварин свідчить про високу стійкість до токсичного впливу етанолу, тоді як у старих тварин стійкість організму знижується та підвищується чутливість до дії токсинів.

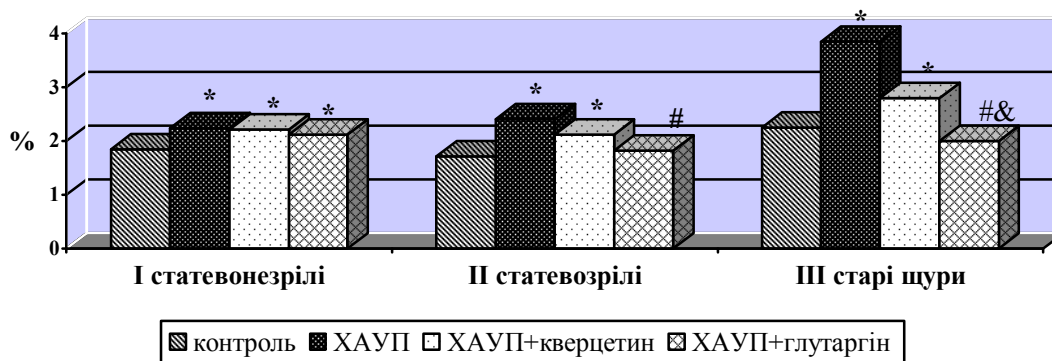


Рис. 2. Фрагментація ядерної ДНК клітин печінки у щурів різного віку на тлі ХАУП та при введенні кверцетину та глютаргіну ($M \pm m$, $n=12$).

Примітка. Достовірність відмінностей ($p < 0,05$) порівняно: * – з контрольною групою; # – з ХАУП; & – між кверцетином та глютаргіном.

Таким чином, загибель гепатоцитів за умов хронічної алкогольної інтоксикації може відбуватись шляхом апоптозу, а також унаслідок пригнічення і затримки процесів регенерації тканини печінки тварин, оскільки гальмується клітинний цикл гепатоцитів.

Установлено, що застосування глутаргіну достовірно зменшує фрагментацію ядерної ДНК: у статевозрілих щурів – на 24,2 % та у старих – на 48,0 % (рис. 2). При введенні кверцетину фрагментація ядерної ДНК у щурів різного віку залишається на достатньо високому рівні. Можливо, це пов'язано із здатністю кверцетину інгібувати IGF-1, онкогени і гени, які контролюють клітинний цикл.

На тлі ХАУП у всіх вікових категоріях відсоток 2с ядер гепатоцитів у порівнянні із контролем достовірно був меншим: у I-й віковій категорії – на 8,0 %, у II-й – на 8,3 % та в III-й – на 7,8 %, що вказує на загибель клітин печінки у відповідь на токсичну дію етанолу. Установлено, що на тлі ХАУП відсоток 4с ядер клітин печінки був більшим: у статевонезрілих щурів на 11,7 %, у статевозрілих – на 27,1 % та у старих – на 47,5 % при порівнянні з контролем (табл. 2). При цьому відсоток >8с ядер клітин печінки теж був більшим, що свідчить про регенерацію печінки внаслідок поліплоїдизації, яка характеризувалась появою нетипових для контрольних груп тварин ядер гепатоцитів із плоідністю ДНК 64с, 128с та навіть 256с, що, на нашу думку, може свідчити про адаптацію гепатоцитів до дії етанолу. Отримані результати узгоджуються із даними літератури (Guidotti J.E., 2012).

Установлено, що при застосуванні як кверцетину, так і глутаргіну нормалізувався відсоток диплоїдних ядер гепатоцитів, їх відсоток був достовірно більшим у тварин I, II і III вікових категорій: на 4,2 %, 8,9 %, 5,5 % при введенні кверцетину та на 7,5 %, 9,5 %, 9,8 % при застосуванні глутаргіну відповідно (табл. 2). Крім того, у дослідних щурів при корекції не спостерігали поліплоїдних ядер гепатоцитів із набором ядерної ДНК 128с, 256с, що може свідчити про регенерацію тканини печінки шляхом проліферації.

