

Визначення сироваткових фракцій гідроксипроліну при хронічному токсичному гепатиті у щурів на тлі корекції лізіноприлом та глутаргіном

Н.А. РИКАЛО, Ю.М. БЕРЕГОВЕНКО

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, Україна

E-mail: rikalonadia@gmail.com

E-mail: julia.bereg89@gmail.com

Хронічні захворювання печінки є актуальною проблемою сучасної клінічної медицини як в Україні, так і у світі через їх поширеність і розвиток тяжких ускладнень [1].

Сотні мільйонів пацієнтів різного віку хворіють на хронічні гепатити (ХГ), у 25–30 % із них захворювання прогресує з розвитком фіброзу та цирозу печінки [16]. Цироз печінки (ЦП) є найчастішою причиною смерті при патології шлунково-кишкового тракту і посідає 7-ме місце серед причин смерті від неонкологічних захворювань [14]. Фіброз печінки (ФП) є вирішальним чинником природного перебігу хвороб печінки будь-якої етіології, оскільки зумовлює архітектурну перебудову органа з розвитком портальної гіпертензії і печінкової недостатності. Нині немає ефективної антифібротичної терапії, а наявні заходи обмежуються застосуванням симптоматичної терапії на етапі сформованого ЦП. Великою мірою ця проблема зумовлена недостатнім розумінням молекулярних основ патогенезу ФП і чинників, що сприяють його розвитку [6,12].

ФП розвивається внаслідок трансформування ліпоцитів (клітин Іто) у фібробласти і міофібробласти [15]. При цьому основними чинниками фібротизації вважаються некроз клітин, підвищення внутрішньоклітинного тиску, викликане збільшенням розмірів гепатоцитів, гіпоксія. Особлива роль у прогресуванні фіброзу належить продуктам ПОЛ. Накопичення ТБК-активних продуктів стимулює функціональну активність ретикуло-

ендотеліоцитів (клітин Купфера), ліпоцитів і підвищення ними продукції колагену III, утворення гідроксипроліну (ГП), ініціює підсилення імунного запалення в паренхімі печінки, що в цілому викликає прогресування хронічного токсичного гепатиту (ХТГ) і трансформацію його в ЦП [8].

Відомо, що при ЦП інтенсивність процесів синтезу і розпаду колагену відображають фракції ГП [2, 3, 5]. За літературними даними [4] максимальний синтез колагену спостерігається при активному ХТГ, про що свідчить підвищення вмісту в сироватці крові пептидно-зв'язаного гідроксипроліну (ПГП), який характеризує колагеноутворення [17]. У цих хворих реєструють також вірогідне підвищення вільного гідроксипроліну (ВГП), який відображає процеси синтезу і деструкції незрілого колагену на тлі зниження еластазної активності. Зростання в сироватці крові вмісту ПГП понад 60 мкмоль/л, ВГП – понад 13 мкмоль/л вважаються високочутливими показниками фібропластичного процесу у печінці [4].

Матеріали й методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на 60 нелінійних білих лабораторних статевонезрілих щурах, з початковою масою тіла 50–70 г. Експерименти на тваринах здійснювали відповідно до Правил проведення робіт з використанням лабораторних тварин (1977), Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1986), Директиви ЄЕС № 609 (1986) та наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. «Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин».

