

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 616.36–004–021.6

DOI: 10.26779/2522-1396.2017.10.62

РОЛЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДАЦІЇ В МЕХАНІЗМАХ ПАТОГЕНЕЗУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ

О. Ф. Дзигал, Ж. О. Новікова, Ю. Є. Кокоріна, Р. С. Вастьянов

Одеський національний медичний університет

THE ROLE OF PEROXIDATION PROCESSES IN MECHANISMS OF THE EXPERIMENTAL HEPATIC CIRRHOSIS PATHOGENESIS

O. F. Dzygal, Zh. O. Novikova, Yu. E. Kokorina, R. S. Vastyanov

Odessa National Medical University

Реферат

Вступ. Лікування хворих з приводу цирозу печінки (ЦП), печінкової недостатності та їх ускладнень, а також запального і фіброзного ураження паренхіми печінки є актуальною проблемою хірургічної гастроентерології. Ефективність діагностики й лікування дифузних захворювань печінки недостатня. Нами проведені фундаментальні дослідження для з'ясування механізмів патогенезу некрозу гепатоцитів.

Матеріали і методи. На експериментальній моделі ЦП досліджені зміни концентрації проміжних продуктів ліпопероксидації та активності антиоксидантних ферментів у крові, еритроцитах, паренхімі підшлункової залози та печінки щурів.

Результати. Встановлено, що формування ЦП в експерименті супроводжується накопиченням малонового діальдегіду, а також пригніченням активності антиоксидантних ферментів в крові, еритроцитах, а також паренхімі підшлункової залози та печінки щурів.

Обговорення. Дисбаланс у функціональній системі ліпопероксидація – система антиоксидантного захисту – один з провідних механізмів патогенезу синдрому поліорганної недостатності при ЦП.

Висновок. В комплекс патогенетично обґрунтованої корекції ЦП або печінкової недостатності слід включати препарати з антиоксидантними властивостями.

Ключові слова: цироз печінки; еритроцити; підшлункова залоза; ліпопероксидація; антиоксидантні ферменти; комплексна патогенетична терапія; експеримент.

Abstract

Introduction. Treatment of patients, suffering hepatic cirrhosis, hepatic insufficiency and their complications, as well as the inflammatory and fibrous hepatic parenchyma affection, constitutes an actual problem of surgical gastroenterology. Efficacy of diagnosis and treatment of diffuse hepatic diseases is insufficient. Fundamental investigations were conducted for revealing of pathogenetic mechanisms of the hepatocytic necrosis.

Materials and methods. The changes in concentration of intermediate products of lipoperoxidation and in the antioxidant enzymes activity in the blood, erythrocytes, pancreatic and hepatic parenchyma of rats were investigated on the hepatic cirrhosis experimental simulation model.

Results. There was established, that formation of hepatic cirrhosis in experiment accompanies accumulation of malonic dialdehyde, inhibition of the antioxidant enzymes activity in the blood, erythrocytes, as well as in pancreatic and hepatic parenchyma of rats.

Discussion. Unbalance in functional system of lipoperoxidation – the antioxidant defense system – constitutes one of leading mechanisms of pathogenesis in the polyorgan insufficiency syndrome in hepatic cirrhosis.

Conclusion. In complex of pathogenetically substantiated correction of hepatic cirrhosis or hepatic insufficiency the preparations with antioxidant properties must be included.

Keywords: hepatic cirrhosis; erythrocytes; pancreatic gland; lipoperoxidation; antioxidant enzymes; complex pathogenetic therapy; experiment.

Лікування хворих з приводу ЦП, печінкової недостатності та їх ускладнень, а також запального і фіброзного ураження паренхіми печінки є актуальною проблемою хірургічної гастроентерології [1, 2]. Фахівців і пацієнтів не задовольняє ефективність діагностики й лікування (в тому числі мініінвазивно-

го) дифузних захворювань печінки [3, 4]. Слід відзначити, поряд з медичною, економічну й соціальну значущість проблеми, оскільки, крім високої захворюваності і смертності, захворювання печінки спричиняють суттєві економічні втрати, пов'язані з витратами на лікування пацієнтів, їх реабілітацію та післяоперацій-

ну терапію, а також переважно працездатний вік хворих – 30 – 40 років [5]. Окремою медичною проблемою є клінічне прогресування ЦП з формуванням портальної гіпертензії, раку печінки [6]. Такий стан справ зумовлений поєднанням недостатніх уявлень про механізми патогенезу печінкової недостатності і ЦП,

а також відсутністю адекватних схем комплексної патогенетично обгрунтованої терапії захворювання. Тому, маючи багаторічний досвід клінічного спостереження таких хворих, ми провели фундаментальні дослідження для з'ясування механізмів патогенезу некрозу гепатоцитів. З огляду на системні порушення у хворих за ЦП, швидкість появи гепатоцелюлярної недостатності, а також формування синдрому поліорганної недостатності з включенням у патологічний процес підшлункової залози, жовчного міхура, шлунка, судинного компонента, ми припустили вплив одного з типових патологічних процесів, яким є запалення, на патогенез ЦП [7].