Для підтвердження розладів функціонального стану печінки гістологічно було встановлено, що для паренхіми печінки старих тварин контрольної групи порівняно із статевонезрілими та статевозрілими щурами характерні зміни із вираженим її ушкодженням, що пов'язано із процесами старіння. При дії етанолу відмічено розвиток некротично-дистрофічних змін, які в більшій мірі були виявлені у старих тварин. За умов ХАУП переважна більшість клітин перебувала у фазі некротичних змін, розвивалась жирова і білкова паренхіматозні дистрофії. Судини порталних трактів були значно розширені, їхні просвіти повністю заповнювались еритроцитами, був виражений периваскулярний набряк, який поєднувався лімфо- та гістоцитарною інфільтрацією. У статевозрілих і статевонезрілих щурів відбувалось значне формування колагенових волокон, переважно периваскулярно в зонах порталних трактів, у старих тварин – поширення навіть по стромі органу.

Установлено, що при застосуванні кверцетину зменшувалися дистрофічно-некротичні зміни тканини печінки та кількість колагенових волокон, при цьому відбувалась активація процесів регенерації (з'являлась велика кількість двоядерних гепатоцитів) у щурів різного віку. Найкращих результатів досягнуто у статевозрілих щурів. Гістологічна картина печінки при введенні глутаргіну змінювалась у бік зменшення некротично-дистрофічних проявів та значної активації регенерації

тканини печінки у щурів незалежно від віку. У статевозрілих тварин структурні зміни, які виникали при ХАУП, легко піддавалися відновленню. З'ясовано, що глутаргін зменшував розвиток колагенових волокон у печінці, не виключено, що внаслідок нормалізації обміну сполучної тканини шляхом гальмування синтезу глікогену та глікозаміногліканів (Харченко Н.В., 2012).

Аналіз морфометричних даних показав, що дистрофічні та некротичні зміни клітин печінкової паренхіми, які спостережено у щурів за ХАУП, проявлялись вираженими структурними змінами гепатоцитів, а саме достовірно збільшувався їхній діаметр, зростав стромально-паренхіматозний індекс, зменшувався діаметр ядер гепатоцитів, ядерно-цитоплазматичне співвідношення у порівнянні із контролем. Також на етанол-індуковане ураження гепатоцитів вказує їх відносний об'єм, який у всіх вікових категоріях щурів був більший за відповідний контроль. У статевонезрілих щурів при ХАУП відносний об'єм двоядерних гепатоцитів зменшувався на 63,8 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. У статевозрілих і старих тварин – навпаки – спостерігали збільшення відносного об'єму двоядерних гепатоцитів на 70,3 та 18,3 %, відповідно ($p < 0,05$), що, на нашу думку, можна пояснити активацією компенсаторних механізмів у відповідь на пошкодження.

За умов введення кверцетину у щурів різного віку відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів був меншим на 65,9 %, 48,0 % і 34,9 % відповідно ($p < 0,05$) у порівнянні із тваринами з ХАУП. З'являлись двоядерні гепатоцити, відносний об'єм яких зростав на 93,6 % ($p < 0,05$) у статевонезрілих щурів, що свідчить про посилення регенерації, однак гістологічно наявні дистрофічні зміни. При введенні глутаргіну спостерігали різке зменшення дистрофічних проявів, про це свідчить зменшення відносного об'єму ушкоджених гепатоцитів: у статевонезрілих щурів – у 4 рази і на 83,9 %, у статевозрілих – на 33,7 % і у 3 рази, у старих – відносний об'єм ушкоджених гепатоцитів зменшувався на 55,2 % у порівнянні із групою щурів з ХАУП, проте все ще залишався високим. Глутаргін порівняно із кверцетином проявляв більш виражений коригуючий ефект на структуру паренхіми печінки. Таким чином, ураження печінки за хронічної дії етанолу, а також її регенерація при використанні як кверцетину, так і глутаргіну на тлі ХАУП має вікові особливості та супроводжується змінами досліджуваних показників, які відображають перебіг метаболічних і біохімічних процесів у тканині печінки.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі теоретичного узагальнення й аналізу власних досліджень вирішено нове наукове завдання, яке полягає у з'ясуванні вікових особливостей ушкодження та регенерації тканини печінки на тлі хронічної алкогольної інтоксикації, а також експериментально обґрунтовано ефективність використання кверцетину та глутаргіну для корекції виявлених порушень у статевонезрілих, статевозрілих та старих тварин.