Тварин перед початком експерименту поділили на 5 груп, по 12 щурів у кожній. Перша група – інтактні щури, друга – із хронічним токсичним гепатитом, змодельованим інтрагастральним введенням олійного розчину CCl_4 в дозі 0,1 мл/100 г маси двічі на тиждень у комбінації з 5 % розчином етанолу впродовж восьми тижнів [7]. Тваринам третьої групи паралельно із гепатотоксинами щодня протягом шести тижнів у лікувально-профілактичному режимі [9] інтрагастрально вводили лізіноприл у дозі 20 мг/кг («Лізіноприл» ТОВ «Астрафарм», Україна). Тваринам четвертої групи паралельно із гепатотоксинами щодня протягом шести тижнів у лікувально-профілактичному режимі [9] інтрагастрально вводили L-глутаргін-L-глутамат 0,75 г («Глутаргін» ТОВ «Здоров'я», Україна) по 30 мг/кг. Тварини п'ятої групи отримували інтрагастрально 20 % олійний розчин CCl_4 в дозі 0,1 мл/100 г маси двічі на тиждень у комбінації з 5 % розчином етанолу, а також L-глутаргін-L-глутамат 0,75 г («Глутаргін» ТОВ «Здоров'я», Україна) по 30 мг/кг та лізіноприл у дозі 20 мг/кг («Лізіноприл» ТОВ «Астрафарм», Україна). Після закінчення терміну експерименту тварин в умовах етаназії під тіопенталовим наркозом виводили з експерименту шляхом декапітації та проводили забір крові (для біохімічного дослідження). Кров центрифугували 15 хв при швидкості 3000 об./хв на центрифугі лабораторній ОПн-3 з виділенням плазми для подальшого біохімічного дослідження. За допомогою даних методів визначали вміст ВГП, ПГП та загального гідроксипроліну (ЗГП) в сироватці крові. Комплекс біохімічних досліджень проводили на напів-автоматичному біохімічному аналізаторі «Vital Microlab-300» (США) та на біохімічному автоматичному аналізаторі «Beckman Coulter AU-480» (США). Підготовку проб і визначення біохімічних показників проводили відповідно до інструкцій до приладів та реактивів за загальними методиками. Для оцінки процесів метаболізму сполучної тканини визначали вміст ВГП та ПГП [10, 11]. Принцип методу заснований на визначенні оптичної щільності червоного хромогену, що утворився при конденсації продуктів окиснення ГП з пара-диметиламінобензальдегідом.

Результати досліджень та їх обговорення. Установлено, що тварин із ХТГ вміст сироваткового ВГП, який відображає процеси синтезу і деструкції незрілого колагену на тлі зниження еластазної активності, збільшувався

на 23,0 % порівняно із інтактними тваринами ($p < 0,01$), ПГП – на 17,33 % ($p < 0,01$), що доводить посилення процесів ФП, а також ЗГП – на 23,68 % ($p < 0,01$).

При введенні тваринам CCl_4 на тлі лікувально-профілактичного застосування глутаргіну як препарату порівняння концентрація ВГП знижувалась на 15,14 % ($p < 0,05$) порівняно з тваринами із ХТГ, яким вводили виключно гепатотоксини, ПГП – на 17,49 % ($p < 0,01$), ЗГП – на 18,93 % ($p < 0,01$). Водночас спостерігалось наближення фракцій ГП до таких у інтактних тварин, що презентує потужний протективний ефект препарату.

При одночасному введенні тваринам гепатотоксинів та лізіноприлу теж спостерігалась позитивна динаміка, оскільки концентрація ВГП не відрізнялась від такої в інтактних тварин. Зменшувався також вміст ПЗГ на 25,62 % ($p < 0,01$) порівняно з ХТГ та ЗГП – на 24,46 % ($p < 0,01$).

При одночасному введенні тваринам CCl_4 , глутаргіну та лізіноприлу достовірно зменшувався вміст ПЗП на 41,95 % порівняно з ХТГ ($p < 0,01$), ЗГП – на 22,06 % ($p < 0,01$), тоді як ВГП не відрізнявся від такого при патології. Таким чином, комбінація даних препаратів зменшує концентрацію ГП лише за рахунок пептидозв'язаної фракції.

Фракції сироваткового ГП у щурів при ХТГ та медикаментозній корекції ($M \pm m$)

Показник	Група тварин (плазма) Вміст гідроксипроліну, мкмоль/л				
	Інтактні	CCl_4	$CCl_4+Г$	$CCl_4+Л$	$CCl_4+Л+Г$
ВГП	24,55 ± 2,09	30,20 ± 1,63**	25,63 ± 3,97#	24,73 ± 1,11##	30,43 ± 3,06**&&@
ЗГП	53,40 ± 2,42	66,05 ± 2,26**	53,55 ± 3,33##	49,90 ± 2,87***	51,48 ± 3,19##
ПГП	28,85 ± 2,31	33,85 ± 3,18**	27,93 ± 4,48##	25,18 ± 1,89***	19,65 ± 2,76**&&@

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ порівняно з інтактом; # – p з CCl_4 ; & – p з групою щурів, які отримували CCl_4 та лізіноприл; @ – CCl_4 та глутаргін.