Мета дослідження: оцінити вираженість процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в організмі тварин в умовах експериментального ЦП; порівняти вираженість ПОЛ в паренхімі печінки і підшлункової залози, а також порушення пероксидації в еритроцитах.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження проведені в умовах хронічного до-

сліду на 80 щурах-самцях масою тіла 250 – 320 г, відповідно до вітчизняних і міжнародних рекомендацій, норм і вимог з використання лабораторних тварин в експериментальних дослідженнях, а також вимог комісії з біотики Одеського національного медичного університету.

ЦП моделювали у щурів шляхом токсичного ураження печінки гепатотропною отрутою – чотиріхлористим вуглецем (CCl₄), що справляє прямий цитолітичний вплив на паренхіму печінки [8]. Розчин CCl₄ готували з чистого (99,99%) препарату шляхом додавання рафінованої соняшникової олії (кінцева концентрація розчину 50%) і вводили всередину за допомогою пластикового зонда двічі на тиждень протягом 10 тиж (основна група). Тваринам контрольної групи (n = 9) в аналогічних умовах вводили 0,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

Наявність ЦП верифікували після діагностичної лапаротомії з біопсією за даними гістологічного дослідження у тварин основної та контрольної груп.

Протягом експерименту від гострої печінкової недостатності загинула 21 (26,3%) тварина. Щурам, які

вижили, здійснювали евтаназію шляхом передозування етамінал-натрію (100 мг/кг, внутрішньоочеревинно) через 12 год, 1, 3, 5 і 7 діб після формування експериментального ЦП. В усіх тварин видаляли печінку і підшлункову залозу, готували гомогенат, зразки тканин гомогенізували в середовищі 10 ммоль трис-НСІ буфера (рН = 7,4) у співвідношенні 1:9. Для отримання цілісної фракції гомогенат центрифугували протягом 10 хв з швидкістю 3000 g при температурі (0 ± 2)° С. Супернатант використовували для визначення концентрації проміжних продуктів ліпопероксидації – малонового діальдегіду (МДА), дієнових кон'югатів (ДК), а також активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД), глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Вміст продуктів ПОЛ визначали за стандартною методикою [9, 10]; активність СОД – за ступенем гальмування відновлення нітросинього тетразолію в присутності NADH і фенозинметасульфату [11]; активність глутатіонпероксидази – за швидкістю окиснення глутатіону в присутності гідропероксиду третинного бутилу [12]; активність NADPH-глутатіон-

Таблиця 1. Концентрація продуктів ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів в крові щурів в різні строки після відтворення ЦП

Показник	Величина показника у різні строки спостереження ($\bar{x} \pm m$)					
	контрольна група (n = 9)	12 год	1-ша доба	3-тя доба	5-та доба	7-ма доба
МДА, нмоль/л	1,41±0,11	2,69±0,18*	3,77±0,29*	4,41±0,37*	3,86±0,26*	2,27±0,23*
ДК, мкмоль/л	0,41±0,05	0,70±0,07*	0,86±0,08*	0,97±0,11*	0,84±0,07*	0,67±0,06*
Каталаза, ум. од.	1,92±0,13	1,31±0,13*	1,18±0,12*	1,08±0,10*	1,21±0,11*	1,49±0,14*
СОД, од/мл	2,79±0,17	1,68±0,16*	1,56±0,14*	1,48±0,13*	1,62±0,17*	1,97±0,20*
Загальний глутатіон, ммоль	20,1±0,6	15,7±1,1*	15,1±1,0*	14,4±1,2*	15,6±1,3*	16,6±1,3
α-токоферол, мкмоль/мл	51,8±3,7	38,9±3,8*	35,9±3,5*	33,4±3,3*	36,2±3,7*	37,3±3,6*

Примітка. * - різниця показників вірогідна порівняно з такими в контрольній групі (p < 0,05, статистичний критерій ANOVA). Те ж у табл. 2 – 4.