1. Установлено, що на тлі хронічного алкогольного ураження печінки відбувається достовірне збільшення активності аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, що є ознакою розвитку синдрому цитолізу, при чому більш суттєво у статевонезрілих та старих щурів порівняно із статевозрілими. У всіх вікових категоріях тварин достовірно збільшувалася активність лужної фосфатази та

γ -глутамілтрансферази, рівень загального і прямого білірубіну та β -ліпопротеїнів у сироватці крові, а також знижувався вміст загального білка і альбумінів: у статевонезрілих – на 25,1 % та 31,8 %, у статевозрілих – на 29,7 % та 35,3 %, у старих – на 21,2 % та 30,8 % відповідно ($p < 0,05$).

2. Досліджено, що на тлі введення глутаргіну у сироватці крові самок щурів різного віку активність аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, лужної фосфатази і γ -глутамілтрансферази відповідно достовірно менше на 35,9 %, 30,3 %, 33,4 % і 35,9 % у статевонезрілих щурів, на 35,6 %, 26,8 %, 32,2 % і 24,6 % відповідно у статевозрілих щурів та на 43,3 %, 25,7 %, 47,2 % і 40,6 % відповідно у старих тварин, порівняно із хронічною алкогольною інтоксикацією, що вказує на його дію, яка реалізується шляхом пригнічення цитолізу та холестазу у печінці за хронічної дії етанолу.

3. Доведено, що при введенні кверцетину частково відновлюється протеїнсинтезуюча функція печінки, про що свідчить підвищення вмісту загального білка й альбумінів сироватки крові у всіх вікових категоріях тварин: на 22,8 і 27,6 % – у статевонезрілих щурів, на 51,1 і 63,6 % – у статевозрілих щурів, на 44,4 і 66,4 % – у старих тварин ($p < 0,05$), знижувався рівень β -ліпопротеїнів та відбувалось пригнічення мезенхімального запалення, свідченням чого було достовірне зменшення тимолової проби: у статевонезрілих щурів – на 53,5 %, у статевозрілих – на 43,4 %, у старих – на 25,5 %, що реалізується шляхом його антиоксидантної та протизапальної дії.

4. За умов моделювання хронічної алкогольної інтоксикації у сироватці крові усіх вікових категорій щурів знижувалася концентрація інсуліноподібного фактора росту-1: у статевозрілих щурів – на 54,8 % ($p < 0,05$) та у старих щурів – на 16,3 % ($p < 0,05$) порівняно із контролем. Введення кверцетину призводило до збільшення вмісту інсуліноподібного фактора росту-1 у старих тварин, тоді як у статевозрілих тварин він знижувався. Корекція глутаргіном збільшувала концентрацію інсуліноподібного фактора росту-1 у статевонезрілих щурів на 37,4 % ($p < 0,05$) та у старих щурів – на 85,2 % ($p < 0,05$).

5. Установлено зміни фаз клітинного циклу на тлі хронічної алкогольної інтоксикації, а саме: зменшення фази синтезу ядерної ДНК клітин печінки на 56,2 % ($p < 0,05$) у статевонезрілих, 51,9 % ($p < 0,05$) – у статевозрілих та 56,5 % ($p < 0,05$) – у старих щурів, а також частки диплоїдних ядер гепатоцитів у щурів цих вікових категорій. Застосування кверцетину та глутаргіну призводило до часткової регенерації тканини печінки шляхом проліферації. Введення кверцетину посилило процеси регенерації клітин печінки шляхом підвищення синтезу ядерної ДНК, а глутаргіну – внаслідок активації процесів проліферації, про що свідчить достовірне збільшення диплоїдних ядер гепатоцитів та зменшення фрагментації ядерної ДНК.

