

for histological study. Additionally, the level of maternal aggression was assessed. According to the results of the study, we can conclude that the 3-fold introduction of oxytocin before the labor effects on the histophysiology of lactogenesis. The morphological changes in the alveolar glands, the lower level of synthetic and secretory activity of the milk-secreting cells of the experimental group compared to the control (0,85% NaCl solution in a dose of 0,1 ml / 100 g of body weight) were revealed. In the group kept on protein-rich diet (+20% of milk protein to standard diet) insufficient lactogenesis was observed as well, and in some cases, atrophic changes in the glandular tissue were registered. The higher level of maternal aggression and the number of episodes of acute aggressive reaction ($P < 0.05$) in the experimental groups of the lactating rats were detected. On the basis of histological studies, we can conclude that labor stimulation with oxytocin produces suppressive effect on lactogenesis.

УДК: 616.36-002.1-08:577.121.7:611.018.54

Рикало Н.А., Романенко І.В.

ВИЗНАЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ГОСТРОМУ АЛКОГОЛЬНОМУ ГЕПАТИТІ ТА ЗА УМОВ ЙОГО МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ КОРЕКЦІЇ

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова

Відомо, що одним із провідних факторів у розвитку патології печінки при гострому алкогольному гепатиті є вільнорадикальні процеси, які проявляються окислювальним стресом. Метою роботи є дослідження ролі оксидативного стресу, зокрема процесів перекисного окиснення ліпідів у механізмі розвитку експериментального гострого алкогольного гепатиту, а також вивченню стану антиоксидантної системи при даній патології та за умов проведення корекції «Корвітином» та «Глутаргіном». В експерименті було задіяно 66 білих статевозрілих щурів самців масою 120-130г. Тварини були поділені на п'ять груп: 1-ша – контроль; 2-га – тварини з гострим алкогольним гепатитом, експериментальне моделювання було проведено шляхом інтрагастрального введення 40% етанолу у дозі 20мл/кг протягом 7 днів; 3-тя група – тварини з гострим алкогольним гепатитом, яким внутрішньоочеревинно вводили «Корвітин» із розрахунку 100 мг/кг; 4-та тварини з гострим алкогольним гепатитом, яким внутрішньоочеревинно вводили «Глутаргін» із розрахунку 40 мг/кг; 5-та – тварини з гострим алкогольним гепатитом, яким внутрішньоочеревинно вводили «Корвітин» із розрахунку 100 мг/кг та «Глутаргін» із розрахунку 40 мг/кг. На підставі проведених досліджень встановлено, що гострий алкогольний гепатит супроводжується активацією процесів перекисного окиснення ліпідів, про що свідчить достовірне підвищення ТБК-активних продуктів, а також значним ослабленням антиоксидантної системи, що проявляється зниженням рівня супероксиддисмутази у сироватці крові щурів. Доведено, що лікування гострого алкогольного гепатиту із застосуванням препаратів, що володіють антиоксидантними властивостями, суттєво знижує активність процесів оксидативного стресу та сприяє підвищенню показників антиоксидантної системи. Встановлено, що «Корвітин» в якості моно- чи комплексної терапії з «Глутаргіном» проявляє крайній коригуючий вплив на вираженість оксидативного стресу та функціонального стану антиоксидантної системи у порівнянні з монотерапією «Глутаргіном».

Ключові слова: гострий алкогольний гепатит, щурі, оксидативний стрес, антиоксидантна система, «Корвітин», «Глутаргін».

Стаття пов'язана з науково-дослідною роботою, що виконується на кафедрі патофізіології ВНМУ ім. М.І. Пирогова, на тему: «Вплив гуморальних факторів на механізми розвитку патологічних процесів у печінці, спричинених дією екзо- та ендогенних чинників, та при їх корекції», номер держреєстрації 0116U007973.

Встановлено, що одним із провідних факторів у розвитку патології печінки при гострому алкогольному гепатиті (ГАГ) є вільнорадикальні процеси, які проявляються окислювальним стресом [9]. Відомо, що дані процеси супроводжуються посиленням утворенням активних форм кисню, перекисним окисненням ліпідів (ПОЛ), а також ослабленням антиоксидантної системи (АОС) [5]. В умовах алкогольної інтоксикації, що супроводжується підвищенням субстратного навантаження на ферменти детоксикації, продукція активних форм кисню значно зростає. Алкоголь та інші токсини у реакціях окиснення індуюють надлишкову продукцію і накопичення в гепато-

цитах вільних радикалів (гідроксиетильовий радикал, супероксид-аніон і гідроксильний радикал) та інших токсичних біометаболітів. Продукти ПОЛ мембранотоксичні, вони деформують мембрани клітин, порушують їх осмотичну резистентність і електричний потенціал, розривають нуклеїнові кислоти, денатурують білки, ушкоджують амінокислоти, сприяють деградації макромолекул сполучної тканини [12]. Накопичення продуктів ПОЛ призводить до ушкодження генетичного апарату клітин і гальмує клітинний поділ, пригнічує окислювальне фосфорилування і гліколіз, стимулюючи розпад лізосом, погіршує перебіг гострого запального процесу, збільшує проникність капілярів, призводячи до набряку

тканин [2]. При алкогольному пошкодженні печінки підвищується продукція прозапальних цитокінів (інтерлейкіну-8) і фактору некрозу пухлин (TNF), що призводить до хемотаксису нейтрофілів, які виділяють вільні радикали і спричиняють цитоліз гепатоцитів [14]. Таким чином, дисбаланс у рівновазі між процесами ПОЛ і АОС, що виникає під час гіперпродукції вільних радикалів або зниження активності тканинних антиоксидантів, зумовлює лавиноподібну реакцію переокиснення, яка призводить до загибелі клітин [8]. Для нейтралізації надлишкової ліпопероксидації існує ферментативна АОС, яка представлена в тому числі супероксиддисмутазою (СОД) [13].

Для розробки найбільш ефективної патогенетичної терапії ГАГ необхідне поглиблене вивчення механізмів розвитку пошкодження печінки [11], в тому числі на основі дослідження взаємозв'язків процесів ПОЛ і стану ендогенної АОС.

Мета дослідження

У зв'язку з цим метою роботи стало дослідження стану оксидативного стресу та АОС в сироватці крові щурів при ГАГ та за умов його медикаментозної корекції «Корвітином» та «Глутаргіном». Розробка групою українських учених [4] водорозчинного препарату кверцетину – «Корвітину» – усунула головний недолік таблетованих форм – низьку біодоступність. «Корвітин» має багаторівневу фармакологічну ефективність, а саме: реалізацію високого антиоксидантного потенціалу, потужну блокуючу активність 5-ліпоксигенази, імуномодулювальні властивості, а також здатність ініціювати вивільнення ділатуючого чинника – оксиду азоту ендотеліоцитами стінок судин [7]. «Глутаргін» володіє істотною цитопротекторною і антиоксидантною дією, ефективно відновлює білоксинтезуючу функцію печінки та обмін ліпідів в печінці, перевершуючи відповідну активність монопрепаратів аргініну і глутамінової кислоти [6].

Матеріали і методи дослідження

Експериментальне дослідження на тваринах було проведено з дотриманням вимог Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 230 від 2006 р.), відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург,

1986), загальних етичних принципів експериментів на тваринах, схвалених на Першому національному конгресі з біоетики (20.09.04 р., м. Київ, Україна). Експериментальне дослідження проводили на базі кафедри патологічної фізіології, у віварії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. В експерименті було задіяно 66 білих неплітних статевозрілих щурів самців масою 120-130г (середня маса – 125г). Тварини були поділені на п'ять груп: 1-ша – контроль - інтактні тварини, які утримувались за стандартних умов віварію (n=10); 2-га – тварини з ГАГ (n=20), експериментальне моделювання було проведено за методикою [10] – шляхом інтрагастрального введення 40% етанолу у дозі 20мл/кг протягом 7 днів за допомогою металевого зонду з оливою; 3-тя група – тварини з ГАГ (n=12), яким внутрішньоочеревинно вводили «Корвітин» (ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», м. Київ) із розрахунку 100 мг/кг; 4-та - тварини з ГАГ (n=12), яким внутрішньоочеревинно вводили «Глутаргін» (L-аргініну L-глутамат, Glutargin, ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків) із розрахунку 40 мг/кг; 5-та - тварини з ГАГ (n=12), яким внутрішньоочеревинно вводили «Корвітин» із розрахунку 100 мг/кг та «Глутаргін» із розрахунку 40 мг/кг.

Після виведення тварин з експерименту під тіопенталовим наркозом (з розрахунку 25мг/кг) здійснювали забір крові. Для оцінки інтенсивності процесів ПОЛ досліджували вміст ТБК – активних продуктів за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [1]. Стан АОС оцінювали за рівнем СОД, активність якої визначали за відсотком гальмування окиснення кверцетину [3].

Статистичний аналіз отриманих при виконанні роботи цифрових даних проводили за комп'ютерною програмою Microsoft Excel XP, використовуючи непараметричний U-критерій Манна-Уїтні для малих вибірок. Достовірною вважали ймовірність похибки менше 5 % (p<0,05).

Результати дослідження та їх обговорення

Інтенсивність процесів ПОЛ ми оцінювали за рівнем ТБК-активних продуктів. Отримані результати дослідження дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1
Біохімічні показники інтенсивності процесів ПОЛ та стану антиоксидантної системи за умов ГАГ і при корекції «Корвітином» та «Глутаргіном».

Показник	ТБК – активні речовини Мкмоль/л	СОД ум.од.
Група №1 (контроль)	3,88±0,48	78,3±3,15
Група №2 (ГАГ)	6,95±1,31***	57,67±5,19***
Група №3 (ГАГ+«Корвітин»)	4,744±1,43##	72,42±7,47* ###
Група №4 (ГАГ+ «Глутаргін»)	5,89±1,03***&	68,52±4,08***###
Група №5 (ГАГ+ «Глутаргін»+«Корвітин»)	4,34±1,24###	72,2±3,49*#####

Примітка: тут і надалі: * - достовірність відмінностей порівняно з контролем (* - p<0,05 ** - p<0,01 *** - p<0,001).

- достовірність відмінностей порівняно з нелікованим ГАГ (# - p <0,05 ##- p<0,01 ###- p<0,001).

& - достовірність відмінностей порівняно з ГАГ, що лікувався застосуванням «Корвітину» (p <0,05).

^ - достовірність відмінностей порівняно з ГАГ, що лікувався глутаргіном (p <0,05).

При дослідженні рівня ТБК-активних продуктів нами було встановлено, що у тварин з ГАГ значно активізувались процеси ПОЛ, що про що свідчить достовірне підвищення ТБК у даної групи тварин у порівнянні з контролем на 79,12% ($p < 0,001$). Це є, найімовірніше, результатом цитолізу гепатоцитів, зумовленого оксидантним напруженням мітохондрій [14]. Поряд з цим, рівень ТБК у тварин, які отримували лікування, достовірно був нижчим у порівнянні з нелікованими тваринами з ГАГ. Зокрема, у тварин 3-ї групи при корекції ГАГ «Корвітином» відмічено достовірне зниження активності ТБК на 31,75% ($p < 0,01$), при корекції порушень «Глутаргіном» (4-та група) – зменшення ТБК на 15,25% ($p < 0,05$) у порівнянні з патологією; та у випадку комплексного лікування ГАГ з одночасним використанням «Корвітину» та глутаргіну (5 – та група тварин), рівень ТБК був достовірно нижчим, ніж у тварин, що не лікувались на 37,5% ($p < 0,001$). При чому, показники ТБК – активних продуктів у тварин у тварин 5-ї групи лише на 11,8% був вищим за тварин 1-ї групи (контроль).

Крім того, ми дослідили, як змінюється активність процесів ПОЛ при лікуванні ГАГ «Корвітином» та «Глутаргіном». Достовірно встановлено, що у тварин 4-ї групи при лікуванні «Глутаргіном» рівень ТБК був вищим на 24,1% ($p < 0,05$) у порівнянні з 3-ю групою, тваринам якої ГАГ лікували «Корвітином». Проте, у тварин, що одночасно отримували обидва препарати в якості терапії, рівень ТБК на 8,5% ($p > 0,05$) був нижчий ніж у 3-ї групи та на 26,3% нижчий, ніж при проведенні монотерапії «Глутаргіном» (4-та група).

У якості показника, що характеризує стан АОС, ми досліджували активність СОД (таб. 1). Нами було встановлено, що рівень СОД достовірно знижувався у тварин усіх груп стосовно контролю. Зокрема, доведено, що у тварин 2-ї групи показник СОД був на 26,35% ($p < 0,001$) нижчим, ніж у 1-й групі, що зумовлено виснаженням антиоксидантних резервів організму. У тварин, яким проводилось лікування, показники дещо інші. Зокрема, в 2-й групі рівень СОД лише на 7,5% ($p < 0,05$) нижче, порівняно з контролем, у 3-й групі – на 12,49% ($p < 0,001$) та у тварин з комплексним лікуванням – на 7,79% ($p < 0,01$) менше у порівнянні з 1-ю групою. При порівнянні показників СОД у тварин, які отримували лікування та за умов нелікованого ГАГ, результати були наступними: рівень СОД у тварин 3-ї групи був вищим на 25,66% ($p < 0,001$), у 4-й групі – на 18,81% ($p < 0,001$), та у 5-й групі на 25,2% ($p < 0,001$) вищим у порівнянні із тваринами з ГАГ без лікування.

При порівнянні ефективності застосування кожного препарату, ми отримали наступні дані. Достовірно встановлено, що у тварин 4-ї групи при лікуванні «Глутаргіном» активність СОД була нижчою на 5,38% ($p > 0,05$) у порівнянні з 3-ю групою, тваринам якої ГАГ лікували «Корвітином». Проте, у тварин, що одночасно отримували

ли обидва препарати в якості терапії, активність СОД майже не відрізнялась від 3-ї групи і була лише на 0,3 % ($p > 0,05$) нижчою, та достовірно підвищувалася на 5,3% ($p < 0,05$) у порівнянні з 4-ю групою тварин.

Висновки

Таким чином, встановлено, що в патогенезі ГАГ провідне значення має порушення рівноваги між активацією оксидативного стресу та стану АОС, про що свідчить встановлене нами достовірне підвищення вмісту продуктів ПОЛ та зниження активності ферментів АОС.

Достовірно встановлено, що «Корвітин» в якості моно- чи комплексної терапії з «Глутаргіном» проявляє виражений коригуючий вплив на процеси оксидативного стресу (знижує рівень ТБК-активних продуктів) та значно покращує функціональний стан АОС (сприяє підвищенню активності СОД). В той же час результати дослідження вказують на незначно виражені антиоксидантні властивості «Глутаргіну» за умов використання його у якості монотерапії.

Враховуючи важливу роль оксидативного стресу у розвитку ГАГ подальша розробка патогенетичної терапії, направленої на підвищення активності АОС, є важливим медичним та соціальним завданням.

Література

1. Владимиров Ю.В. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.В. Владимиров, А.И. Арчаков – М.: Наука, 1972. – 252 с.
2. Говоруха О.Ю. Значення взаємодії перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантних систем в розвитку патологічних процесів / О.Ю. Говоруха, О.Ю. Шнайдерман // Теоретична і експериментальна медицина – 2016. - №4 (73). - С. 10-14
3. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. - №2. - С. 88-91
4. Пат. 23996 Україна МПК C08F271/02. Спосіб одержання корвітину / Максютин Н.П., Мойбенко О.О., Пилипчук П.Б.; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7 - 4с.
5. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др.]. – Москва, 2006 – 556с.
6. Меркулова Ю.В. Фармакологічне дослідження L-аргініну L-глутамату (глутаргіну) як гіпоамоніємічного і гепатопротекторного засобу : автореф. дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук / Ю.В. Меркулова; НАН України. - Одеса – 2002. – 18с.
7. Михейцева І.М. Ефективність застосування корвітину при первинній глаукомі / І.М. Михейцева, Л.Т. Кашицева., О.В. Артемов, Н.І. Храменко // Фізіол. журн. – 2012. - Т. 58, № 6. – С. 81-88.
8. Овсянникова Л.М. Проблеми порушень окислительного гомеостазу і антиоксидантної терапії / Л.М. Овсянникова, С.М. Алехина, О.В. Дробинская [и др.] // Гастроэнтерология. – 2001. – №59. - С. 322-327.
9. Панченко Л.Ф. Окислительный стресс при алкогольной болезни печени / Л.Ф. Панченко, Б.В. Давыдов, Н.Н. Теребилина, В.Ю. Баронец // Биомедицинская химия - 2013. – Т.59, №4.- С. 452-458
10. Пат. 108687 Україна МПК G01N 33/576 (2006.01). Спосіб моделювання гострого алкогольного гепатиту у щурів / Рикало Н.А., Романенко І.В.; власник Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова. - №1 2016 01093; заявл. 08.02.2016; опубл. 25.07.2016, Бюл. №14. – 4с.
11. Рикало Н.А. Патогенез хронічних вірусних гепатитів В і С у дітей: вікові особливості, патогенетична терапія (експериментально-клінічне дослідження: автореф. дис. на здобуття наук. Ступеня доктора мед. наук : спец. 14.03.04 «Патологічна фізіологія» / Н.А. Рикало. – Тернопіль, 2011 – 36ст.
12. Рикало Н.А. Сучасні погляди на патогенез гострого алкогольного гепатиту і можливості його лікування / Н.А. Рикало, І.В. Ро-

- маненко // Вісник Вінницького національного медичного університету. - 2014. - Т. 18, №2. - С. 641 – 645.
13. Скворцов В.В. Peroxidация липидов и антиоксидантная система в гепатологии / В.В. Скворцов // Гепатология. - 2003. - №3. - С. 7-13.
14. Basu S. Carbontetrachloride-induced lipidperoxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients / S. Basu // Toxicology. - 2003. - Vol. 189 (1-2). - P. 113-127.