Отже, збільшення вмісту саме ПГП як найважливішого показника колагеноутворення при моделюванні ХТГ є закономірним, оскільки даний показник є біохімічним маркером інтенсивності фіброгенезу та предиктором несприятливого перебігу захворювання. Тоді як введення одночасно гепатотоксинів з лізіноприлом достовірно зменшувало ЗГП, як за рахунок вільної, так і пептидозв'язаної фракції (див. таблицю). При комбінації лізіноприлу та глутаргіну знижувався вміст ПГП. Отримані результати, на нашу думку, можна оцінювати як позитивний лікувальний ефект інгібіторів АПФ при ФП та ЦП. Враховуючи те, що, за даними літератури [1, 13], активація ренін-ангіотензин-альстеронової системи бере участь у патогенезі процесів фіброзування на тлі хронічної патології печінки.

Таким чином, встановлено достовірне збільшення концентрації ВГП та ПГП у щурів із ХТГ. Застосування лізіноприлу як монотерапія експериментального ХТГ, а також у комбінації з глутаргіном, достовірно зменшує вміст ПГП як важливого чинника фіброзоутворення у печінці.

Висловлюємо подяку за допомогу у проведенні біохімічних досліджень НДКДЛ ВМУ ім. М.І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію №002/10 від 11 січня 2010 р., №049/15 від 02.03.2015 р.).

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабак ОЯ, Колесникова ЕВ, Кравченко НА. Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения. Сучасна гастроентерологія. 2009;2:5–17 (*Babak OYa, Kolesnykova EV, Kravchenko NA. Fybroz pecheny: souremennye predstavleniya o mekhanizmax, sposobakh dyahnostyky y lecheniya. Suchasna gastroenterolohiia. 2009;2:5–17*). 2. Белобородова ЕВ, Белобородова ЭИ, Акбашева ОЕ. Активность эластазо-, коллагеназоподобных протеиназ и их ингибиторов в плазме крови при метаболизме коллагена в условиях хронического течения заболеваний печени вирусной и токсической этиологии. Бюллетень СО РАМН. 2010;2:94–100 (*Beloborodova EV, Beloborodova ЭИ, Akbasheva OE. Aktyvnost elastazo-, kollahenazopodobnykh proteynaz y unkyhybytorov v plazme krovy pry metabolizme kollahena v usloviakh khronicheskogo techeniya zabolevaniy pecheni virusnoy i toksicheskoy etiologii. Byulleten' SO RAMN. 2010;2:94–100*). 3. Белобородова ЕВ, Белобородова ЭИ, Акбашева ОЕ. Показатели системы протеолиза и метаболизма коллагена при хроническом течении заболеваний печени вирусной и токсической этиологии. Терапевтический архив. 2010;2:29 (*Beloborodova EV, Beloborodova ЭИ, Akbasheva OE. Pokazately systemy proteolyza y metabolizma kollahena pry khronicheskom techenii zabolevaniy pecheni virusnoy i toksicheskoy etiologii. Terapevticheskiy arkhiv. 2010;2:29*). 4. Березенко ВС. Клініко-патогенетичні особливості фіброгенезу печінки при хронічних гепатитах у дітей та шляхи його медикаментозної корекції : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук : спец. 14.01.10 «Педіатрія». Київ; 2007. 39 (*Berezenko VS. Kliniko-patohenetichni osoblyvosti fibrohenezu pechinky pry khronichnykh hepatytakh u ditei ta shliakhy yoho medykamentoznoi korektsii : avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia dokt. med. nauk : spets. 14.01.10 «Pediatriia». Kyiv, 2007. 39*). 5. Косых АА. Гидроксипролиновый показатель крови как критерий активности хронических заболеваний печени у детей. Успехи современного естествознания. 2007;6:67–9 (*Kosykh AA. Gidroksiprolynovyy pokazatel krovy kak kryteryi aktyvnosti khronicheskyykh zabolevaniy pecheny u detei. Uspekhy souremennoho estestvoznaniya. 2007;6:67–9*). 6. Пентюк НО. Вплив гіпергомоцистемії на формування ССІ-індукованого фіброзу печінки у щурів. Сучасна гастроентерол. 2009;5:33–7 (*Pentuk NO. Vplyv hiperhomotsysteinemii na formuvannia CCl₄-indukovanoho fibrozu pechinky u shchuriv. Suchasna gastroenterol. 2009;5:33–7*). 7. Рукало НА, Незгода ІІ, Рауцкіс ВА. Пат. 43704 Україна, МПК (2009) G09B 23/00. Спосіб моделювання хронічного токсичного гепатиту та цирозу печінки у нестатевозрілих щурів; власник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. – № u2009 03490; заявл. 10.04.2009; опубл. 25.08.2009. Бюл. №16. (*Rykalo NA, Nezghoda II, Rautskis VA. Pat. 43704 Ukrainy, MPK (2009) G09B 23/00. Sposib modelivannia khronichnoho toksychnoho hepatytu ta tsyrozhu pechinky u nestatevozrilykh shchuriv; vlasnyk Vinnytskyi natsionalnyi medychnyi universytet im. M. I. Pyrohova. – № u2009 03490; zaiavl. 10.04.2009; opubl. 25.08.2009, Biul. №16*). 8. Скрипник ІМ, Маслова ГС. Алкогольна хвороба печінки: шляхи підвищення детоксикаційної функції печінки. Семейная медицина. 2015;6:7–15 (*Skrypnyk IM, Maslova HS. Alkoholna khvoroba pechinky: shliakhy pidvyshchennia detoksykatsiinoi funktsii pechinky. Semeinaia medytsyna. 2015;6:7–15*). 9. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). Київ: МОЗ України, Державний фармакологічний центр; 2001. 527 (*Stefanov OV. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv (metodychni rekomendatsii). Kyiv: MOZ Ukrainy, Derzhavnyi farmakolohichnyi tsentr; 2001. 527*). 10. Шараев ПН, Сахабутдинова ЕП, Лekomцева ОИ, Кошикова СВ. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови. Клини. и лаб. диагностика. 2009;1:7–9 (*Sharaev PN, Sakhabutdynova EP, Lekomtseva OY, Koshykova SV. Opredelenye svobodnoho y peptydno-svi-azannoho gidroksiprolyna v syvorotke krovy. Klynycheskaia y laboratornaia dyahnostyka. 2009;1:7–9*). 11. Шупулін ВП. Біохімічні дослідження в оцінці ефективності лікування хворих на хронічний гепатит. Лабораторна діагностика. 2006;4:17–21 (*Shypulin VP. Biokhimichni doslidzhennia v otsintsi efektyvnosti likuvannia khvorykh na khronichnyi hepatyt. Laboratorna diahnostyka. 2006;4:17–21*). 12. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J. Clin. Invest. 2005;2:209–18. 13. Lubel JS, Herath CB, Burrell LM, Angus PW. Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical implications. J. Gastroenterol. Hepatol. 2008;9:1327–38. 14. Nobili V, Parkes J, Bottazzo G, Marcellini M, Cross R, Neuman D et al. Performance of ELF Serum Markers in Predicting Fibrosis Stage in Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Gastroenterology. 2009;1:160–7. 15. Novo E, Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2009;11:2089–93. 16. Pinzani M, Rombouts K, Colagrande S. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. Journal of Hepatology. 2005;1:22–36. 17. Siddiqi N-J, Alhomida AS. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues. J. Biochem. Mol. Biol. 2003; 2:154–8.

RESEARCH ARTICLE

**Determination of serum Fractions of Hydroxyproline
at chronic toxic Hepatitis in Rats against the Background
of Correction by Lisinopril and Glutargin**

N. RIKALO, YU. BEREHOVENKO

Vinnitsa National Medical University named after M.I. Pirogov, Vinnitsa, Ukraine

E-mail: rikalonadia@gmail.com, julia.bereg89@gmail.com

The results of an experimental study on the effect of lisinopril and glutargin on the dynamics of serum hydroxyproline fractions of immature rats with chronic tetrachloromethane hepatitis are presented in the article.

Experimental studies were carried out on 60 non-linear white laboratory immature rats, with an initial body weight of 50-70 g. The animals were divided into 5 groups of 12 rats each in the beginning of the experiment. The first group is intact rats, the second group is with chronic toxic hepatitis modeled by the intragastric administration of an oily solution of CCl_4 at a dose of 0.1 ml / 100 g of weight twice a week in combination with a 5 % solution of ethanol for eight weeks [Pat. 43704 Ukraine]. Animals of the third group in parallel with hepatotoxins daily for six weeks in the treatment and prophylaxis regimen were injected lizinopril in a dose of 20 mg / kg (Lizinopril LLC Astrafarm, Ukraine). Animals of the fourth group in parallel with hepatotoxins daily for six weeks in the treatment and prophylactic regimen, L-Glutargin-L-glutamate 0.75 g (Glutargin, Health, Ukraine) was intragastrally administered at 30 mg / kg. The animals of the fifth group received an intragastric 20 % CCl_4 oil solution at a dose of 0.1 ml / 100 g of weight twice a week in combination with a 5 % solution of ethanol, as well as L-Glutargin-L-glutamate 0.75 g (Glutargin LLC, Health, Ukraine) at 30 mg / kg and lisinopril at a dose of 20 mg / kg (lisinopril «LLC Astrafarm», Ukraine).

After the end of the experimental period, animals with euthanasia under the thiopental anesthesia were removed from the experiment by decapitation and blood samples were taken (for biochemical study). Blood was centrifuged for 15 min at a speed of 3000 rpm in a laboratory centrifuge OPn-3 with a plasma release for further biochemical studies. The content of free hydroxyproline, peptide-linked hydroxyproline and total hydroxyproline in serum was determined with these methods. The complex of biochemical studies was carried out on a semi-automatic biochemical analyzer «Vital Microlab-300» (USA) and an automatic biochemical analyzer «Beckman Coulter AU-480» (USA). Preparation of samples and determination of biochemical parameters were carried out in accordance with the instructions to the devices and reagents by the general methods. To evaluate the metabolic processes of the connective tissue, the content of free hydroxyproline and peptide-bound hydroxyproline was determined. The principle of the method is based on determining the optical density of the red chromogen, formed by condensation of oxidation products of hydroxyproline with para-dimethylaminobenzaldehyde.

The increase in the content of precisely peptid-linked hydroxyproline, as the most important indicator of collagen formation, in the modeling of chronic toxic hepatitis, is natural, since this indicator is a biochemical marker of the intensity of fibrogenesis and a predictor of the unfavorable course of the disease. While the simultaneous administration of hepatotoxins with lisinopril significantly reduced the level of bound hydroxyproline, both at the expense of the free and peptide-linked fraction. With the combination of lisinopril and glutargin, the content of peptide-linked hydroxyproline was decreased. The results obtained, in our opinion, can be evaluated as a positive therapeutic effect of ACE inhibitors in fibrosis and liver cirrhosis. Given that, according to the literature, the activation of the renin-angiotensin-alsterone system is involved in the pathogenesis of fibrosis processes against the background of chronic liver pathology.

A significant increase in the concentration of free and peptide-linked hydroxyproline in rats with chronic toxic hepatitis has been established, and it has been established that lisinopril as a monotherapy of experimental chronic toxic hepatitis, and also in combination with glutargin, significantly reduces the content of peptide-linked fraction of hydroxyproline as an important factor of fibrosis in the liver.

Key words: serum hydroxyproline, chronic tetrachloromethane hepatitis, rats.