6. На тлі хронічної алкогольної інтоксикації виявлено дистрофічно-некротичні зміни з переважанням жирової та білкової паренхіматозної дистрофій у печінці, які були більш виражені у статевонезрілих та старих тварин. Введення глутаргіну більшою мірою впливало на відновлення структури печінки, ніж кверцетин. У старих щурів цей ефект невиражений.

7. Установлено сильні кореляційні зв'язки у статевозрілих щурів на тлі хронічної дії етанолу між біохімічними показниками (вмістом загального білка із

фракцією альбумінів сироватки крові ($r=0,87$; $p<0,05$), рівнем загального і непрямого білірубину ($r=0,96$; $p<0,05$), які, в свою чергу, зворотно корелювали із ферментативною активністю на тлі хронічної дії етанолу, що підтверджує взаємозалежність біохімічних і внутрішньоклітинних особливостей, як при ушкодженні, так і при репарації печінки.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Яровенко Л.О.** Показники морфометричних досліджень тканини печінки щурів різного віку на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та за умов введення кверцетину та L-аргініну L-глутамату / Л. О. Яровенко // Український біофармацевтичний журнал. – 2016. – № 1 (42). – С. 41 – 44.

2. **Яровенко Л.О.** Особливості фрагментації ядерної ДНК клітин печінки у щурів на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та за умов застосування кверцетину і L-аргініну L-глутамату [Електронний ресурс] / Л. О. Яровенко // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2016. – № 58. – Режим доступу до журн. : http://nd.nubip.edu.ua/2016_1/index.html

3. Рикало Н. А. Інсуліноподібний фактор росту-1 у патогенезі хронічного алкогольного ушкодження печінки щурів різних вікових груп / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Світ медицини та біології. – 2015. – № 4 (53). – С. 130 – 137. *(Здобувачем особисто проведено експериментальні дослідження, забір первинного матеріалу, узагальнення результатів, підготовлено статтю до публікації).*

4. Рикало Н. А. Вікові особливості функціонального стану печінки при експериментальному хронічному алкогольному ушкодженні печінки та корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Медична та клінічна хімія. – 2015. – Т. 17. – № 4 (65). – С. 78 – 82. *(Здобувачем особисто проведено експериментальні дослідження, забір первинного матеріалу, аналітичний огляд, сформульовано висновки, підготовлено публікацію до друку).*

5. Рыкало Н. А. Роль инсулиноподобного фактора роста – 1 при хронической алкогольной интоксикации в эксперименте / Н. А. Рыкало, **Л. А. Яровенко**, А. С. Денесяк // Современная медицина: актуальные вопросы. – Новосибирск: Изд. “СибАК”. – 2013. – № 12 (26). – С. 160 – 166. *(Здобувачем особисто проведено аналіз літературних даних, експериментальні дослідження, статистичну обробку результатів та підготовлено статтю до друку).*

6. Рикало Н. А. Особливості репаративної регенерації тканини печінки у щурів при експериментальному тетрахлорметановому та алкогольному гепатиті / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Патологія. – 2015. – № 1 (33). – С. 84 – 89. *(Здобувач брала участь у зборі матеріалу та проведенні досліджень, написанні статті).*

7. Рикало Н. А. Дослідження фаз клітинного циклу ядер гепатоцитів у щурів різних вікових груп при хронічному алкогольному ушкодженні печінки та медикаментозній корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Досягнення біології та медицини. – 2015. – № 1 (25). – С. 27 – 31. *(Здобувачем здійснено реферування й аналіз використаних джерел, зібрано первинний матеріал, проаналізовано і сформульовано висновки).*

8. Рикало Н. А. Патоморфологічні зміни печінки щурів різного віку за умов хронічної алкогольної інтоксикації та при корекції кверцетином та L-аргініном

L-глутаматом / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Вісник морфології. – 2015. – Т. 21. – № 2. – С. 308 – 312. *(Здобувач провела огляд літератури, брала участь у зборі матеріалу та проведенні досліджень, підвела висновки та підготувала публікацію).*