Реферат

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ АЛКОГОЛЬНОМ ГЕПАТИТЕ И ПРИ УСЛОВИИ ЕГО МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ.

Рыкало Н.А., Романенко И.В.

Ключевые слова: острый алкогольный гепатит, крысы, оксидативный стресс, антиоксидантная система, «Корвитин», «Глутаргин».

Известно, что одним из ведущих факторов в развитии патологии печени при остром алкогольном гепатите является свободнорадикальные процессы, которые проявляются окислительным стрессом. Целью работы является исследование роли оксидативного стресса, включая процессы перекисного окисления липидов в механизме развития экспериментального острого алкогольного гепатита, а также изучению состояния антиоксидантной системы при данной патологии и в условиях проведения коррекции «Корвитином» и «Глутаргином». В эксперименте было задействовано 66 белых половозрелых крыс самцов массой 120-130г. Животные были разделены на пять групп: 1-я контроль; 2-я - животные с острым алкогольным гепатитом, экспериментальное моделирование было проведено путем интрагастрального введения 40% этанола в дозе 20 мл / кг в течение 7 дней, 3-я группа - животные с острым алкогольным гепатитом, которым внутривентрально вводили «Корвитин» из расчета 100 мг / кг; 4 -животные с острым алкогольным гепатитом, которым внутривентрально вводили «Глутаргин» из расчета 40 мг / кг; 5-я - животные с острым алкогольным гепатитом, которым внутривентрально вводили «Корвитин» из расчета 100 мг / кг и «Глутаргин» из расчета 40 мг / кг. На основании проведенных исследований установлено, что острый алкогольный гепатит сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует достоверное повышение ТБК-активных продуктов, а также значительным ослаблением антиоксидантной системы, что проявляется снижением уровня супероксиддисмутазы в сыворотке крови крыс. Доказано, что лечение острого алкогольного гепатита с применением препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, существенно снижает активность процессов оксидативного стресса и способствует повышению показателей антиоксидантной системы. Установлено, что «Корвитин» в качестве моно- или комплексной терапии с «Глутаргином» проявляет лучшее корректирующее влияние на выраженность оксидативного стресса и функционального состояния антиоксидантной системы по сравнению с монотерапией глутаргином.

Summary

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT SYSTEM PARAMETERS IN BLOOD SERUM OF RATS WITH ACUTE ALCOHOLIC HEPATITIS AND UNDER ITS THERAPUTIC CORRECTION.

Rykalo N.A., Romanenko I.V.

Key words: acute alcoholic hepatitis, rats, oxidative stress, antioxidant system, Corvitin, Glutargin.

It is known that one of the leading factors in the development of liver pathology in acute alcoholic hepatitis are free radical processes that manifest themselves as oxidative stress. The purpose of the work is to study the role of oxidative stress, in particular lipid peroxidation processes in the mechanism of the development of experimental acute alcoholic hepatitis, as well as to investigate the state of the antioxidant system affected with the pathology and during the correction of Corvitin and Glutargin. 66 white mature male rats weighing 120-130 g were involved into the experiment. The animals were divided into five groups: 1st – control; 2nd – animals with acute alcoholic hepatitis modeled by intragastric administration of 40% ethanol at 20 ml / kg body wt for 7 days. 3rd group was made up of the animals with acute alcoholic hepatitis who received Corvitin intraperitoneally at 100 mg / kg body weight ; 4 animals with acute alcoholic hepatitis who received glutargin intraperitoneally at 40 mg / kg body weight; 5th - animals with acute alcoholic hepatitis received Corvitin intraperitoneally at 100 mg / kg and Glutargin at 40 mg / kg of body wt. On the basis of the research, it has been established that acute alcoholic hepatitis is accompanied by activation of lipid peroxidation processes, as evidenced by a significant increase in TBC-active products, as well as a significant weakening of the antioxidant system, which is manifested by a decrease in superoxide dismutase levels in rat serum. It has been proved that the treatment of acute alcoholic hepatitis with the medication having antioxidant properties significantly reduces the activity of oxidative stress and promotes an increase in the antioxidant system. It has been established that Corvitin used as a mono- or complex therapy with Glutargin shows a better corrective effect on the severity of oxidative stress and the functional state of the antioxidant system in comparison with Glutargin monotherapy.