Таблиця 2. Концентрація продуктів ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів в еритроцитах крові щурів в різні строки після відтворення ЦП

Показник	Величина показника у різні строки спостереження ($\bar{x} \pm m$)					
	контрольна група (n = 9)	12 год	1-ша доба	3-тя доба	5-та доба	7-ма доба
МДА, нмоль/л	2,0±0,2	3,2±0,3*	4,6±0,4*	4,9±0,5*	3,7±0,4*	3,3±0,4*
ДК, мкмоль/л	3,1±0,3	4,2±0,4*	7,1±0,6*	7,6±0,7*	6,3±0,7*	4,6±0,4*
Каталаза, мккат/мл × с	2,9±0,2	2,0±0,2*	1,6±0,2*	1,3±0,2*	2,1±0,2*	2,5±0,3
СОД, ум. од.	2,5±0,2	1,6±0,2*	1,3±0,1*	1,4±0,2*	1,8±0,2*	2,0±0,2
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв × л	3,3±0,3	2,0±0,2*	1,8±0,2*	1,4±0,2*	2,3±0,2	2,6±0,2
Глутатіонредуктаза, мккат НАДФН/л	1,4±0,1	0,9±0,1*	0,7±0,1*	0,8±0,1*	1,0±0,1*	1,2±0,1

Таблиця 3. Концентрація продуктів ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів в паренхімі печінки щурів в різні строки після відтворення ЦП

Показник	Величина показника у різні строки спостереження ($\bar{x} \pm m$)					
	контрольна група (n = 9)	12 год	1-ша доба	3-тя доба	5-та доба	7-ма доба
МДА, мкмоль/г	2,82±0,23	5,21±0,41*	6,43±0,51*	5,49±0,42*	4,87±0,31*	3,82±0,27
ДК, мкмоль/г	0,41±0,06	0,94±0,09*	1,12±0,10*	1,06±0,10*	0,88±0,08*	0,46±0,05
СОД, од/г	1,86±0,17	1,07±0,07*	1,03±0,07*	1,00±0,06*	1,14±0,09*	1,44±0,11
Глутатіонпероксидаза, од/г	2,56±0,21	1,34±0,13*	1,21±0,11*	1,29±0,11*	1,49±0,12*	1,66±0,16
Глутатіонредуктаза, од/г	2,66±0,13	1,62±0,14*	1,32±0,11*	1,41±0,12*	1,78±0,14*	2,19±0,17

Таблиця 4. Концентрація продуктів ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів в паренхімі підшлункової залози щурів в різні строки після відтворення ЦП

Показник	Величина показника у різні строки спостереження ($\bar{x} \pm m$)					
	контрольна група (n=9)	12 год	1-ша доба	3-тя доба	5-та доба	7-ма доба
МДА, мкмоль/г	2,87±0,19	4,82±0,33*	5,11±0,41*	4,59±0,29*	3,61±0,21*	3,14±0,23
ДК, мкмоль/г	0,47±0,05	0,85±0,08*	0,92±0,08*	0,67±0,09*	0,55±0,08	0,43±0,04
СОД, од/г	1,79±0,17	1,05±0,08*	0,98±0,08*	1,29±0,08*	1,44±0,12	1,74±0,14
Глутатіонпероксидаза, од/г	2,71±0,19	1,47±0,12*	1,31±0,11*	1,82±0,13*	2,04±0,16	2,30±0,18
Глутатіонредуктаза, од/г	2,59±0,14	1,67±0,12*	1,43±0,12*	1,71±0,13*	2,19±0,17	2,54±0,21

редуктази – за швидкістю відновлення окисненого глутатіону в присутності NADPH [13].

За стандартною методикою визначали вміст в плазмі крові та еритроцитах щурів МДА і ДК [9, 10], активність СОД [11], активність загального глутатіону [13], вміст α -токоферолу [14] в модифікації [15].

Отримані результати обробляли статистично з використанням One Way Analysis Of Variance Criteria. Відмінності вважали достовірними за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

У крові щурів основної групи відзначали істотне накопичення МДА і ДК, концентрація яких через 12 год досягла відповідно (2,69 ± 0,18) нмоль/л і (0,70 ± 0,07) мкмоль/л, що в 1,9 разу ($p < 0,05$) і 1,7 разу ($p < 0,05$) перевищувало відповідні показники в контрольній групі (табл. 1). У подальшому вміст МДА і ДК продовжував збільшуватися, досягаючи максимуму на 3-тю добу патологічного процесу, коли досліджувані показники в 3,1 і 2,4 разу перевищували такі в контролі ($p < 0,05$). В подальшому відзначали деяке зниження рівня МДА і ДК, проте, на 7-му добу він був істотно вищим, ніж в контролі ($p < 0,05$). В крові щурів виявлене істотне зменшення активності антиокси-

дантних ферментів – каталази, СОД, глутатіону і α -токоферолу, яка була мінімальною у 1 – 3-тю добу після відтворення експериментального ЦП ($p < 0,05$). В подальшому активність досліджуваних ферментів не відновлювалась до 7-ї доби досліді ($p < 0,05$).

Зміни концентрації проміжних продуктів ПОЛ в еритроцитах крові свідчили про інтенсивні патобіохімічні зрушення в еритроцитах протягом 1 – 5 діб експериментального ЦП, максимальну концентрацію МДА і ДК відзначали на 3-тю добу, вона у 2,5 разу ($p < 0,05$) перевищувала таку в контрольній групі (табл. 2). Активність каталази, СОД, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази була мінімальною на 3-тю добу ($p < 0,05$).

У тканині печінки при експериментальному ЦП спостерігали істотне збільшення концентрації МДА і ДК, вже через 12 год після відтворення патологічного стану вона була відповідно на 85 і на 129% більшою, ніж у тварин контрольної групи ($p < 0,05$, табл. 3). Максимальне накопичення проміжних продуктів ліпопероксидації відзначали у 1-шу добу ($p < 0,05$) з незначним зменшенням на 3-тю і 5-ту добу ($p < 0,05$). На 7-му добу досліді досліджувані показники не різнилися в основній і контроль-

ній групах ($p > 0,05$).

Аналогічно змінювалася активність антиоксидантних ферментів – СОД, глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази.

Перебіг експериментального ЦП супроводжувався збільшенням концентрації МДА і ДК і пригніченням активності антиоксидантних ферментів в паренхімі підшлункової залози (табл. 4).

Максимальні зміни виявляли через 24 год і протягом 3 діб після відтворення експериментального ЦП ($p < 0,05$), далі ці показники були порівнянними в основній і контрольній групах ($p > 0,05$).

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати дозволяють сформулювати такі основні положення щодо патофізіологічних механізмів експериментального ЦП. По-перше, експериментальний ЦП супроводжується інтенсифікацією процесів ліпопероксидації, що проявляється накопиченням проміжних продуктів ПОЛ і зниженням активності ферментної і неферментної ланок системи антиоксидантного захисту. Подібні факти узгоджуються з думкою інших дослідників [16, 17] про патогенетичну роль інтенсифікації процесів ПОЛ під час деяких патологічних процесів,

у тому числі запалення, підвищення температури, впливу радіації тощо. По-друге, отримані дані свідчать про залучення клітинного апарату крові, а саме еритроцитів, в механізми патогенезу загибелі гепатоцитів, оскільки в самих еритроцитах спостерігали односпрямовані з такими у плазмі крові збільшення концентрації продуктів ПОЛ і зниження активності антиоксидантних ферментів. Підсумовуючи ці результати і висловлені припущення, відзначимо, що генералізація патологічного процесу при ЦП пояснює як його швидкість, так і поширення патологічних змін клітин, це слід обов'язково брати до уваги в клінічних умовах при визначенні тактики лікування хворих.

По-третє, досліджені супутні процеси інтенсифікації ПОЛ і пригнічення системи антиоксидантного захисту, що відбуваються безпосередньо в тканинах печінки. Ці дані пояснюють швидкість прогресування, значне поширення і необоротність деструкції клітин при ЦП. По-четверте, з огляду на анатоміч-

ну близькість, спільність функціонування і схожих з такими в паренхімі печінки порушень, що проявлялися зсувом динамічної рівноваги в системі «ПОЛ – система антиоксидантного захисту» в бік активації процесів ліпопероксидації, чітко визначене дещо менш виражене, ніж в тканині печінки, накопичення продуктів ПОЛ і пригнічення системи антиоксидантного захисту в паренхімі підшлункової залози.

З огляду на патофізіологічні механізми формування синдрому поліорганної недостатності при ЦП, фіброзі печінки, портальній гіпертензії та/або печінковій недостатності, виявлення інтенсифікації процесів ліпопероксидації і пов'язаного з цим пригнічення активності системи антирадикального захисту, важливим при виборі тактики комплексної патогенетично обґрунтованої терапії ЦП є включення препаратів з антиоксидантними властивостями, що сприятиме полегшенню і/або запобіганню деструкції гепатоцитів і формуванню печінкової недостатності.

ВИСНОВКИ

1. Формування ЦП в експериментальних умовах супроводжується накопиченням проміжних продуктів ПОЛ і зниженням активності ферментної та неферментної ланок системи антиоксидантного захисту.

2. В патогенетичних механізмах загибелі гепатоцитів важливу роль відіграє деструкція еритроцитів, що підтверджене збільшенням в них концентрації продуктів ПОЛ та зниженням активності антиоксидантних ферментів.

3. В патогенезі гепатоцелюлярної недостатності важливе значення мають патобіохімічні зміни в тканині підшлункової залози.

4. В комплекс патогенетично обґрунтованої корекції ЦП або печінкової недостатності доцільно включати препарати з антиоксидантними властивостями.

REFERENCES

1. Cook NA, Kim JU, Pasha Y, Crossey MM, Schembri AJ, Harel BT, et al. A pilot evaluation of a computer-based psychometric test battery designed to detect impairment in patients with cirrhosis. *Int J Gen Med.* 2017;(10):281–9.
2. Grgurevic I, Bokun T, Bozin T, Matic V, Haberle S, Sporea I. Non-invasive diagnosis of portal hypertension in cirrhosis using ultrasound based elastography. *Med Ultrason.* 2017;(19):310–7.
3. Grubnik VV, Koval'chuk AL, Zagorodnyuk ON, Grubnik YuV. Endovascular surgery in the complex treatment of patients with cholelithiasis with concomitant liver cirrhosis. *Ukr J Surg.* 2009;(5):58–60. [In Russian].
4. Zakharash MP, Zaverly LG, Stel'makh AI, Zakharash YuM, Bekmuradov AR, Kalashnikov AA, et al. Surgical tactics in acute cholecystitis and its complications in patients with increased operational and anesthetic risk. *Kharkiv Surg School.* 2007;4(27):92–6. [In Russian].
5. Borisov AE, Andreev GN, Zemlyanoi VP. Modern methods of surgical correction of ascitic syndrome in cirrhosis. SPb: Medicina; 2000. 222 s. [In Russian].
6. Yeramishantsev AK, Manuk'yan GV. "Today" and "tomorrow" of portal hypertension surgery: a view at the problem. *Annaly hirurgicheskoy hepatologii.* 1998;(2):72–7. [In Russian].
7. Sologub TV, Romantsov MG, Kremen NV. Free-radical processes and inflammation (pathogenic, clinical and therapeutic aspects). Moscow: "Academy of Natural Sciences" Publisher; 2008. 350 s. [In Russian].
8. Galperin EI. Liver cirrhosis and ascites induction in the experiment. *Exp Surg.* 1960;(1):46–4. [In Russian].
9. Andreeva LI, Kozhemyakin LA, Kishkun AA. Modification of method for determining the lipid peroxide in the test with thiobarbituric acid. *Labs.* 1998;(11):41–6. [In Russian].
10. Kogan VS, Orlov ON, Prilipko LL. Problem of analysis of endogenous lipid peroxidation products. Moscow: Medicina; 1988. 287 s. [In Russian].
11. Dubinina YeYe, Salnikova LA, Yefimova LF. The activity of superoxide dismutase and erythrocyte isoenzyme spectrum of human plasma. *Labs.* 1983;(10):30–3. [In Russian].
12. Moin VM. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Ibid.* 1986;(12):724–7. [In Russian].
13. Vlasova SN, Shabunina Yel, Pereslegina IA. The activity of glutathione-dependent enzymes of red blood cells in chronic liver diseases in children. *Ibid.* 1990;(8):19–21. [In Russian].
14. Kisilevich RSh, Skvarko SI. Determination of vitamin E in the blood. *Ibid.* 1972;(8):473–5. [In Russian].
15. Rudakova-Shilina MK, Matykhova NP. Evaluation of antioxidant system. *Ibid.* 1982;(1):19–22. [In Russian].
16. Gozhenko AI, Nasibullin BA, Kohno YuS. On the state of redox processes in the mucosa of duodenal ulcer in the dynamics of the process. *Odessa Med J.* 1998;(1):31–2. [In Ukrainian].
17. Morsy MA. Protective effect of lisinopril on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Ind J Pharmacol.* 2011;(43):652–5.