9. Рикало Н. А. Вплив інсуліноподібного фактора росту-1 на процеси репаративної регенерації печінки у щурів різного віку за умов хронічної алкогольної інтоксикації / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Актуальні проблеми транспортної медицини. – 2015. – Т. 1 (41–1). – № 3. – С. 141 – 145. *(Здобувач провела огляд літератури, особисто провела експеримент і здійснила статистичний аналіз результатів, сформулювала висновки, підготувала до друку).*

10. Рикало Н. А. Сучасні аспекти патогенезу розвитку алкогольної хвороби печінки / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Львівський медичний часопис. – 2014. – Vol. XX, № 3 – 4. – С. 82 – 87. *(Здобувач особисто провела пошук, реферування й аналіз літератури, проаналізувала результати, підготувала статтю до публікації).*

11. Рикало Н. А. Перспективи застосування L-аргініну L-глутамат у якості антиапоптичної терапії при хронічному алкогольному ушкодженні печінки / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Людина та Ліки – Україна : міжнародний конгрес, 10 – 11 вересня 2015 : зб. матеріалів конф. – Київ, 2015. – С. 45. *(Ідея дисертанта, особисто проведено експеримент, аналіз отриманих результатів).*

12. Рикало Н. А. Вікова динаміка IGF-1 та морфоструктурні зміни тканини печінки у щурів-самок на тлі ХАУП та при патогенетичній корекції кверцетином та L-аргініном L-глутаматом / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : VIII науково-практична конференція, 1 – 2 жовтня 2015 р. : зб. матеріалів конф. – Тернопіль, 2015. – С. 81 – 83. *(Здобувачем здійснено огляд літератури, збір і аналіз матеріалу проведених досліджень, сформульовано висновки, підготовлено результати до друку).*

13. Рикало Н. А. Поліплоїдизація гепатоцитів у статевозрілих щурів на тлі хронічного алкогольного ушкодження печінки та при патогенетичній корекції / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Молекулярні механізми патологічних процесів : міжнародна науково-практична конференція, 16 жовтня 2015 р. : зб. матеріалів конф. – Харків, 2015. – С. 57. *(Здобувачем проаналізовано літературу, проведено самостійно експериментальні дослідження й аналіз отриманих результатів).*

14. Рикало Н. А. Антифібротична терапія при експериментальному хронічному алкогольному ушкодженні печінки у щурів-самок різного віку / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини: VIII Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, 9 – 10 листопада 2015 р. : зб. матеріалів конф. – Вінниця, 2015. – С. 216 – 219. *(Здобувач провела огляд літератури, збір матеріалу дослідження, аналіз і опис отриманих результатів).*

15. Рикало Н. А. Дослідження інсуліноподібного фактора росту-1 у щурів-самок різних вікових груп при хронічній алкогольній інтоксикації / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Роль та місце медицини у забезпеченні здоров'я людини у сучасному суспільстві : міжнародна науково-практична конференція, 31 січня – 1 лютого 2014 р. : зб. матеріалів конф. – Львів, 2014. – С. 122 – 126. *(Здобувачем особисто проведено експериментальні дослідження, статистичний аналіз результатів, сформульовано висновки, підготовлено матеріали до друку).*

16. **Яровенко Л. О.** Дослідження ферментативної активності сироватки крові у щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації та при її корекції / Актуальні питання експериментальної, клінічної та профілактичної медицини : V міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, 15 – 16 травня 2014 р.: збір. матеріалів конф. – Вінниця, 2014. – С. 22 –23.

17. Рикало Н. А. Механізми алкогольного ураження печінки / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко** // Особливості модернізації предмету досліджень представників медичних наук : міжнародна науково-практична конференція, 31 травня – 01 червня 2013 р. : зб. матеріалів конф. – Київ, 2013. – С. 24-28. (*Здобувач провела огляд літератури, експериментальне дослідження, аналіз результатів, підвела висновки*).

18. **Яровенко Л. О.** Алкогольний гепатит / Актуальні питання експериментальної, клінічної та профілактичної медицини : IV міжнародна науково-практична конференція молодих учених, 17 – 18 травня 2013 р. : збір. матеріалів конф. – Вінниця, 2013. – С. 134.

19. Патент на корисну модель № 99811 України, МПК (2015.01) А61К 31/00. Спосіб лікування патогенно індукованого апоптозу гепатоцитів при алкогольних ушкодженнях печінки / Н. А. Рикало, **Л. О. Яровенко**; власник Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова. – № у 2014 14056; заявл. 29.12.2014; опубл. 25.06.2015, бюл. № 12. (*Пошукачем особисто проведено експериментальне дослідження, інтерпретацію та узагальнення результатів*).

АНОТАЦІЯ

Яровенко Л.О. Вікові особливості ушкодження та регенерації печінки у щурів при хронічній алкогольній інтоксикації, шляхи корекції виявлених порушень. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Державний вищий навчальний заклад “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”, Тернопіль, 2016.

Дисертація присвячена дослідженню вікових особливостей ушкодження та регенерації тканини печінки на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та при корекції кверцетином і глутаргіном. Встановлено, що на тлі хронічного алкогольного ураження печінки у статевонезрілих та старих щурів більш достовірно відбувається збільшення синдромів цитолізу, холестазу та дисфункцій печінки. У всіх тварин збільшується фрагментація ядерної ДНК гепатоцитів із пригніченням синтетичних процесів у їх ядрах та переважанням процесів поліплоїдизації. Глутаргін пригнічував синдроми холестазу та цитолізу, кверцетин – підвищував протеїнсинтезуючу функцію печінки, сприяючи регенерації печінки.

Ключові слова: вікові особливості, щури, печінка, алкогольне ушкодження, регенерація, кверцетин, глутаргін.

АННОТАЦИЯ

Яровенко Л.А. Возрастные особенности повреждения и регенерации печени у крыс при хронической алкогольной интоксикации, пути коррекции обнаруженных нарушений. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по

специальности 03.00.04 – биохимия. – Государственное высшее учебное заведение “Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины”, Тернополь, 2016.

Диссертация посвящена исследованию возрастных особенностей процессов повреждения и регенерации ткани печени в условиях хронической алкогольной интоксикации, а также экспериментальному обоснованию эффективности использования кверцетина и глутаргина для коррекции обнаруженных нарушений у неполовозрелых, половозрелых и старых животных. Установлено, что на фоне хронического алкогольного повреждения ткани печени происходит количественное увеличение маркеров синдрома цитолиза, холестаза, а также развитие дисфункций печени, о чем свидетельствует снижение общего белка и альбумина сыворотки крови по сравнению с контрольными животными, причем более выражено у неполовозрелых и старых крыс по сравнению с половозрелыми. Впервые показаны возрастные особенности действия кверцетина и глутаргина на функциональное состояние печени крыс при хронической алкогольной интоксикации. Установлено, что введение глутаргина имеет ингибирующее действие на характерные биохимические показатели повреждения печени этанолом, существенно подавлялся синдром холестаза и цитолиза, на что указывает уменьшение активности аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, γ -глутамилтрансферазы и содержание билирубина в сыворотке крови). Кверцетин подавлял мезенхимальное воспаление и восстанавливал протеинсинтетическую функцию печени, о чем свидетельствует повышение общего белка и альбумина сыворотки крови по сравнению с контрольными животными.

На фоне хронического действия этанола отмечается уменьшение уровня инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1) в сыворотке крови у крыс всех возрастов по сравнению с контролем соответствующего возраста. Введение кверцетина половозрелым животным приводило к снижению уровня IGF-1, что указывает на ингибирующее действие кверцетина, применение глутаргина увеличивало уровень IGF-1 по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации процессов регенерации ткани печени.

Впервые исследованы механизмы повреждения и регенерации ядер клеток печени, установлено, что хроническая интоксикация этанолом может приводить к повреждению и гибели высокоспециализированных клеток печени путем апоптоза вследствие угнетения биосинтетических процессов в ядрах гепатоцитов, о чем свидетельствует усиленная фрагментация ядерной ДНК и уменьшение диплоидных гепатоцитов. Усиление регенерации ткани печени на фоне хронического алкогольного поражения происходило преимущественно путем полиплоидизации ядер гепатоцитов. Установлено, что у крыс разного возраста с хроническим алкогольным повреждением печени преобладали процессы полиплоидизации гепатоцитов по сравнению с соответствующими показателями контрольных групп животных, поскольку достоверно увеличивался процент $>8c$ ядер клеток печени и даже появлялись ядра гепатоцитов с набором ядерной ДНК $64c$, $128c$, $256c$ что не характерно для контроля. Введение кверцетина и глутаргина способствовало регенерации печени путем активации пролиферации, хотя каждый из них по-разному влиял на изменения фаз клеточного цикла. При коррекции кверцетином

активация регенерации ткани печени у крыс происходила за счет усиления процессов синтеза ядерной ДНК и деполиплоидизации клеток печени. Применение глутаргина способствовало регенерации ткани печени за счет активации процессов пролиферации, о чем свидетельствует достоверное увеличение диплоидных ядер клеток печени, а также уменьшение фрагментации ядерной ДНК гепатоцитов.

Морфофункциональными особенностями хронического алкогольного повреждения печени являются структурные изменения паренхимы у крыс разного возраста. Обнаружены дистрофические и некротические изменения с преобладанием жировой и белковой паренхиматозной дистрофии в печени, а также развитие колагеновых волокон, которые были более выражены у неполовозрелых и старых животных. При морфометрическом исследовании у крыс разного возраста с хронической алкогольной интоксикацией увеличивался объем поврежденных клеток печени и уменьшался объем двухядерных гепатоцитов. Коррекция кверцетином и глутаргином восстанавливала гистологическую структуру ткани печени с уменьшением некротических и дистрофических изменений паренхимы печени. Однако введение глутаргина в большей степени по сравнению с кверцетином влияло на восстановление структуры печени за счет активации регенерации ткани печени.

Ключевые слова: возрастные особенности, крысы, печень, алкогольное повреждение, регенерация, кверцетин, глутаргин.

ABSTRACT

Yarovenko L.O. Age features of the liver's injury and regeneration in rats with chronic alcohol intoxication, the ways of those disorders correction.– Manuscript.

Thesis for scientific degree of candidate of biological sciences by specialty 03.00.04 – Biochemistry. – State Higher Educational Institution “I. Horbachevsky Ternopil State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine”, Ternopil, 2016.

Dissertation is devoted to study age –features of liver tissue regeneration on a background of chronic alcohol intoxication and after correction by quercetin and glutargin. On the background of the chronic alcoholic liver damage marked quantitative increase of cytolysis and cholestasis syndrome data and liver dysfunctions in immature and old rats. An increase of nuclear DNA fragmentation with inhibition of synthetic processes in hepatocyte nuclei and polyploidization are marked at all animals. Glutargin decreases symptoms of cholestasis and cytolysis, quercetin increase protein synthetic function of liver and improves liver regeneration.

Key words: age features, rats, liver, alcoholic injury, regeneration, quercetin, glutargin.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АлАТ –	аланінамінотрансфераза	ТП –	тимолова проба
АсАТ –	аспартатамінотрансфераза	ХАУП –	хронічне алкогольне ушкодження печінки
ГГТ –	γ-глутамілтрансфераза	2с –	відсоток ядер гепатоцитів з диплоїдним набором ядерної ДНК
ЗБ –	загальний білірубін	4с –	відсоток ядер гепатоцитів з тетраплоїдним набором ядерної ДНК
IGF-1 –	інсуліноподібний фактор росту-1	8с –	відсоток ядер гепатоцитів з октаплоїдним набором ядерної ДНК
ЛФ –	лужна фосфатаза		
НБ –	непрямий білірубін		
ПБ –	прямий білірубін		

Підписано до друку 27.05.2016. Формат 60×84/16. Гарнітура Times.
Друк офсетний. Папір офсетний № 1. Ум. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам. № 133.

Видавництво «Укрмедкнига»
Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського,
майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна