ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М. І. ПИРОГОВА
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ОЛІЙНИК ЮЛІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК: 616.36-003.93:616.61-003.93:661.722+621.315.615.9

МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ ТА РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ І НИРОК ЩУРІВ В УМОВАХ ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ І ЕТАНОЛОМ, ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів має посилання на відповідне джерело _(підписано ЕП)__Ю.М. Олійник

Науковий керівник:
Рикало Надія Анатоліївна,
доктор медичних наук, професор

Вінниця – 2022

АНОТАЦІЯ

Олійник Ю.М. Механізми ушкодження та регенерації тканини печінки і нирок щурів в умовах хронічного токсичного ураження тетрахлорметаном і етанолом, шляхи корекції. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2022.

Дисертація присвячена вивченню механізмів пошкодження та регенерації тканин печінки й нирок щурів за хронічного токсичного ураження тетрахлорметаном й етанолом і на тлі корекції лізиноприлом та референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом.

Дослідження виконані на 96 білих нелінійних статевонезрілих щурах-самицях віком з масою тіла 60-80 г. Тварини були поділені на чотири групи: 1 група – інтактні щурі; 2 група – тварини з хронічним токсичним гепатитом, який моделювали шляхом інтрагастрального введення 20% олійного розчину тетрахлорметану в дозі 0,1 мл/100 г маси двічі на тиждень у комбінації з 5% розчином етанолу протягом 8 тижнів; 3 і 4 групи - тварини з хронічним токсичним гепатитом, які протягом 8 тижнів отримували лікування відповідно лізиноприлом (20 мг/кг/добу, інтрагастрально) та референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом (35мг/кг/добу, інтрагастрально). В сироватці крові визначали вміст трансформуючого фактору росту бета (TGF-β) та інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1) імуноферментними методами. В пост'ядерних супернатантах гомогенатів печінки та нирок визначали вміст вільного гідроксипроліну, а в сироватці крові оцінювали рівні вільного, пептидозв'язаного та загального гідроксипроліну за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом спектрофотометричним методом. Вміст ДНК в ядрах клітин печінки та нирок визначали методом проточної цитометрії. Структурні зміни в тканинах печінки та нирок оцінювали морфологічними

методами. Статистичний аналіз отриманих цифрових результатів здійснювали на персональному комп'ютері за допомогою комп'ютерних прикладних програм MS Excel, SPSS22 for Windows.

Встановлено, що за хронічного токсичного гепатиту (індукованого тетрахлорметаном і етанолом) та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом реєструються зміни фракційного розподілу гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові щурів. Так, введення тетрахлорметану й етанолу викликає ремоделювання сполучної тканини та розвиток фіброзу в печінці та нирках, про що доказово свідчить вірогідне зростання вмісту вільного гідроксипроліну (на 23,3-52,7% в печінці, нирках та сироватці крові, $p<0,05$), пептидозв'язаного гідроксипроліну (на 17,4% в сироватці крові, $p<0,05$) та загального гідроксипроліну (на 23,8% сироватці крові, $p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. За цих умов застосування інгібітору ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприлу виявляє антифіброгенну дію в печінці та нирках (вміст вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові на 18,2-24,7% менший, порівняно з нелікованими тваринами, $p<0,05$), яка перевищує таку в L-аргініну L-глутамату.

З'ясовано важливу роль сигнальних молекул TGF-β та IGF-1 в механізмах пошкодження й регенерації тканин печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту і на тлі корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом. За хронічного токсичного гепатиту відмічається вірогідне зростанням вмісту TGF-β та IGF-1 в сироватці крові (в середньому на 13-14%, $p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи. Рівні TGF-β та IGF-1 в сироватці крові достовірно та прямо корелюють з маркерами фіброзу - вмістом вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові ($r=0,55-0,82$, $p<0,05$). Введення лізиноприлу за хронічного токсичного гепатиту викликає достовірне зниження сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1 ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами, що асоціюється зі зменшенням виразності фіброзу в печінці та нирках ($r=0,58-0,78$, $p<0,05$). Референс-препарат L-аргінін L-

глутамат поступається лізиноприлу за здатністю коригувати рівень TGF-β в сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту.

Доведено, що хронічний токсичний гепатит та його корекція лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом впливають на перебіг клітинного циклу, вміст ДНК в ядрах клітин печінки й нирок. За умов хронічного токсичного гепатиту реєструється збільшення плоїдності ДНК ядер клітин печінки (вірогідно зменшується на 12,3% частка клітин з набором хромосом 2c та зростає на 21,7-51,6% з наборами хромосом 4c та ≥8c), індукція апоптозу гепатоцитів та клітин кіркової речовини нирок (зростає частка клітин в фазі SUB-G0G1 відповідно на 76,4 та 36,5%, $p<0,001$), зростання індексу проліферації клітин печінки (на 31,3%, $p<0,001$) та його зменшення в клітинах нирок (на 53,1%, $p<0,001$), що асоціюється зі зростанням рівнів TGF-β та IGF-1 в сироватці крові ($|r|=0,56$-$0,78$, $p<0,05$). Використання лізиноприлу за цих умов виявляє потужну антиапоптотичну дію, зменшує ступінь поліплоїдії клітин печінки, виявляє антипроліферативну активність в печінці і навпаки посилює проліферацію клітин нирок, що супряжено зі зниженням сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1 ($|r|=0,55$-$0,73$, $p<0,05$). Референс-препарат L-аргінін L-глутамат вірогідно не впливає на процеси апоптозу гепатоцитів та клітин нирок, співставляється з лізиноприлом за здатністю стимулювати проліферацію клітин нирок, а також поступається лізиноприлу за антипроліферативною дією в печінці та здатністю зменшувати ступінь поліплоїдії клітин печінки.

Морфологічні дослідження засвідчили, що введення тетрахлорметану та етанолу викликає виразні структурні зміни в тканинках печінки та нирок. У печінці реєструються ознаки запалення, перипортальний фіброз, вакуольна дистрофія, апоптоз та некроз гепатоцитів, ураження стінок кровоносних судин. В нирках відмічається пошкодження ендотелію та базальної мембрани капілярів клубочків, розвиток гломерулосклерозу та запалення. Застосування лізиноприлу за цих умов супроводжується значним зменшенням запального процесу в печінці та нирках, менш виразним перипортальним фіброзом та

гломерулосклерозом, а також чинить ендотеліопротекторну дію. В той же час, L-аргінін L-глутамат значно поступався лізиноприлу за гепато- та нефропротекторною дією.

Проведені дослідження розширюють існуючі уявлення щодо механізмів ушкодження та регенерації тканин печінки та нирок за дії токсикантів тетрахлорметану та етанолу і на тлі корекції лізиноприлом та референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом, а саме показано роль сигнальних систем, асоційованих з цитокінами TGF-β та IGF-1. Поряд з цим в роботі патогенетично обґрунтовано та морфологічно доведено доцільність використання лізиноприлу з метою корекції пошкоджень печінки та нирок за умов хронічного отруєння тетрахлорметаном та етанолом. Проведені експериментальні дослідження можуть слугувати теоретичним підґрунтям для проведення подальших клінічних досліджень з метою оптимізації патогенетичної терапії хронічних токсичних уражень печінки та нирок.

Ключові слова: тетрахлорметан, етанол, хронічний токсичний гепатит, фіброз печінки, ураження нирок, гідроксипролін, IGF-1, TGF-β, репаративна регенерація, клітинний цикл, вміст ДНК, лізиноприл, L-аргінін L-глутамат, щурі.

ANOTATION

Oliinyk Yu. M. Mechanisms of damage and regeneration of liver and kidney tissue in rats under chronic toxic conditions of carbon tetrachloride and ethanol, ways of correction. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Dissertation for the Philosophy Doctor degree in 22 –"Health Care" in speciality 222 –"Medicine". – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsia, 2022.

The dissertation is devoted to studying the mechanisms of damage of liver and kidney tissues in rats under conditions of chronic toxic damage with carbon tetrachloride and ethanol, as well as their regeneration using correction with lisinopril and reference drug L-arginine L-glutamate.

The experiments were performed on 96 white non-linear sexually immature female rats weighting 60-80 g. The animals were divided into four groups: group 1 – intact rats; group 2 – animals with chronic toxic hepatitis, induced by intragastric injection of 20% oily solution of tetrachloromethane in the dose of 0.1 ml/100 g of body weight twice a week combined with 5% ethanol solution for 8 weeks; group 3 and group 4 - animals with chronic toxic hepatitis, treated for 8 weeks with intragastrically administered lisinopril (20 mg/kg/day) and reference drug L-arginine L-glutamate (35mg/kg/day), respectively. The content of transforming growth factor beta (TGF-β) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) was determined in blood serum by immune-enzyme techniques. Spectrometry was used to determine free hydroxyproline level in postnuclear supernatants of liver and kidney homogenates; serum free, peptide-bound, and total hydroxyproline was estimated by reaction with para-Dimethylaminobenzaldehyde. Liver and kidney nuclear DNA content was determined by flow cytometry. Structural changes in liver and kidney tissues were evaluated by morphological methods. Statistical analysis of the data obtained was carried out on a personal computer using computer applications MS Excel, SPSS22 for Windows.

In chronic toxic hepatitis (induced by tetrachloromethane and ethanol) and its correction with lisinopril and L-arginine L-glutamate, changes in various hydroxyproline fractions were registered in liver, kidney and blood serum of rats. Administration of tetrachloromethane and ethanol caused connective tissue remodeling and the development of liver and kidney fibrosis evidenced by significant increase in the levels of free hydroxyproline (by 23.3-52.7% in liver, kidneys and blood serum, $p<0.05$), peptide-bound hydroxyproline (by 17.4% in blood serum, $p<0.05$) and total hydroxyproline (by 23.8% in blood serum, $p<0.05$), as compared to estimates received in the control group of animals. Under those conditions, the use of the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril had antifibrogenic effect in liver and kidneys (free hydroxyproline content in liver, kidneys and blood serum was 18.2-24.7% lower than in untreated animals, $p<0.05$), which exceeded such effect in the reference drug L-arginine L-glutamate.

Signaling molecules TGF-β and IGF-1 were found to have an important role in the mechanisms of damage and regeneration of liver and kidney tissues in chronic toxic hepatitis and using correction with lisinopril and L-arginine L-glutamate. Chronic toxic hepatitis was associated with increased content of TGF-β and IGF-1 in blood serum (by 13-14% on an average, $p<0.05$), as compared to corresponding estimates in the control group. Strong direct correlation was found between the levels of TGF-β and IGF-1 in blood serum and markers of fibrosis - free hydroxyproline content in liver, kidneys and blood serum ($r=0.55-0.82$, $p<0.05$). Lisinopril administration in chronic toxic hepatitis led to significant decrease in serum levels of TGF-β and IGF-1 ($p<0.05$), as compared to untreated animals, being associated with decreased severity of liver and kidney fibrosis ($r=0.58-0, 78$, $p<0.05$). The reference drug L-arginine L-glutamate proved to be less effective than lisinopril in its ability to correct the level of TGF-β in blood serum of rats with chronic toxic hepatitis.

Chronic toxic hepatitis and its correction with lisinopril and L-arginine L-glutamate was found to influence the course of the cell cycle as well as liver and kidney nuclear DNA content. Under the conditions of chronic toxic hepatitis, an increase in DNA ploidy of liver cell nuclei was recorded (the proportion of cells with a set of chromosomes 2c decreased by 12.3% (probably 12.3% decrease in the proportion of cells with set of chromosomes 2c and 21.7-51.6% increase in the number of cells with sets of chromosomes 4c and ≥8c), induction of hepatocyte apoptosis and the cells of renal cortex (the proportion of cells in SUB-G0G1 phase increases by 76.4 and 36.5%, respectively, $p<0.001$), increased proliferation index of liver cells (by 31.3%, $p<0.001$) and its decrease in hepatocytes (by 53.1%, $p<0.001$), being associated with increased levels of TGF-β and IGF-1 in blood serum ($|r|=0.56-0.78$, $p<0.05$). Lisinopril used in the study had powerful antiapoptotic effect, reduced the degree of hepatocyte polyploidy, exerted antiproliferative activity in the liver while increasing proliferation of kidney cells, being associated with decrease in serum TGF-β and IGF-1 levels ($|r|=0.55- 0.73$, $p<0.05$). The reference drug L-arginine L-glutamate did not appear to influence the processes of apoptosis

of hepatocytes and kidney cells, it was similar to lisinopril in its ability to stimulate the proliferation of kidney cells, but had lower anti-proliferative effect in the liver and inability to reduce the degree of liver cell polyploidy.

Morphological studies proved administration of tetrachloromethane and ethanol to cause marked structural changes in liver and kidney tissues. Signs of inflammation, periportal fibrosis, vacuolar dystrophy, apoptosis and necrosis of hepatocytes, damaged blood vessel walls were registered in the liver. Damage to the endothelium and basal membrane of glomerular capillaries, development of glomerulosclerosis and inflammation were noted in kidneys. The use of lisinopril resulted in significant decrease of inflammatory process in liver and kidneys, less severe periportal fibrosis and glomerulosclerosis, exerting endothelial protective effect. At the same time, L-arginine L-glutamate had significantly lower hepatoprotective and nephroprotective effects as compared to lisinopril.

The study has provided additional data as to the mechanisms of damage and regeneration of liver and kidney tissues under the action of tetrachloromethane and ethanol toxicants and using correction with lisinopril and reference drug L-arginine L-glutamate, namely, the role of signaling systems associated with TGF cytokines - β and IGF-1has been clarified. Besides, the use of lisinopril to correct liver and kidney damage in case of chronic tetrachloromethane and ethanol intoxication has been proven from pathogenetic and morphologic point of view. The results obtained in the study could serve the theoretical basis for further clinical studies which would lead to improvement of pathogenetic therapy of chronic toxic lesions of liver and kidneys.

Key words: tetrachloromethane, ethanol, chronic toxic hepatitis, liver fibrosis, kidney damage, hydroxyproline, IGF-1, TGF-β, reparative regeneration, cell cycle, DNA content, lisinopril, L-arginine L-glutamate, rats.

Список публікацій здобувача

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Рикало, Н. А., & Олійник, Ю. М. (2022). Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на біохімічні маркери фіброзу в організмі щурів за хронічного токсичного гепатиту. Фармакологія та лікарська токсикологія, 16(3), 187-194. https://doi.org/10.33250/16.03.187
2. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017). Визначення сироваткових фракцій гідроксипроліну при хронічному токсичному гепатиті у щурів на тлі корекції лізиноприлом та глутаргіном. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 78*(2), 61-65. http://ecpb.org.ua/pdf/78/2/78.02.061.pdf
3. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017). Структурні зміни епітеліального та клубочкового компонентів нирок щурів при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. *Актуальні проблеми транспортної медицини, 48*(2), 104-109. http://nbuv.gov.ua/UJRN/aptm_2017_2_21
4. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2016). Структурні зміни тканини печінки щурів при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом/ *Експериментальна та клінічна медицина, 71*(2), 151-155. https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/3354

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

5. Береговенко, Ю. М., & Рикало, Н. А. (2014). Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки. *Вісник Вінницького національного медичного університету, 18*(2), 632-635. http://nbuv.gov.ua/UJRN/vvnmu_2014_18_2_78

6. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2014а). Патент України 94073. Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки. Київ: Державне патентне відомство України. https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/1372.

7. Rykalo N. A., Berehovenko, Yu. M., & Androshchuk, O. V. (2019). Morphological changes in kidney glomeruli of rats with chronic toxic hepatitis and its correction with lisinopril, L-arginine-L-glutamate and their combination. *Jornal of Education, Heals and Sport, 9*(5), 632-639. DOI http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3254959

8. Rykalo N. A., & Berehovenko, Yu. M. (2018). The Relationship between Serum IGF-1 and Hydroxyproline Levels in the Rats with Chronic Toxic Hepatitis. *Journal Advanced biobank research and pathophysiology, 1*(1), 36-38. https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/5647

9. Rikalo, N. A., & Beregovenko, Y. M. (2016). Research of cell cycle phases and nuclear dnk ploidy in immature liver cella of rats with chronic toxic hepatitis and lisinopril correction. *Jornal of Education, Heals and Sport, 6*(1), 219-228. **DOI http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.45343**

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

10. Береговенко, Ю. М. (2014). Вплив інгібіторів ангіотензин перетворюючого ферменту (і-АПФ) при фіброзі печінки. *Перший крок в науку 2014, Матеріали V міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених* (с. 9-10). Вінниця: ВНМУ.

11. Береговенко, Ю. М. (2015). Перспективи патогенетичного лікування хронічних хвороб печінки. *Перший крок в науку 2015, Матеріали VI міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених* (с. 37). Вінниця: ВНМУ.

12. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2015). Плоїдність ядерної ДНК клітин печінки статевонезрілих щурів при хронічному токсичному гепатиті та патогенетичній корекції лізиноприлом. *Досягнення*

клінічної фармакології а фармакотерапії, Матеріали VIII Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (с. 213-215). Вінниця: ВНМУ.

13. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2015). Молекулярні механізми проліферації клітин печінки щурів при хронічному токсичному гепатиті та патогенетичній корекції лізиноприлом. *Молекулярні механізми патологічних станів, Матеріали наук.-практ. конф., 16 жовтня 2015 р. м. Харків*. *Український біофармацевтичний журнал, 40*(5), 56.
14. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2015). Визначення проліферативного потенціалу гепатоцитів при хронічному токсичному гепатиті та патогенетичній корекції лізиноприлом. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм, Матеріали VIII наук.-практ. конф.* (с. 77-78). Тернопіль: ТДМУ.
15. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017). Фрагментація ядерної ДНК кіркової речовини нирок в умовах хронічного токсичного гепатиту та при медикаментозній корекції. *Прикладні аспекти морфології, Матеріали наук.-практ. конф., присвяченої пам'яті професорів морфологів Терентьєва Г. В., Роменського О. Ю., Когана Б. Й., Шапаренка П. П., Жученка С. П.* (с. 139-141). Вінниця: ВНМУ.
16. Береговенко, Ю. М. (2017). Вплив лізиноприлу на вміст сироваткового TGF-β1 при хронічному токсичному гепатиті у щурів. *Перший крок в науку 2017, Матеріали XIV міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених* (с. 11-12). Вінниця: ВНМУ.
17. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2018). Морфологічні аспекти стану канальцевого компоненту нирок при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. *Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу, Матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю* (с. 62-64). Одеса.
18. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2018). Динаміка вмісту у

сироватці крові протизапального цитокіну IGF-1 при хронічному токсичному гепатиті у щурів та його корекції лізиноприлом. *Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики, Матеріали VII пленуму укр. наук. товариства патофізіологів та наук.-практ. конф., прясвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка* (с. 7-8). Полтава.

19. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2018). Структурні зміни канальцевого компоненту нирок щурів при хронічному токсичному гепатиті та його медикаментозній корекції. *Advances of science, Proceedings of articles the international scientific conference* (p. 83-87). Czech Republic, Karlovy Vary – Ukraine, Kyiv: MCNIP.
20. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2019). Порушення структури та фаз клітинного циклу гепатоцитів та клітин нирок щурів при хронічному токсичному гепатиті. *Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря, Матеріали XVI міжнар. наук.-практ. конф.* (с. 97-98). ВНМУ.
21. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2019). Порушення структури епітеліального компоненту нирок щурів при хронічному токсичному гепатиті. *Перший крок в науку 2019, Матеріали XIV міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених* (с. 426). Вінниця: ВНМУ.
22. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2020). Пептидно-зв'язаний гідроксипролін як маркер фібротичних змін тканини печінки. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації, Матеріали II наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнародною участю,* (с. 176-178). Харків: НФаУ.
23. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2020). Фази клітинного циклу ядерної ДНК клітин кіркової речовини нирок щурів з експериментальним хронічним токсичним гепатитом. *Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення, Матеріали міжнар.*

наук.-практ. конф. (с. 45-49). Київ: Київський медичний науковий центр.

24. Rykalo, N., & Oliinyk, Y. (2020). Disorder of the kidneys' glomeruli at chronic toxic ccl4-induced hepatitis in rats and with pathogenetical treatment. *Science and practice of today, Materials IX International Scientific and Practical Conference* (p. 362-365). Ankara, Turkey.

ЗМІСТ

ВСТУП			18
РОЗДІЛ 1	СУЧАСНІ АСПЕКТИ ТОКСИЧНОСТІ ТЕТРАХЛОРМЕТАНУ Й ЕТАНОЛУ. МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ ПЕЧІНКИ ТА МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)		25
	1.1	Механізми гепато- і нефротоксичності тетрахлорметану та етанолу	25
	1.2	Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи та інших сигнальних систем у механізмах розвитку і прогресування хронічних захворювань печінки	28
	1.3	Сучасні напрямки фармакотерапії фіброзу печінки	40
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ		45
	2.1	Характеристика експериментальних тварин та моделей	45
	2.2	Біохімічні та імуноферментні методи дослідження	47
	2.3	Цитофлуориметричні дослідження	50
	2.4	Морфологічні дослідження	54
	2.5	Методи статистичного аналізу	55
РОЗДІЛ 3	БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФІБРОЗУ В ПЕЧІНЦІ, НИРКАХ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ		56
	3.1	Вміст фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (референс-препарат)	57

3.2 Рівні TGF-β та IGF-1 в сироватці крові та їх зв'язок з показниками метаболізму колагену в печінці, нирках й сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом 65

РОЗДІЛ 4 ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ, ПЛОЇДНОСТІ ТА ФРАГМЕНТАЦІЇ ЯДЕРНОЇ ДНК В ПЕЧІНЦІ Й НИРКАХ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ 72

4.1 Дослідження фаз клітинного циклу, плоїдності й фрагментації ядерної ДНК в печінці щурів, їх зв'язку з рівнем TGF-β й IGF-1 в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом 73

4.2 Дослідження фаз клітинного циклу й фрагментації ядерної ДНК в кірковій речовині нирок щурів, їх зв'язку з рівнем TGF-β й IGF-1 в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом 84

РОЗДІЛ 5 МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТКАНИН ПЕЧІНКИ ТА НИРОК ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ 92

5.1 Структурні зміни тканин печінки у щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції 92

5.2 Структурні зміни тканин нирок у щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції 100

РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 112

ВИСНОВКИ 131

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ 133

ДОДАТКИ 171

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГП – гідроксипролін

АПФ – атгіотензинперетворюючий фермент

АТ – ангіотензин

БРА – блокатори рецепторів ангіотензину

ВГП – вільний гідроксипролін

ГРС – гепато-ренальний синдром

ЗГП – загальний гідроксипролін

ЗК – зірчасті клітини

іАПФ – інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту

ПГП – пептидозв'язаний гідроксипролін

РААС – ренін-ангіотензин-альдостеронова ситема

ФП – фіброз печінки

ХГ – хронічний гепатит

ХТГ – хронічний токсичний гепатит

ЦП – цироз печінки

DAPI – діамідинофеніліндолом

IGF-1 – інсуліноподібний фактор рості -1

TGF-β – трансформуючий фактор росту - β

ВСТУП

Актуальність теми. Останнім часом в Україні складається несприятлива епідеміологічна ситуація щодо захворювань печінки і нирок, спостерігається значне зростання захворюваності, а також інвалідності та смертності внаслідок стрімкого розвитку хронічної печінкової недостатності [26]. За даними ВООЗ, протягом останніх двох десятиліть у світі зростає кількість хворих із захворюваннями печінки, що на сьогодні перевищує 2 млрд осіб. Значна поширеність гепатитів, істотне омолодження хворих, зростання хронічних форм захворювань, що призводять до зниження працездатності, визначають багатогранність проблеми та актуальність її дослідження [3].

У структурі хронічних дифузних захворювань печінки переважають токсичні – 52,4 % та вірусні – 47 % ураження. Сотні мільйонів пацієнтів різного віку страждають на хронічні гепатити (ХГ), у 25-30% із них захворювання прогресує з розвитком фіброзу та цирозу печінки [233, 316]. Більшу частину хронічних токсичних гепатитів (ХТГ) складають захворювання алкогольної етіології [57, 104].

Медичне й соціальне значення проблеми ХТГ визначається багатьма факторами, а саме їх значним розповсюдженням в сучасних умовах внаслідок несприятливого екологічного стану, необхідністю тривалий час приймати різноманітні ліки, більшість з яких є ксенобіотиками, значною поширеністю зловживання алкогольними напоями, а також негативним впливом на паренхіму печінки консервантів та барвників, які в теперішній час широко застосовуються у харчовій промисловості [3].

ХТГ часто поєднуються з ураженням нирок, що значно ускладнює лікування цих пацієнтів. Однією із причин розвитку патології нирок за цих умов є пряма нефротоксична дія токсиканту [263, 309]. Поряд з цим розлади функцій нирок можуть бути наслідком прогресування патології печінки – гепаторенальний синдром (ГРС) [42, 158, 246]. Тригерним чинником ГРС є

надмірна активація ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС), яка залучена до розвитку фіброзу в печінці, а також спричиняє порушення функціонального стану нирок [37, 246]. Однак, залишаються невивченими молекулярні механізми пошкоджуючого впливу РААС на тканин печінки та нирок за окремих видів токсичних гепатитів (наприклад, ініційованого тетрахлорметаном та етанолом), що стримує розробку ефективної фармакотерапії.

Важливим для сучасної медицини є розробка і впровадження нових схем лікування хронічних токсичних гепатитів, які поряд з потужною гепатопротекторною дією мають здатність попереджувати розвиток ниркової дисфункції. З цієї точки зору найбільш перспективним напрямком терапії є використання інгібіторів РААС, а саме інгібіторів АПФ та інгібіторів рецепторів до ангіотензину II [148]. В багатьох експериментальних дослідженнях показано, що використання цих препаратів сповільнює розвиток фіброзу в печінці та покращує процеси регенерації тканини печінки [121, 171, 187, 237, 244, 287, 290, 308]. Поряд з цим показано, що інгібітори АПФ виявляють захисну дію щодо нирок за хронічної патології печінки [28]. Однак, залишаються невивченим нефро- та гепатопротекторні ефекти інгібіторів АПФ за окремих токсичних гепатитів (наприклад, ініційованих сумісним введенням тетрахлорметану та етанолу), а також недостатньо досліджені молекулярні механізми через які вони реалізуються.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової НДР кафедри патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова «Вплив гуморальних факторів на механізми розвитку патологічних процесів у печінці, спричинених дією екзо- та ендогенних чинників, та при їх корекції» (№ державної реєстрації 0116U007973). Дисертант є співвиконавцем вказаної наукової теми. Тема дисертації затверджена вченою радою навчального закладу «Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова» (протокол № 1 від 29 вересня 2016 р.).

Мета дослідження: встановити механізми пошкодження та регенерації тканин печінки й нирок щурів за хронічного токсичного ураження тетрахлорметаном й етанолом і на тлі корекції лізиноприлом та референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом.

Завдання дослідження:

1. Дослідити особливості ремоделювання сполучної тканини в печінці й нирках (за рівнем фракцій гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові) за хронічного токсичного гепатиту (індукованого тетрахлорметаном і етанолом) та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (референс-препарат).

2. Оцінити роль TGF-β та IGF-1 в механізмах пошкодження й регенерації тканин печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту і на тлі корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом.

3. Дослідити показники клітинного циклу, фрагментації та плоїдності ядерної ДНК в печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту та введенні лізиноприлу і L-аргініну L-глутамату.

4. Вивчити морфологічні зміни тканин печінки й нирок щурів за хронічного токсичного гепатиту та при введенні лізиноприлу і L-аргініну L-глутамату.

Об'єкт дослідження: механізми пошкодження та регенерації тканин печінки і нирок щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом.

Предмет дослідження: особливості метаболізму колагену в печінці та нирках, вміст TGF-β і IGF-1 у сироватці крові, зміни фаз клітинного циклу та фрагментації ядерної ДНК клітин печінки і нирок, патоморфологічні зміни в тканинах печінки і нирок щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом.

Методи дослідження: експериментальні – моделювання у лабораторних щурів хронічного токсичного гепатиту та фіброзу печінки, вивчення ефективності патогенетичної корекції лізиноприлом та референс-

препаратом L-аргініном L-глутаматом; біохімічні – вивчення концентрації вільного, зв'язаного та сумарного гідроксипроліну у сироватці щурів, вільного гідроксипроліну в печінці та нирках; імуноферментні – визначення рівня TGF-β та IGF-1 у сироватці крові тварин; цитофлуориметричні – вивчення фаз клітинного циклу, фрагментації та плоїдності ядерної ДНК клітин печінки і нирок; морфологічні – аналіз ступеня ушкодження та репаративної регенерації тканини печінки і нирок щурів; статистичний аналіз отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено особливості ремоделювання сполучної тканини в печінці й нирках за хронічного токсичного гепатиту (індукованого тетрахлорметаном і етанолом) та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом. Введення токсикантів викликає розвиток фіброзу печінки й нирок, про що доказово свідчить вірогідне зростання вмісту вільного гідроксипроліну в гомогенатах печінки та нирок, що асоціюється з вірогідним збільшенням в сироватці крові рівнів загального, вільного та пептидозв'язаного гідроксипроліну, порівняно з показниками контрольної групи тварин. За цих умов застосування інгібітору ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприлу виявляє антифіброгенну дію в печінці та нирках – відмічалось достовірне зменшення вмісту вільного гідроксипроліну в печінці й нирках, а також усіх фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, порівняно з нелікованими тваринами. За вказаним ефектом лізиноприл перевищував референс-препарат L-аргінін L-глутамат.

Вперше оцінено роль сигнальних молекул TGF-β та IGF-1 в механізмах пошкодження й регенерації тканин печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту і на тлі корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом. За хронічного токсичного гепатиту реєструється статистично достовірне зростання вмісту TGF-β та IGF-1 в сироватці крові, порівняно з контролем, що супряжено зі зростанням рівня маркерів фіброзу - вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Введення лізиноприлу за цих умов супроводжується достовірним зниженням сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1 ($p<0,05$), що асоціюється зі зменшенням виразності фіброзу в печінці та

нирках. Референс-препарат L-аргінін L-глутамат поступається лізиноприлу за здатністю коригувати рівень TGF-β в сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту.

Вперше оцінено особливості перебігу клітинного циклу, вмісту ДНК в ядрах клітин печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту та введенні лізиноприлу і L-аргініну L-глутамату. Виявилось, що введення токсикантів викликає збільшення плоїдності ДНК ядер клітин печінки, індукцію апоптозу гепатоцитів та клітин кіркової речовини нирок, зростання індексу проліферації клітин печінки та його зменшення в клітинах нирок, що асоціюється зі зростанням рівнів TGF-β та IGF-1 в сироватці крові. Використання лізиноприлу за цих умов виявляє потужну антиапоптотичну дію, зменшує ступінь поліплоїдії клітин печінки, виявляє антипроліферативну активність в печінці і навпаки посилює проліферацію клітин нирок. Референс-препарат L-аргінін L-глутамат вірогідно не впливає на процеси апоптозу гепатоцитів та клітин нирок, співставляється з лізиноприлом за здатністю стимулювати проліферацію клітин нирок, а також поступається лізиноприлу за антипроліферативною дією в печінці та здатністю зменшувати ступінь поліплоїдії клітин печінки.

Встановлено, що введення тетрахлорметану та етанолу викликає виразні структурні зміни в тканинках печінки та нирок. У печінці реєструються ознаки запалення, перипортальний фіброз, вакуольна дистрофія, апоптоз та некроз гепатоцитів, ураження стінок кровоносних судин. В нирках відмічається пошкодження ендотелію та базальної мембрани капілярів клубочків, розвиток гломерулосклерозу та запалення. Застосування лізиноприлу за даної патології супроводжується значним зменшенням запального процесу в печінці та нирках, менш виразним перипортальним фіброзом та гломерулосклерозом, а також чинить ендотеліопротекторну дію. L-аргінін L-глутамат значно поступався лізиноприлу за гепато- та нефропротекторною дією.

Практичне значення отриманих результатів. Проведені дослідження поглиблять існуючі уявлення про молекулярні механізми ушкодження та регенерації тканини печінки і нирок щурів за хронічного токсичного ураження тетрахлорметаном і етанолом та корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом, а саме показано роль сигнальних систем, асоційованих з цитокінами TGF-β та IGF-1.

В роботі патогенетично обґрунтовано та морфологічно доведено доцільність використання лізиноприлу з метою корекції пошкоджень тканин печінки та нирок за умов хронічного отруєння тетрахлорметаном та етанолом. Проведені експериментальні дослідження можуть слугувати теоретичним підґрунтям для проведення подальших клінічних досліджень з метою оптимізації патогенетичної терапії хронічних токсичних уражень печінки та нирок.

Результати дослідження впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету, кафедри медицини катастроф та військової медицини Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота самостійно виконана здобувачем. Автором особисто проведений патентно-інформаційний пошук відповідно до теми дослідження та оформлений огляд літератури. Самостійно проведено аналіз вітчизняних і зарубіжних наукових джерел відповідно до теми дисертації, опановано методи запланованих досліджень. Авторкою самостійно проведено експериментальні дослідження, здійснено забір матеріалу для лабораторних досліджень, описано результати експериментів. На основі даних досліджень було написано й підготовлено до друку низку наукових статей. Результати були представлені у вигляді доповідей на профільних зарубіжних та вітчизняних конференціях.

Дисертантка оформила проведене дослідження у манускрипт дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені на: V міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених, м. Вінниця, 2014; VI міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених, м. Вінниця, 2015; XIV міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку 2017», м. Вінниця, 2017; науково-практичної конференції «Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу», м. Одеса, 2018; VII пленумі українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичної конференції, присвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», м. Полтава, 2018; XIV міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку 2019», м. Вінниця, 2019.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 24 наукові праці: 8 статей, з них 5 – у фахових наукових журналах України, 2 – у закордонних наукометричних виданнях; 1 патент України на корисну модель; 15 тез – у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація представлена українською мовою на 178 сторінках (132 сторінок залікового машинописного тексту) і складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел, що включає 317 найменувань, з них 106 кирилицею, 211 – латиницею. Дисертація ілюстрована 43 рисунками та містить 14 таблиць.

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНІ АСПЕКТИ ТОКСИЧНОСТІ ТЕТРАХЛОРМЕТАНУ Й ЕТАНОЛУ. МЕХАНІЗМИ ПОШКОДЖЕННЯ ПЕЧІНКИ ТА МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Механізми гепато- і нефротоксичності тетрахлорметану та етанолу

Тетрахлорид вуглецю (тетрахлорметан) CCl_4 – це безбарвна, летка рідина, яка раніше широко використовувалась в побуті як миючий засіб, знежирююча рідина, а також у промисловому виробництві, хімчистках, вогнегасниках, як попередник холодоагентів та пропелентів [115]. За даними CAREX у 1990-1993 роках [115] з 15 країн Європейського Союзу та Національного обстеження професійного впливу США, близько 70 тисяч робітників у Європі та 10 тисяч у США потенційно зазнавали токсичного впливу CCl_4. На даний час тетрахлорметан використовується вкрай рідко, через його високу гепато- та нефротоксичність [213, 268, 269, 284], яка пов’язана з утворенням вільних радикалів та реактивних метаболітів за участі цитохромів Р-450, особливо його ізоферментів CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2, що супроводжується надмірним утворення активних кисневих радикалів, активацією перекисного окиснення ліпідів та мітохондріального шляху загибелі гепатоцитів [129, 184, 206, 252, 296].

В експериментах показано, що застосування тетрахлориду вуглецю на тлі введення етанолу значно потенціює розвиток цирозу печінки [4, 11, 35, 62, 85, 101, 261]. Виникає питання щодо механізмів, які збільшують токсичну дію CCl_4 на печінку за споживання етанолу. Так, у печінці метаболізм CCl_4 з утворенням токсичних речовин каталізується цитохромом Р450, особливо його ізоферментом CYP2E1 [46, 49]. Цей фермент є частиною печінкової мікросомальної системи окислення етанолу (MEOS), яка бере участь у печінковому метаболізмі етанолу [83]. Обидва ці ферменти індукуються

тривалим споживанням алкоголю, і навіть одна доза алкоголю може індукувати MEOS. Ось чому вживання алкоголю значно збільшує гепатотоксичність CCl_4 [86, 239, 284]. Ще одним чинником, є дефіцит глікогену та жирова інфільтрація гепатоцитів на тлі алкоголізації, що значно збільшує чутливість клітин печінки до пошкодження тетрахлорметаном [62, 288].

На молекулярному рівні CCl_4 активує безліч біологічно активних речовин, включаючи фактор некрозу пухлин (TNF-α), трансформуючі фактори росту (TGF) -α та -β та оксид азоту (NO). Ці фактори активують механізми апоптозу, наприклад TGF-α, тоді як TGF-β – фіброз печінки [12, 14, 54, 74, 221, 253, 275, 281, 296].

Морфологічні зміни тканини печінки при введенні CCl_4 залежать від дози гепатотоксина, а також тривалості його введення. Наприклад, при гострому ураження печінки тетрахлорметаном у паренхімі печінки щурів, через 72 години після введення гепатотоксину, виявляються ознаки репаративних процесів, що полягають у видаленні загиблих гепатоцитів, на що вказує значна лейкоцитарна інфільтрація, а також наявність поодинових тілець Каунсільмена (апоптичні тільця, у вигляді ущільнених гепатоцитів, з темно-рожевою цитоплазмою та залишками ядер) [77, 147, 223]. Характеринми є некрози різного ступеня вираженості від центролобулярних до мостоподібних. Ознаками регенерації автор вважає наявність великої кількості гепатоцитів, гіпертрофованих поліплоїдних клітин [1, 4, 72].

У механізмах ураження печінки при дії CCl_4 після 8 тижнів введення, відіграють роль прозапальні цитокіни, зокрема IL-2, IL-6 вміст яких достовірно збільшувався, як і протизапального IL-4. На думку авторів, продукція IL-4 активованими Т-хелперами 2 типу, що може призводити до дисбалансу між прозапальними та протизапальними цитокінами з інгібуванням симетрично-гомеокінетичної відповіді, тобто зростання IL-4 та IL-10, що відбувається переважно на рівні моноцитів та макрофагів, а також безпосередньо на клітини Ito [96, 245].

За умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та цирозу печінки на тлі використання тетрахлорметану порушується процеси репаративної регенерації печінки, змінюється вміст ДНК в клітинах, розвивається апоптоз [9, 50, 68, 79, 210, 241,245].

За даними літератури застосування CCl_4 не обмежується гепатотоксичністю, часто розвиваються пошкодження нирок [92, 263, 311]. Так, при введенні 50% олійного розчину CCl_4 у дозі 2 г/кг встановлено зміни структури кіркової речовини нирок на фоні гемодинамічних розладів. Зокрема, авторами установлено наявність пристосувально-компенсаторної перебудови структури нефронів, дистрофію епітелію канальців, переважно в проксимальних звивистих відділах [30, 105].

Ураження нирок на тлі введення CCl_4 може бути наслідком патології печінки, що позначається як гепаторенальний синдром (ГРС). Встановлено, що в патогенезі ГРС провідна роль відводиться активації ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) [29, 37, 42, 158, 161, 246, 262]. У роботі Yim H. E. et al. (2017) та ін. показано, що тетрахлорметан має пряму пошкоджуючу дію на нирки, а також його нефротоксичність опосередкована через активацію РААС на тлі розвитку патології печінки [122, 309]. Важливим доказом ролі РААС в ураженні нирок за умов введення CCl_4 є наявність нефропротекторного потенціалу інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту та блокаторів рецепторів до ангіотензину АТ II [2, 15, 31, 47, 63, 87, 224].

Ще одним важливим токсикантом є етанол, його тривале застосування супроводжується ураженням печінки та нирок з розвитком запалення та стеатозу. Основними сигнальними молекулами, які в найбільшій мірі причетні до реалізації токсичного впливу етанолу, є нуклеарний фактор kappa B, TNF-α, IL-1 та IL-6. У механізмах алкогольного ушкодження печінки значна роль належить також імунним порушенням, гіперактивації процесів вільнорадикального окиснення та розвитку фіброзу [16, 34, 40, 55, 195, 205].

Відомо, що алкоголь володіє прямим та непрямим механізмами нефротоксичності, що може бути пов'язано з активацією етанол-індукованого оксидативного стресу та запуском механізмів альтерації. Також непрямий механізм ушкодження нирок при вживанні алкоголю може бути пов'язаним з первинним ушкодженням печінки [22, 100, 291].

На фоні хронічної алкогольної інтоксикації збільшується відсоток ушкоджених гепатоцитів (з фрагментованою ДНК) та зменшується відсоток гепатоцитів із диплоїдним набором ДНК на тлі поліплоїдизації [72, 106]. Це пояснюється тим, що тривала алкоголізація блокує регенеративні процеси в печінці протягом пререплікативного періоду на тлі підвищеної активності TNF-α та IL-6, що асоціюється зі зниженням проліферації гепатоцитів [172, 304].

Таким чином, на сьогодні багато відомо про механізми ураження нирок та печінки за ізольованого впливу етанолу та тетрахлорметану. Однак, залишається до кінця невивченою роль окремих сигнальних шляхів (наприклад TGF-β1 та IGF-1) в механізмах ураження та регенерації тканин печінки й нирок за сумісної дії етанолу та тетрахлорметану.

1.2 Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи та інших сигнальних систем у механізмах розвитку і прогресування хронічних захворювань печінки

РААС – це гормональна система людини і ссавців, яка відіграє вирішальну роль у регуляції судинного тонусу і водно-електролітного балансу. У численних дослідженнях була доведена її роль у формуванні і прогресуванні артеріальної гіпертензії, серцевої недостатності, системного атеросклерозу та хронічних захворювань нирок. Окрім того, РААС безпосередньо бере участь у процесах росту і диференціювання тканин, модуляції процесів запалення та апоптозу, а також у стимулюванні синтезу і секреції цілого ряду нейрогуморальних субстанцій [7, 23, 193].

Історія вивчення ренін-ангіотензин-альдостеронової системи почалась 110 років тому, коли був ідентифікований перший її компонент ренін. У серії дослідів, які залишаються одним із еталонів експериментальної медицини, R. Tigerstedt і його студент P. Bergman (1898) показали, що введення екстракту нирки викликає виражену гіпертензію у тварин з нефректомією [286]. Використання саме цієї моделі підтверджувало, що зростання артеріального тиску провокується речовиною, що виробляється безпосередньо структурами ниркової тканини. У подальшому в експериментальних та клінічних спостереженнях була з'ясована фізіологічна роль реніну і його значення в регуляції активності РААС при різних патологічних станах. У юкстагломерулярному апараті синтезується протеолітичний фермент – ренін [133]. Він секретується у кров, де взаємодіє із синтезованим у печінці білком – ангіотензиногеном внаслідок чого утворюється ангіотензин I. Цей пептид підлягає додатковому гідролізу під дією іншої протеази – ангіотензинперитворюючого ферменту (АПФ), який відщеплює з С-кінця ангіотензину I дипептид з утворенням октапептиду – ангіотензину II (АТІІ) (1-8) [82, 256].

АТ II є добре відомою біологічно активною речовиною, яка бере участь у регуляції артеріального тиску та розвитку серцево-судинних захворювань. Дослідження показують, що АТ II також бере участь у механізмах розвитку діабету і метаболічних порушеннях [31, 150, 292]. У класичній РААС, АТ II утворюється з АТ I під дією АПФ.

АТ II сприяє накопиченню колагенового матриксу, продукції цитокінів, адгезивних молекул, активації внутрішньоклітинної сигнальної системи, підвищенню експресії генів фетального фенотипу, відіграє значну роль в ремоделюванні міокарда і гіпертрофії лівого шлуночка. Також АТ II бере участь в ремоделюванні артерій, ініціації оксидативного стресу і апоптозу, формуванні і прогресуванні артеріальної гіпертензії, хронічної серцевої недостатності, атеросклеротичного пошкодження судин, діабетичної і недіабетичної нефропатії, ангіопатії при цукровому діабеті, еклампсії

вагітних, хворобі Альцгеймера. Прогресування кардіоваскулярних захворювань не залежить від вазопресорного ефекту АТ II. Цікавим фактом є здатність окремих органів і систем синтезувати компоненти РААС місцево [125, 229, 292]. До таких органів відносять серце, підшлункову залозу, нирки, жирову тканину, а також нервову, репродуктивну і травну системи [229]. Також було виявлено, що зірчаті клітини печінки (HSCs) в стані спокою не виділяють компоненти РААС, тоді як активовані HSCs стимулюють ренін і ангіотензин-перетворюючий фермент і секретують АТ II [126]. Трансдиференціація (або «активація») зірчастих клітин печінки є основним клітинним джерелом міофібробластів, що секретують матриксний білок - основний драйвер фіброгенезу печінки [137, 169, 199, 200, 217, 307].

Після їх активації вивільняються фактори, які в кінцевому результаті призводять до збільшення продукції ПКМ, основним із яких є TGF-β [137, 145, 175, 160, 162, 168, 194, 215, 217, 279, 295, 305, 306, 307].

При збереженні структури та функцій печінки баланс ПКМ змінюється таким чином, що його кількість під час гострого ушкодження зберігається на мінімальному рівні [162, 189].

У моделях хронічного ураження печінки, тривале запалення призводить до посиленої активації клітин Ito, та зниження їх апоптозу, а, отже, до аномально надмірної продукції ПКМ [107, 108, 120, 175, 202, 298, 305, 310].

Активація АТ II рецепторів типу 1 (AT1) призводить до вазоконстрикції, стимулює вивільнення вазопресину, альдостерону, ендотеліну, норадреналіну. Фізіологічну роль інших підтипів АТ II рецепторів (AT3, AT4) продовжують вивчати. АТ II зв'язується з двома основними типами рецепторів, а саме, АТ II рецептори типу 1 і АТ II рецептори типу 2, шляхи з яких були добре вивчені, в тому числі ідентифіковані нові сигнальні молекули, такі як рецептор-зв'язаний білок рецепторів 1 та 2 типів (ATRAP-AT1 receptor-associated protein) і рецептор-взаємодіючий білок (ATIP-AT2 receptor-interacting protein) [230]. Афінність АТ II до рецептора 2 типу не відрізняється від спорідненості до рецептора 1 типу. Вважається, що стимуляція рецепторів

2 типу має позитивний ефект на блокатори рецепторів 1 типу (AT1-receptor blockers (ARBs)) [179].

АТ II-рецептор 1 типу знаходиться в більшості органів, в той час як наявність 2 типу рецепторів спостерігається лише в кількох органах після народження і активується при патологічних станах. Стимуляція АТ II-рецепторів 1 типу опосередковує основні класичні дії АТ II, гіпертонію, інсульт, серцево-судинні прояви і ниркові захворювання. Блокування даних рецепторів використовується в лікуванні первинної та вторинної гіпертензії [144, 187, 283]. Крім того, було повідомлено, що блокада АТ1 рецептора сприяє довголіттю [254].

Відщеплення амінокислот з будь-якого кінця молекули АТ II призводить до утворення менших пептидних фрагментів. Наприклад, від'єднання амінокислот з N-кінця формує пептид, що складається з семи амінокислот, також відомий як ангіотензин III (АТ III) і (2-8). З фрагментів, які можуть бути отримані з АТ II тільки три мають біологічну дію [282].

Було проведено багато дослідів на тваринах і виявлено, що АТ (1-7) має гіпотензивні, антиаритмічні та кардіопротекторні властивості [163, 255], а також антитрофічні властивості в клітинах ендотелію судин, гладеньких м'язів, кардіоміоцитах і серцевих фібробластах. Рецептор для АТ (1-7) являє собою білок-зв'язаний рецептор G 14, хоча не виключається наявність інших рецепторів [228]. АТ (1-7) також володіє протизапальними, антифібротичними і антитромботичними властивостями [228]. За результатами цих досліджень, АТ (1-7) був запропонований як ефекторний пептид, здатний протистояти шкідливій дії АТ II, і може впливати на активність РААС через декілька механізмів: інгібування АПФ, блокада АТ II рецептора 1 типу, а також його прямий вплив на тонус судин [179].

У 2000 р. був клонований гомолог АПФ який отримав назву ангіотензин-перетворюючого ферменту 2 (АПФ 2) [267]. АПФ 2 був виявлений в ендотелії серця, нирок і яєчок, а також присутній в нормі в тонкій і товстій кишці [31, 163, 292]. У той час як АПФ перетворює АТ I в АТ II,

АПФ2 видаляє один залишок від АТ I з утворенням АТ (1-9) і розщеплює один залишок від АТ II в наслідок чого утворюється АТ (1-7) [174]. Таким чином, АПФ 2 разом з АТ(1-7) і групою рецепторів являють собою "альтернативну" вісь РААС, що відіграє важливу регулюючу роль, захищаючи тканини від АТ II – ушкодження двома шляхами: 1) знижує рівень АТ II і 2) перешкоджає його утворенню за рахунок збільшення продукції АТ 1-7 [150]. Показано, що порушення генів АПФ спричинює спонтанну гіпотензію, знижує функції сперми і спричинює вади розвитку нирок [118].

Система РААС має важливу роль в патогенезі захворювань печінки: збільшення портального тиску, проліферації зірчастих клітин і запаленні. В дослідах було виявлено, що циркулюючі рівні АПФ були значно вище у пацієнтів з вперше діагностованим хронічним гепатитом В, гострим алкогольним гепатитом та цирозом печінки порівняно з контрольною групою і встановлений чіткий зв'язок між фіброзом печінки та рівнем АПФ в сироватці крові [121].

При з'ясуванні патогенетичного зв'язку між РААС і розвитком неалкогольного стеатогепатиту (НАСГ), de Kloeta A. D. et al. (2010) повідомили, що біла жирова тканина, збагачена тригліцеридами, здатна виділяти всі елементи системи РААС, включаючи ангіотензиноген, ренін, АПФ, а також АТ рецептори 1 та 2 типу [143]. З іншого боку, РААС сприяє гіпертрофії адипоцитів і збільшує вміст тригліцеридів шляхом активації ферментів, які сприяють ліпогенезу: гліцерол-3-фосфат дегідрогенази і синтази жирних кислот [143, 247]. Тому збільшена маса білої жирової тканини може виступати в якості локального генератора АТ II. Відомо, що АТ II зменшує чутливість інсулінових рецепторів, вміст адипонектину, посилює запалення і продукцію активних форм кисню. В цьому контексті, АТ II активує запальний процес і здатний збільшувати лейкоцитарну інфільтрацію, збільшити вироблення хемокінів, цитокінів і факторів росту. Отже, активація РААС, як вважають, є одним з факторів, які активує вироблення ФНП-α [186].

У процесі розвитку фіброзу та стеатозу печінки, запальний процес та виділення прозапальних цитокінів є патогномонічним для їх розвитку [214]. Відомо про асоціацію TNF-α зі стеатогепатитом [116]. Підвищення рівня TNF-α при ожирінні викликає інсулінорезистентність, послаблюючи секрецію інсуліну. TNF-α також стимулює синтез у печінці жирних кислот і підвищує рівень тригліцеридів, які призводять до подальшого синтезу TNF-α, створюючи тим самим «порочне коло» запалення із резистентністю до інсуліну [156, 218, 257, 293].

Потенційним терапевтичним підходом для лікування НАГС є використання іАПФ та блокаторів рецепторів ангіотензину [132]. Слід зазначити, що повне (100%) інгібування АПФ малоймовірно. На початку лікування, активність АПФ максимально гальмується, але після цього спостерігається посилення активності за рахунок активації негативного зворотного зв'язку для АТ II [142]. Використання іАПФ супроводжується пригніченням перетворення АТ I в АТ II, посиленням продукції брадикініну й простагландинів, що асоціюється з їх судинорозширювальною, антитромботичною, антиатерогенною і антипроліферативною дією [238, 317].

У даний час відомо, що при захворюваннях печінки надлишково експресуються не лише класичні компоненти РААС, такі як ренін, ангіотензинперетворюючий фермент (АПФ), ангіотензин (АТ) II і АТ1-рецептори, але активуються також і компоненти альтернативної РАС — АПФ2, АТ1–7, мас-рецептори [171, 222, 287]. Існує точка зору, що класичні компоненти РАС можуть сприяти розвитку фіброзу, тоді як альтернативні можуть активуватися для підтримки нормального гомеостазу [164].

При захворюваннях печінки зміна її цитоархітектоніки є результатом запалення й фіброзу. Ці зміни призводять до капіляризації синусоїдів гепатоцитів, підвищеного формування екстрацелюлярного матриксу і підвищеної резистентності гепатоцитів. Усе це утруднює печінковий кровотік і спричиняє портальну гіпертензію. Розширення ворітної вени, внаслідок підвищеної резистентності гепатоцитів, і оксидативний стрес призводять до

вивільнення вазодилятаторів, зокрема оксиду азоту, які запускають безліч компенсаторних механізмів, що мають значення для відновлення функціонуючого об'єму крові [219]. Тригером є затримка в організмі натрію та води, а також стимуляція симпатичного відділу автономної нервової системи. Це призводить до виникнення асциту, периферичних набряків, гепаторенального синдрому, а також до підвищення гідродинамічного тиску у судинах, що є типовим для пацієнтів із хронічними дифузними хворобами печінки. Слід відзначити, що РААС безпосередньо залучена у цей процес [201]. Отже, враховуючи дані беззаперечні факти, впливаючи на ланки РАС за допомогою інгібіторів АПФ або блокаторів ангіотензину II, можна досягти позитивного терапевтичного ефекту [31]. Проте необхідно підтримувати рівновагу між можливими сприятливими ефектами і потенційними побічними реакціями такої терапії, оскільки активуються компенсаторні механізми РААС, необхідні для підтримки адекватної гемоциркуляції. Зокрема відомо, що АТ II має важливе значення у прогресуванні НАСГ. На сьогоднішній день є дані, що зірчасті клітини печінки (міофібробласти або клітини Ito) відіграють ключову роль у фіброгенезі печінки. Існують дані про те, що АТ II запускає активацію і диференціювання цих клітин у міофібробласти [197]. Більше того, АТ II сприяє скороченню міофібробластів, їх проліферації, запускає вивільнення прозапальних цитокінів, а також сприяє накопиченню екстрацелюлярного матриксу [19, 164]. Незважаючи на те, що обидва типи рецепторів до АТ II (АТ1 і АТ2) експресуються у печінці, АТ1-рецепторів набагато більше і тому вважається, що саме вони відповідальні за всі ефекти, опосередковані АТ II. Проте інформації про дослідження дії АТ II при хворобах печінки у доступній нам літературі виявилось небагато. На думку деяких авторів, це може бути пов'язано з необхідністю проведення множинних біопсій для гістологічного підтвердження регресу фіброзу. До того ж повільний прогрес фіброзу при багатьох хворобах, таких як хронічний вірусний гепатит С і НАСГ, досить утруднюють оцінку позитивного впливу антифібротичної терапії [48, 134, 227]. На сьогодні представлені поодинокі

клінічні дослідження присвячені використанню блокаторів РААС при НАСГ. За даними одного із них, прийом лозартану у дозі 50 мг/добу протягом 48 тижнів у пацієнтів із артеріальною гіпертензією та НАСГ призводить до зниження рівня сироваткового феритину, TGF-β і амінотрансфераз [201]. У частини пацієнтів відмічено зменшення активності цитолізу та запального процесу в печінці.

Важливими ланками патогенезу хронічних хвороб печінки є інсулінорезистентність та гіперінсулінемія, які стимулюють продукцію факторів росту (тромбоцитарного, інсуліноподібного, фактору росту фібробластів), що призводить до проліферації гладеньких м'язів та міофібробластів, і, як наслідок, до вазоконстрикції [110, 139, 156].

Інсулін також стимулює синтез ендотеліну, призводить до активації симпатоадреналової та РААС, підвищує реабсорбцію Na+ у проксимальних та дистальних канальцях нефрону, на різних рівнях впливаючи на патогенез артеріальної гіпертензії. Таким чином, інсулінорезистентність, яка розвивається при багатьох хронічних дифузних хворобах печінки, також лежить в основі розвитку метаболічного синдрому, є кофактором багатьох патологічних процесів, захоплюючи до «смертельного каскаду» ряд органів та систем [272].

Печінку можна розглядати і як орган-мішень вільнорадикального окиснення ліпідів, і як безпосереднє джерело прозапальних цитокінів. Не потребує доказів той факт, що хронічні гепатити, не залежно від їх етіології (вірусні, алкогольні, токсичні, тощо), супроводжуються гіперпродукцією прозапальних цитокінів, зокрема інтерлейкінів 1 та 6, фактору некрозу пухлин-α, С-реактивного білку, а також трансформуючого фактору росту β (TGF-β) у сироватці крові. Вони, у свою чергу, запускають цілий каскад запальних реакцій, які в результаті призводять до ушкодження гладком'язових структур кровоносних судин, ендотеліальної дисфункції та ушкодження самих гепатоцитів, формуючи таким чином «замкнуте коло». Встановлено, що рівень інтерлейкіну–6, С-реактивного білку, TGF-β прямо корелює зі ступенем

фіброзу та запальної активності у паренхімі печінки [54, 116, 131, 135, 172, 191, 226, 235, 250, 266, 280, 299].

Важливу роль в механізмах ушкодження та регенерації тканин печінки належить інсуліноподібному фактору росту – 1 (IGF-1). Це один із найбільш досліджуваних цитокінів у XXI столітті, його роль досліджена в патогенезі захворювань печінки, серцево-судинної системи, метаболічного синдрому, тощо [43, 51, 70, 243, 250, 289, 313].

Розрізняють, на сьогоднішній день, два види даного цитокіну IGF-1 та IGF-2. IGF-2 є потенційним мітогеном, підвищення якого, має прямий зв'язок з ризиком канцерогенезу у печінці [111].

Пріоритетну роль у регулюванні функцій печінки відіграє IGF-1, який контролює тканинний ріст, диференціацію та проліферацію гепатоцитів, ліпідний метаболізм, чинить антиоксидантні і цитопротекторні ефекти, запобігає мітохондріальній дисфункції [53, 114, 177, 212]. Патогенна дія токсичних факторів призводить до порушення функції печінки, що може негативно впливати на рівень IGF-1 у крові, проте відомості про механізми впливу цього фактору на гепатоцити обмежені та суперечливі [138, 140, 163, 176, 209, 232, 260]. Відомо, що гепатоцити починають секретувати IGF-1 у відповідь на запалення, адже цей цитокін пригнічує запальну відповідь, шляхом зменшення макрофагальної інфільтрації, знижує оксидативний стрес, а також пригнічує апоптоз паренхіматозних клітин та ендотеліоцитів [94, 198, 312, 316]. У літературі показано, що IGF-1 володіє протизапальними та гепатопротекторними властивостями [205], а також сприяє прискоренню регенерації тканин при ушкодженні [21, 117, 154, 138, 243].

Однак, існують протилежні дані - тривале і неконтрольоване збільшення рівня IGF-1 може мати значення в патогенезі цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми [109].

Зниження продукції даного цитокіну печінкою розцінюється як ознака гострої чи хронічної печінкової недостатності у пацієнтів із гепатитом В [300].

Існують також суперечливі дані щодо змін сироваткового рівня IGF-1 при різних типах гепатитів. За результатами одних досліджень за токсичних уражень печінки реєструвалось збільшення концентрації IGF-1, що асоціювалось з розвитком фіброзу печінки [3, 78, 127, 294]. У той же час інші автори документували, що при хронічному алкогольному ураженні печінки та неалкогольному ураженні печінки відмічали зменшення концентрації IGF-1 у сироватці крові [43, 70, 242]. Отже, динаміка зміни концентрації IGF-1 ймовірно залежить від етіології гепатиту та тривалості патологічного процесу.

Протягом останніх років багато уваги прикуто до вивчення процесів фіброгенезу в печінці, як результату хронічного запалення печінки [74, 155, 170, 192, 221, 231]. Розвиток фіброзу є важливим елементом патогенезу більшості захворювань печінки, в тому числі за умов вірусних гепатитів [178, 185, 192, 231, 236, 246]. Основну роль в продукції сполучної тканини в печінці, а саме, екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) виконують зірчасті клітини (клітини Ito), які знаходяться тісному функціональному зв’язку з гепатоцитами і макрофагами печінки [124, 169, 303]. Процес фіброгенезу та фібролізису є багатокомпонентним і складним [274]. Проте посилення синтезу ЕЦМ ще не гарантує розвиток фіброзу печінки. Для його виникнення необхідно, щоб, з одного боку, посилювався синтез, а з іншого – затримувався розпад новоутвореного ЕЦМ. За сучасними уявленнями, розвиток фіброзу печінки не можна пояснити тільки надмірною продукцією компонентів ЕЦМ, швидше воно пов'язане з порушенням рівноваги процесів утворення і деградації компонентів позаклітинного матриксу [113]. На ранніх стадіях розвитку фіброз – це зворотній процес, але цироз вже не оборотній [215, 231, 235, 259].

Основними медіаторами фіброзу печінки є зірчасті клітини. Після їх активації вивільняються фактори, які в кінцевому результаті призводять до збільшення продукції позаклітинного матриксу (ПКМ). У нормальній печінці баланс ПКМ існує таким чином, що його кількість під час гострого ушкодження зберігається на мінімальному рівні. У моделях хронічного

ураження печінки, тривале запалення призводить до посиленої активації клітин і зниженню апоптозу зірчастих клітин, і отже до аномальної кількості продукції ПКМ. Процес деструкції сполучної тканини (СТ), який лежить в основі фіброзу печінки супроводжується надлишковим синтезом ПКМ, головними компонентами якого є фібрилярні білки (колаген, еластин) занурені в напіврідкий гель, утворений гіалуроновою кислотою, глікозаміно- і протеогліканами [3, 38, 93, 169, 200]. Структурні глікопротеїни, такі як ламінін, фібронектин, нідоген, ундулін, огортають колагенові волокна і тим самим відділяють строму печінки від паренхіми [3, 93]. Зрілий колаген (колаген I типу) практично не бере участь в фіброгенезі на противагу молодому та незрілому (колаген III типу), який синтезується під впливом різних факторів [172, 301]. Колаген складає 25-33 % всіх білків організму людини. До складу колагену входить амінокислота гідроксипролін (ГП), яка стабілізує і захищає його молекулу від дії рушійних ферментів. Процеси синтезу колагену багатокомпонентні і поступові, однак основу цього процесу становить саме ГП, що визначає його важливе діагностичне значення [196, 297].

Поява ГП в сироватці крові є результатом катаболічного процесу в СТ і може відображати його активність [285]. Пептидний колаген крові представлений на 65 % продуктами неповного розпаду нерозчинного колагену, тобто колагену сформованих волокон і на 35 % складається із заново синтезованого розчинного колагену, який ще не входить до складу сформованих колагенових волокон. Різке збільшення співвідношення пептидного колагену крові та зв’язаного ГП розцінюється як результат активації фіброгенезу в сполучній тканині [108, 151, 232]. Кількісне визначення ГП в біологічних рідинах дає інформацію про стан обміну колагену в організмі як при фізіологічних станах, так і при різних захворюваннях (спадкові колагенопатії, рахіт, остеомієліт, остеопороз, колагенози). Всі ці процеси супроводжуються розпадом колагену і підвищеним синтезом вільного та пептидозв'язаного гідроксипролінів (ВГП і

ПГП). За даними літератури в сироватці практично здорових людей вміст ВГП і ПГП стабільний [32, 38]. Величини цих показників у практично здорових людей з віком несуттєво зростають та можуть бути використані як біохімічні маркери синтезу колагену. ПГП – продукт неповного розпаду зрілого нерозчинного колагену та повторно синтезованого колагену, свідчить про швидкість колагеноутворення в організмі. Поряд з цим ПГП є колагеноподібним білком - компонентом системи комплементу, який відноситься до гострофазових білків та відображає реакцію організму на запалення [65, 93, 98]. Вільний гідроксипролін (ВГП) свідчить про інтенсивність синтезу та катаболізму молодого метаболічно-активного колагену [98]. Збільшення співвідношення ПГП та ВГП розцінюється як результат активації фіброгенезу в СТ [152, 215, 217, 302].

За літературними даними [8, 136] максимальний синтез колагену має місце при активному ХТГ, про що свідчить підвищення вмісту в сироватці крові ПГП, який характеризує колагеноутворення [60, 315]. У цих хворих має місце і вірогідне підвищення вільного гідроксипроліну (ВГП), який відображає процеси синтезу і деструкції незрілого колагену на тлі зниження еластазної активності. Зростання в сироватці крові вмісту ПГП більше 60 мкмоль/л, ВГП – більше 13 мкмоль/л вважається високочутливими показниками фібропластичного процесу у печінці [8, 207]. При цирозі печінки також відмічаються пертурбації обміну колагену, що відображається в змінах фракцій ГП [5, 6, 33, 183, 303].

Ще одним важливим чинником фіброгенезу та чутливим маркером затяжного перебігу захворювань печінки є активність колагенази. Низька концентрація колагенази на тлі високого показника співвідношення ПГП до ВГП вказує на затяжний перебіг запального процесу в печінці. Висока активність колагенази на тлі «фізіологічного» співвідношення фракцій ГП свідчить про високу зворотність метаболічних змін в СТ [145, 152].

На сьогодні все частіше для діагностики фіброзу печінки використовують прямі біохімічні маркери, які відображають метаболізм

позаклітинного матриксу та зміни його макроструктури. До них відносяться: матриксні металопротеїнази, тканинні інгібітори металопротеїназ та фактори росту (трансформуючий фактор росту, фактори росту гепатоцитів, епідермальні-, фібробластні-, сполучнотканинні та гемопоетичні фактори) [128, 142, 153, 149, 157, 165, 194, 271, 277, 279].

Таким чином, подальші дослідження особливостей метаболізму колагену та його зв'язку з різними сигнальними системами є актуальними, адже розширять існуючі уявлення щодо механізмів ушкодження та регенерації тканин печінки за хронічного токсичного гепатиту, а також обґрунтують нові підходи до корекції гепатотоксичності.

1.3 Сучасні напрямки фармакотерапії фіброзу печінки

Відповідно до сучасних поглядів фіброз печінки (ФП) являє собою одну з послідовних стадій хронічних дифузних хвороб печінки, що характеризується збільшенням у ній кількості колагену та інших матриксних білків, які порушують архітектоніку печінкової тканини та призводять до розвитку печінково-клітинної недостатності. ФП розглядається як репаративний процес у відповідь на ушкодження, який перебігає різноспрямовано і може бути потенційно зворотнім. Тому, раннє виявлення і уточнення стадії фіброзу дозволяє своєчасно призначити адекватну, патогенетично обґрунтовану терапію, спрямовану на зниження темпів прогресування та не допустити розвиток цирозу печінки і гепатоцелюлярної карциноми. Розуміння молекулярних механізмів ФП, функції основних клітин, що беруть участь у процесах фіброзоутворення, репаративних процесів, дозволило протягом останніх десятиріч почати пошук ефективних протифібротичних препаратів [3, 52, 58, 123, 276].

На сьогоднішній день вважається, що найбільш перспективним та багатообіцяючим напрямком у лікуванні ФП є зменшення активності РААС, яка є важливою ланкою у патогенезі розвитку і прогресування ФП. АТ II —

основний ефектор РААС у фіброгенезі. Його профіброгенна дія опосередкується через АТ II рецептори першого типу. Експериментальними дослідженнями встановлено, що блокатори рецепторів АТ II першого типу, а також іАПФ сповільнюють процес фіброзування у печінці [244]. Також доведено, що при накладанні лігатури на жовчні протоки, антагоністи рецепторів АТ II першого типу знижують накопичення колагенових волокон у печінці. Інгібітори АПФ та блокатори рецепторів АТ 1 сповільнюють прогресування ФП без індукції гіпотензивної відповіді, що було підтверджено морфологічно. Дана група препаратів блокує стимульовану АТ II продукцію TGF-β1 та експресію мРНК TGF. Незважаючи на відсутність зниження активності АЛТ і АСТ, гістологічна картина при їх застосуванні покращувалась. Наведені результати засвідчують про пряму антифібротичну дію блокаторів рецепторів АТ II [190]. В багатьох експериментальних дослідженнях продемонстровано, що блокування рецепторів до АТ II, а також використання інгібіторів АПФ значно покращує процеси регенерації тканини печінки [121, 173, 187, 237, 287, 290, 308].

Опубліковані результати проспективного рандомізованого клінічного дослідження у якому оцінювали ефективність і безпеку різних схем антигіпертензивної терапії у пацієнтів з артеріальною гіпертензією і НАСГ [18, 19, 134, 201, 280]. За цих умов використання саме іАПФ має безпосередній позитивний вплив на стан печінкової паренхіми, виявлявся менш виразний цитоліз гепатоцитів, а при гістологічному дослідженні печінки реєструвався менший ступінь фіброзу [119]. Було показано, що серед інгібіторів АПФ використання саме лізиноприлу є найбільш обґрунтованим у пацієнтів з патологією печінки, адже цей препарат є гідрофільним, приймається 1 раз на добу і не метаболізується через печінку. Однак, існують дані, що інші інгібітори АПФ, зокрема каптоприл, також достатньо ефективно сповільнює розвиток фіброзу печінки у щурів, що асоціюється зі зменшенням рівня TGF-β1 та експресії гену колагену [134, 141, 166, 181, 203].

Аналіз даних літератури свідчить про наявність фундаментальних досліджень щодо зв'язку між РААС та портальною гіпертензією (ПГ) [24]. Розширення ворітної вени внаслідок підвищеної резистентності гепатоцитів призводить до вивільнення вазодилататорів, які запускають компенсаторні механізми: активація РААС, внаслідок чого затримується в організмі вода та натрій, та стимуляція симпатичної нервової системи [314]. Отже, основним принципом патогенетичної терапії ПГ має стати ефективний вплив, в першу чергу, на зниження активності РААС та покращення портального кровообігу. Тільки такий підхід може забезпечити зворотній розвиток або стабілізацію ПГ, покращити прогноз та якість життя хворих з ЦП. В експерименті та в клініці показано, що за ЦП, який ускладнюється портальною гіпертензією, або на тлі супутньої артеріальної гіпертензії лізиноприл істотно зменшував мононуклеарна інфільтрація печінки, стабілізував тиск у портальній вені та ефективно стимулював регенерацію печінки [159, 270, 308]. У роботі Самогальською О.Є. та Лобанець Н.В. (2010) за результатами доплерографічних досліджень доведено позитивний вплив лізиноприлу при лікування синдрому ПГ у пацієнтів з алкогольним ЦП [80]. За даними Квасницької О.Б. (2017) використання лізиноприлу для комплексного лікування хронічного гепатиту профілактує прогресування дисфункції нирок шляхом зменшення активності РААС [28]. Позитивний ефект підтверджено зменшенням цитолітичного синдрому, відновленням процесів фільтрації, як за умов спонтанного діурезу так і при водному навантаженні, що може вказувати на підвищення адаптації нирок при лікуванні інгібітором АПФ [28, 80].

Єгипетські дослідники для медикаментозної корекції фіброзу печінки у щурів спричиненого CCl_4, обрали комбінацію лізиноприлу та силімарину. За результатами їх дослідження обидва препарати володіли антифібротичним ефектом, оскільки зменшувався рівень прозапальних та профіброгенних цитокінів, таких як TNF-α та TGFβ-1, нормалізувався рівень метолопротеаз та інгібіторів матриксних металопротеїназ MMP-2, TIMP-1, знижувався рівень гідроксипроліну, що поєднувалось зі значним покращенням печінкових

функцій, нормалізацією маркерів оксидативного стресу. Автори встановили, що антифібротична дія лізиноприлу реалізується не лише через класичні механізми, а й через зменшення активності ядерного фактору каппа В, підвищення антиокисдантного захисту в печінці [231, 251].

Розробка сучасної терапії фіброзу печінки об'єднує два напрямки: 1) з'ясування у «відомих» препаратів антифібротичних властивостей; 2) розробка нових засобів, які б діяли на невідомі механізми фіброзу печінки. З відомих засобів, в тій чи іншій мірі описаних у літературі – це простагландин E_2, пентоксифілін, фосфатидилхолін, донатори оксиду азот, вітамін Е (α-токоферолу ацетат), S-адеметіонін (гептрал), α- та γ- інтерферони, силімарин, есенціальні фосфоліпіди, урсодезоксихолева кислота [130, 234]. З нових засобів це антагоністи рецепторів TGF-β, блокатори Ca^{2+} - каналів Т-типу, амілорит, фактор росту гепатоцитів. Поряд з цим при CCl_4–індукованому ушкодженні печінки було виявлено антифіброгенну дію у диіндолметану, яка була супряжена з пригніченням оксидативного стресу, зменшенням вмісту TNF-α та активності апоптозу [216]. Також в експерименті доведено, що використання гідролізованого білка, отриманого з Sardinella aurita, за алкогольного ураження печінки та нирок виявляло гепато- та нефропротекторні ефекти [182]. Вченими обговорюється наявність позитивного впливу олії амаранту на функцію печінки на тлі токсичного тетрахлорметанового гепатиту [91].

Останні наукові дослідження зосереджені на пошуках нових методів терапії ФП шляхом пригнічення активації зірчастих клітин. Так, китайські вчені [193] дослідили позитивний лікувальний ефект препарату рослинного походження лівестіліду А, який виявив значний інгібуючий ефект на проліферацію зірчастих клітин [137, 199, 217, 307].

Недостатньо вивчена антифібротична роль окремих препаратів амінокислот, антиоксидантів та метаболічних засобів [10, 209]. Виявлено антифіброгенний ефект у відомого гепатопротектора L-аргініну L-глутамату, до складу якого входять амінокислоти аргінін та глутамат [3, 10, 258]. За умов

застосування даного препарату за хронічного гепатиту реєструвались гіпоамоніемічна, антиоксидантна, антигіпоксична дії, значно посилювався обмін речовин в печінці, нормалізувались процеси енергозабезпечення в гепатоцитах [102]. У роботі Шевченка О.П. (2015) встановлено позитивний лікувальний ефект L-аргініну L-глутамату в дозі 50 мг/кг на процеси фіброгенезу в печінці щурів на моделі токсичного ушкодження гепатоцитів тетрахлорметаном – зменшувалось фібротичне ураження печінки та посилювались процеси регенерації [101].

Таким чином, наведені літературні дані свідчать про невирішеність питань патогенезу гепато- та нефротоксичності, механізмів регенерації тканин печінки та нирок за цих умов, що значно ускладнює розробку ефективних засобів медикаментозної терапії.

Результати даного розділу опубліковано у праці [5].

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Характеристика експериментальних тварин та моделей

Досліди проведені на 96 білих нелінійних лабораторних статевонезрілих щурах-самицях з масою 60-80 г, отриманих з віварію ВНМУ ім. М. І. Пирогова. Усі тварини перебували в стандартних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч, воду і збалансований гранульований корм отримували ad libitum у відповідності до нормативів [27]. Через визначені умовами експерименту проміжки часу тварин знеживлювали методом декапітації під тіопенталовим наркозом (тіопентал натрію 40 мг/кг в/оч). Всі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9:00 до 10:00. Загальний стан тварин, кількість спожитого корму та води оцінювали щоденно. Контрольне зважування щурів проводили кожні 7 днів.

Дослідження виконані з дотриманням міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погоджене з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986) [17]. Дотримання етичних принципів роботи засвідчено комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол № 8 від 05.09.2018 та протокол № 10 від 02.12.2021). Усі прилади, що використовувались у ході наукового дослідження, підлягали систематичному метрологічному контролю.

Моделювання хронічного токсичного гепатиту. Проводили шляхом інтрагастрального введення 20% олійного розчину тетрахлорметану в дозі 0,1

мл/100 г маси двічі на тиждень у комбінації з 5% розчином етанолу протягом 8 тижнів [67].

Методика корекції хронічного токсичного гепатиту лізиноприлом та референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом. Щурі протягом 8 тижнів на тлі введення гепатотоксинів трихлорметану та етанолу (дози, шляхи та тривалість введення наведені вище) отримували інтрагастрально інгібітор ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприл (Лізиноприл-Астрафарм, ТОВ «Астрафарм», Україна) – у дозі 20 мг/кг/добу, або відомий гепатопротектор L-аргінін L-глутамат (Глутаргін, ТОВ «Здоров'я», Україна) – в дозі 35мг/кг/добу. Дози, шляхи та тривалість введення вказаних речовин були запозичені з літератури при проведенні подібних досліджень, не викликали загибелі тварин та не мали токсичної побічної дії [90].

Серед інгібіторів АПФ в якості препарату коректора використовували лізиноприл, адже він не метаболізується через печінку, є гідрофільним, має тривалу дію та призначається 1 раз на добу [28]. Препаратом порівняння був обраний L-аргінін L-глутамат, який є відомим гепатопротектором, виявляє гіпоамоніємічну, антиоксидантну, антигіпоксичну дії, значно посилює обмін речовин в печінці, нормалізує процеси енергозабезпечення в гепатоцитах [102]. Поряд з цим у L-аргініну L-глутамату виявлено здатність стримувати фіброз печінки за токсичної дії тетрахлорметану [101].

Розподіл тварин на групи та дизайн експерименту (табл. 2.1). Усі тварини відповідно до мети та задач дослідження були розподілені на чотири експериментальні групи (по 24 тварини в кожній): 1 група – інтактні щурі, які перебували в стандартних умовах віварію; 2 група – тварини з хронічним токсичним гепатитом (ХТГ); 3 група – тварини з ХТГ, які отримували лікування лізиноприлом; 4 група – тварини з ХТГ, корекцію якого проводили препаратом порівняння L-аргініном L-глутаматом (дози, шляхи й тривалість введення гепатотоксинів та препаратів коректорів наведено вище). Після знеживлювання тварин проводили забір крові, печінки та нирок, які в

подальшому були використані для біохімічних, імуноферментних, морфологічного та цитофлуориметричного досліджень.

Таблиця 2.1

Розподіл експериментальних тварин за групами та напрямками дослідження

№ групи	Назва групи	Кількість тварин у групі	Напрямки дослідження	Кількість тварин за напрямком досліджень
1.	Інтактні тварини	24	Біохімічні та імуноферментні	n=12
			Морфологічні та цитофлуориметричні	n=12
2.	ХТГ	24	Біохімічний + імуноферментний	n=12
			Морфологічний + цитофлуориметричний	n=12
3.	ХТГ + лізиноприл	24	Біохімічний + імуноферментний	n=12
			Морфологічний + цитофлуориметричний	n=12
4.	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	24	Біохімічний + імуноферментний	n=12
			Морфологічний + цитофлуориметричний	n=12

Примітка. ХТГ – хронічний токсичний гепатит

2.2 Біохімічні та імуноферментні методи дослідження

Виконані на базі науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М. І. Пирогова (свідоцтво МОЗ України про переатестацію № 049/15 від 02.03.2015 р.). Для досліджень використовували сироватку крові, постядерні супернатанти гомогенатів печінки та нирок.

Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 1500g протягом 20 хв при 18-22 ºС. Печінку та нирки перфузували холодним 1,15% розчином калію хлориду і гомогенізували при 3000 об/хв. (тефлон-скло) в середовищі 1,15% калію хлориду (співвідношення 1:3). Постядерну фракцію отримували центрифугуванням гомогенатів упродовж 30 хв при 1500 g та +4ºС.

В сироватці крові визначали вміст трансформуючого фактору росту бета (TGF-β), інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1) та фракцій гідроксипроліну (вільного, пептидозвя'заного та загального). В гомогенатах печінки та нирок оцінювали рівень вільного гідроксипроліну.

Вміст ТФР-β визначали імуноферментним методом за набором «Rat TGF beta Platinum ELISA» (eBioscience, Австрія) відповідно до інструкції фірми-виробника. Коефіцієнт варіації < 10%, аналітична чутливість методу – 7,8 пг/мл ТФР-β1.

Зразки сироватки крові перед проведеннями ІФА готували наступним чином: до 20 мкл сироватки крові додавали 920 мкл буферного розчину (PBS, 1% Tween 20, 10% BSA), 30 мкл 1 М HCl, перемішували, інкубували 60 хв при кімнатній температурі, нейтралізували додаванням 30 мкл 1 М NaOH. Ретельно перемішували.

У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до ТФР-β1, додавали по 80 мкл буферного розчину, 20 мкл стандартних розчинів (з відомими концентраціями ТФР-β – 0; 31,3; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 пг/мл), контрольних проб та проб сироватки крові, герметизували адгезивною плівкою, інкубували 2 год. при 18-25ºС на шейкері. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл кон'югату антитіл до ТФР-β1 з біотином, герметизували адгезивною плівкою, інкубували 1 год. при 18-25ºС. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл ензимного кон'югату (стрептавідин-пероксидаза хріну), герметизували адгезивною плівкою, інкубували 30 хвилин при 18-25ºС. Лунки відмивали від надлишку реагентів, вносили 100 мкл хромогену –

тетраметилбензидину (ТМВ-субстрату), інкубували 30 хв. при 18-25°С в темноті, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр 630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. При обчисленні результатів врахований фактор розведення проб.

Вміст IGF-1 визначали імуноферментним методом за набором «m/r IGF-1-ELISA (IGFBP-blocked)» (Mediagnost, Німеччина) відповідно до інструкції фірми-виробника. Коефіцієнт варіації < 10%, аналітична чутливість методу < 0,029 нг/мл IGF-1.

У лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до IGF-1, додавали по 50 мкл кон'югату біотинильованих анти-IGF-1, 50 мкл стандартних розчинів (з відомими концентраціями IGF-1 – 0; 0,5; 2,5; 6,0; 12,0; 18,0 пг/мл), контрольних проб та проб сироватки крові, герметизували адгезивною плівкою, інкубували 1 год. при 18-25°С на шейкері (350 rpm). Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили по 100 мкл ензимного кон'югату (стрептавідин-пероксидаза хріну), герметизували адгезивною плівкою, інкубували 30 хвилин при 18-25°С на шейкері (350 rpm). Лунки відмивали від надлишку реагентів, вносили 100 мкл хромогену – тетраметилбензидину (ТМВ-субстрату), інкубували 30 хв. при 18-25°С в темноті, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр 630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. При обчисленні результатів враховували фактор розведення проб.

Вміст фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, гомогенатах печінки та нирок визначали за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом спектрофотометричним методом [99]. Принцип методу заснований на визначенні оптичної щільності червоного хромогену, що утворився при конденсації продуктів окиснення гідроксипроліну з пара-диметиламінобензальдегідом.

Для визначення вмісту фракцій гідроксипроліну в сироватці крові у центрифужну пробірку додавали 1 мл сироватки, 0,5 мл 5% трихлороцтової кислоти та 0,5 мл 5% $HClO_4$. Центрифугували при 3000 об / хв. 10 хвилин.

Супернатант розподіляли по 0,75 мл в дві пробірки для визначення вільної фракції гідроксипроліну (пробірка № 1) і загального гідроксипроліну (пробірка № 2). Вміст пробірки № 1 нейтралізували 24% розчином NaOH; вміст пробірки № 2 гідролізували на водяній бані 40 хвилин при температурі 60°С і далі нейтралізували 24% розчином NaOH. В усі пробірки додавали 0,5 мл розчину хлораміну Б, 0,5 мл 57% $HClO_4$, 0,5 мл пара-диметилбензальдегіду, інкубували 20 хв. при 60°С. Оптичну щільність проб визначали при 560 нм на КФК-3. Вміст пептидозвя'заного гідроксипроліну розраховували як різницю загального та вільного гідроксипроліну.

З метою оцінки рівня вільного гідроксипроліну в тканинах печінки та нирок до 0,5 мл відповідних гомогенатів додавали 3 мл 96 % етанолу, центрифугували при 3000 об/хв упродовж 10 хв., відбирали супернатант, випарювали його, а сухий залишок розчиняли в 0,5 мл дистильованої води. До 50 мкл екстракту додавали 900 мкл 56 мМ хлораміну Т, інкубували 25 хв. при 20-22°С, додавали 1,0 мл 1 М пара-диметиламінобензальдегіду, інкубували 20 хв. Оптичну щільність проб визначали при 560 нм на КФК-3.

2.3 Цитофлуориметричні дослідження

Дослідження виконані на базі науково-дослідної лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Для досліджень використовували шматочки тканин печінки та верхнього полюсу лівої нирки, які промивали стерильним 0,9 % розчином NaCl, а далі занурювали у фосфатно-сольовий буфер pH 7,4 (Sigma) у переносний холодильник з температурою 4-8°С для подальшого дослідження вмісту ДНК методом проточної цитометрії.

Суспензії ядер з клітин печінки та кіркової речовини нирки щурів отримували за допомогою спеціального набору для дослідження ядерної ДНК CyStain DNA Step 1 фірми Partec, Німеччина, відповідно до протоколу-інструкції виробника. Даний набір дозволяє виконувати екстракцію ядер та

маркувати ядерну ДНК діамідинофеніліндолом (DAPI). Усі дослідження виконані в стерильних умовах на свіжому матеріалі тканини печінки та нирок не пізніше, ніж через 2 години після виведення тварини з експерименту. Враховуючи той факт, що регенерація різних ділянок печінки відбувається неоднаково [278], ми проводили забір зразків тканини печінки та кіркової речовини нирок для проведення досліджень методом проточної цитометрії з аналогічної ділянки в усіх піддослідних тварин (ліва велика частка печінки та верхній полюс лівої нирки). Печінку та нирки подрібнювали на шматочки розміром приблизно 1-2 мм^3 з наступною обробкою ДАПІ. У процесі виготовлення нуклеарних суспензій використовувались одноразові фільтри CellTrics 50 мкм (Partec, Німеччина).

Проточний аналіз виконувався на багатофункціональному науково-дослідному проточному цитометрі "Partec PAS" фірми Partec, Німеччина. Для збудження флуоресценції DAPI застосовувалось УФ-випромінювання. З кожного зразка нуклеарної суспензії реєєструвалось 20 тис. подій. Аналізу підлягали події (ядра клітин) з вмістом ДНК ≤ 4с (гейт RN1).

Розподіл ДНК, що відображає клітинний цикл ядер гепатоцитів та клітин нирок інтактних щурів представлений на гістограмах з використанням лінійної шкали (рис. 2.1-2.2).

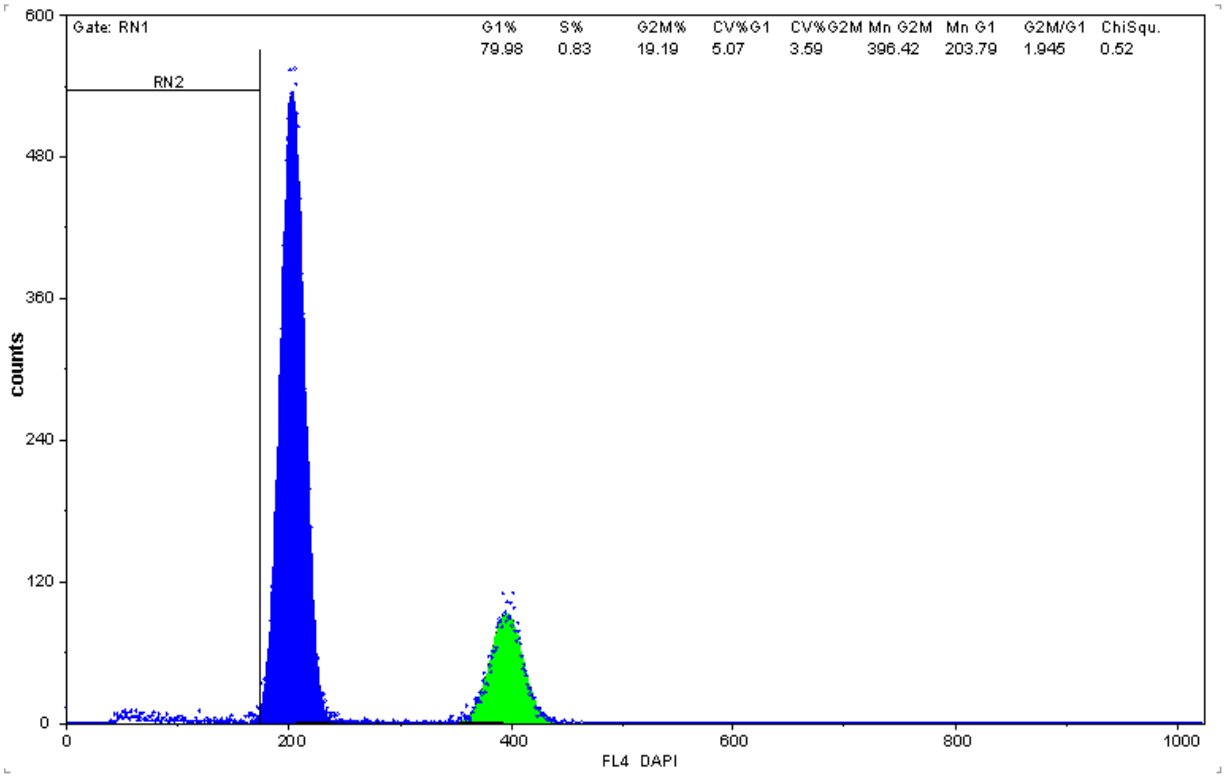

Рис. 2.1. Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК та фази клітинного циклу ядер гепатоцитів інтактного щура.

На гістограмах позначено: синім кольором – збіг фази G_1 – відсоткове співвідношення клітин в інтервалі G_0/G_1 до всіх клітин клітинного циклу; зеленим – збіг фази G_2/M – відсоткове співвідношення клітин в інтервалі G_2/M до всіх клітин клітинного циклу; інтервал RN_1 – субдиплоїдна ділянка, яка відображає фрагментацію ДНК у ядрах тканини печінки. Цифрові дані : CV % G_1 – відносний коефіцієнт варіації піку G_1; CV % G_2 – відносний коефіцієнт варіації піку G_2M; MnG_2M – середнє значення каналу піку G_2M; MnG_1 – середнє значення каналу піку G_1; ChiSqu – зміряна варіація між експериментальними даними і відповідною математичною моделлю.

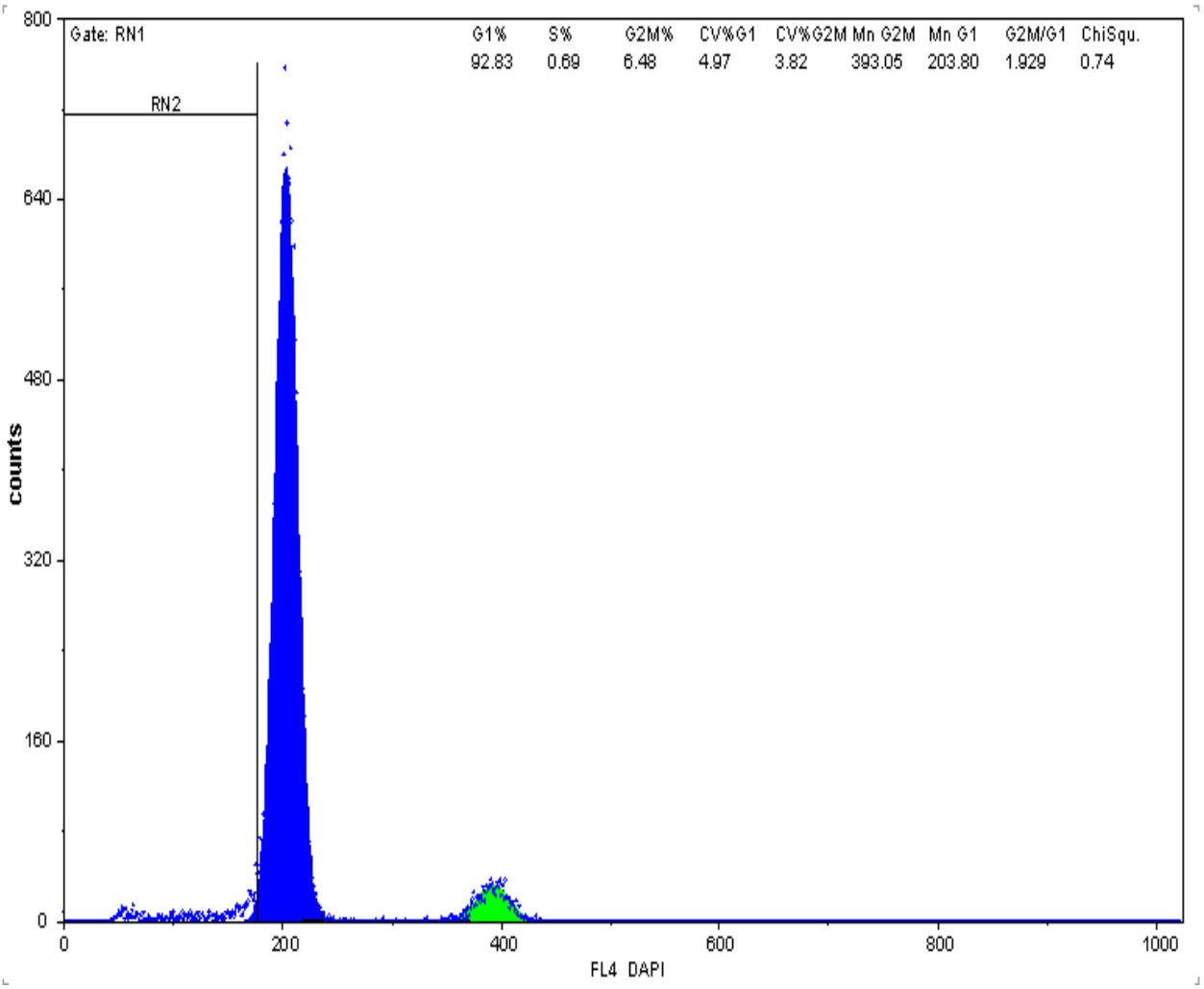

Рис. 2.2. Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК та фази клітинного циклу ядер клітин кіркової речовини нирок.

Циклічний аналіз клітин виконувався засобами програмного забезпечення FloMax (Partec, Німеччина) у повній цифровій відповідності згідно математичної моделі. В результаті цього аналізу отримували наступні показники:

- G0G1 – відсоткове співвідношення клітин фази G0G1 до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК = 2c);
- S - відсоткове співвідношення клітин фази синтезу ДНК до всіх клітин клітинного циклу (вміст ДНК > 2c та < 4c.);
- G2 + M – відсоткове співвідношення фази G2 + M до всіх клітин клітинного циклу (ДНК = 4c, або поліплоїдні);

- IP - індекс проліферації, який визначали за сумою показників S + G2 + M;
- Визначення фрагментації ДНК (апоптоз) виконано шляхом виділення SUB-G0G1 ділянки на ДНК-гістограмах – RN2 перед піком G0G1, яка вказує на ядра клітин з вмістом ДНК < 2c.

Плоїдність ДНК в ядрах клітин тканин печінки оцінювали за допомогою програмних засобів FloMax (фірма Partec, Німеччина) методом цифрової відповідності з лінійним посиленням. За цих умов математична модель (сума дзвоноподібних розподілів Гауса) зіставляється з даними гістограми. В цій моделі, кожний пік представлений розподілом Гауса із заданим положенням, шириною і висотою. На ДНК-гістограмах аналізували відсотки ядер, що мають різний вміст ДНК, що відображалось піками диплоїдного, тетраплоїдного, октаплоїдного набору ДНК.

Результати представлені на гістограмах, де перший пік відповідає диплоїдному (2 c) набору хромосом у ядрі, другий – тетраплоїдному (4 c), третій – октаплоїдному (8 c), четвертий – представляє ядра, що містять 16 наборів хромосом.

2.4 Морфологічні дослідження

Виконані на базі наукової лабораторії навчально наукового інституту морфології Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського. Матеріалом для морфологічних досліджень були фрагменти печінки (ліва доля) та нирок (ліва нирка верхній полюс) розміром 1х1 см. Шматочки фіксували в 10 % розчині формаліну, при цьому тривалість експозиції не перевищувала 1 – 2 доби. Застосований фіксуючий розчин запобігає процесу аутолізу та стабілізує клітини і тканини для їх подальшої обробки, та використання в процедурах забарвлення. Далі проводили дегідратацію шматочків в спиртах зростаючої концентрації та заливали в

парафінові блоки. Виготовлення серійних парафінових зрізів товщиною 4-6 мкм проводили на санному мікротомі. Подальше виготовлення гістологічних препаратів здійснювалося згідно загальноприйнятих методик [88].

Забарвлення препаратів здійснювали гематоксиліном і еозином для аналізу ступеня ушкодження та репаративної регенерації тканини печінки і нирок щурів в умовах хронічного токсичного гепатиту та фіброзу на тлі медикаментозної корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом [81].

Гістологічне дослідження секційних препаратів було проведено з використанням мікроскопу «OLYMPUS BN-2» зі збільшенням від 100 до 400 разів. Огляд і опис гістологічних препаратів проводили під різними збільшеннями об'єктива та окуляра. Вибірково окремі мікропрепарати досліджувалися при поляризованому освітленні.

2.5 Методи статистичного аналізу

Статистичний аналіз отриманих при виконанні роботи цифрових результатів здійснювали на персональному комп’ютері за допомогою комп’ютерних прикладних програм MS Excel, SPSS22 for Windows. Результати наведено як M±m. Нормальність розподілу визначали за критерієм Шапіро-Уілка. Для оцінки відмінностей показників застосовували параметричний t-критерій Ст’юдента (при нормальному розподілі) або непараметричний критерії U Мана-Уітні (при відхиленні від нормального розподілу). Зв’язок між показниками визначали шляхом кореляційного аналізу за Пірсоном та Спірманом [39, 56]. Для оцінки біохімічних показників застосовували метод персентилів (визначали медіану, P_5, P_{10}, P_{25}, P_{50}, P_{75}, P_{90}, P_{95}). Статистично значущими вважали відмінності при $p<0,05$.

Результати даного розділу опубліковано у працях [64, 65, 66, 73, 241, 248, 249].

РОЗДІЛ 3
БІОХІМІЧНІ МАРКЕРИ ФІБРОЗУ В ПЕЧІНЦІ, НИРКАХ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

Хронічні токсичні гепатити є досить значущою медико-соціальною проблемою сьогодення через велику розповсюдженість та досить швидке прогресування з розвитком цирозу печінки [3, 20, 44, 104]. Поряд з цим токсичні ураження печінки досить часто асоціюються з пошкодженням нирок – гепаторенальний синдром, що значно ускладнює лікування та реабілітацію цих пацієнтів [105].

Важливим патогенетичним чинником ураження нирок за патології печінки є гіперактивація РААС [246]. Відомо, що використання інгібіторів РААС виявляє нефропротекторний потенціал та сповільнює прогресування токсичних гепатитів [44, 101]. Однак, залишається невирішеним питання щодо молекулярних механізмів пошкодження та регенерації тканин печінки й нирок за дії різних токсикантів (тетрахлорметану, етанолу) і на тлі корекції інгібітором АПФ лізиноприлом, що і стало метою дослідження цього розділу дисертаційної роботи.

Для досягнення поставленої мети нами були вирішені наступні завдання:

1. Оцінити особливості обміну колагену за фракційним розподілом гідроксипроліну в сироватці крові та рівнем вільного гідроксипроліну в печінці й нирках щурів на тлі хронічного токсичного гепатиту (індукованого тетрахлорметаном й етанолом) та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (препарат порівняння).

2. Дослідити роль різних сигнальних систем, а саме TGF-β та IGF-1 в механізмах пошкодження й регенерації тканин печінки і нирок у щурів за

хронічного токсичного гепатиту (індукованого тетрахлорметаном й етанолом) та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом.

3.1 Вміст фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (препарат порівняння)

Використання токсикантів тетрахлорметану та етанолу супроводжується достовірною зміною рівня загального гідроксипроліну в сироватці крові щурів (рис. 3.1). Так, в контрольній групі щурів медіана сироваткового рівня загального гідроксипроліну становила 52,6 (95% CI 42,3-63,8) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в діапазоні 47,8-60,0 мкмоль/л. Натомість, хронічний токсичний гепатит викликав достовірне зростання вмісту загального гідроксипроліну за середніми показниками на 23,8% ($p<0,001$), показник медіани становив 67,7 (95% CI 55,7-76,2) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал – 59,1-71,3 мкмоль/л.

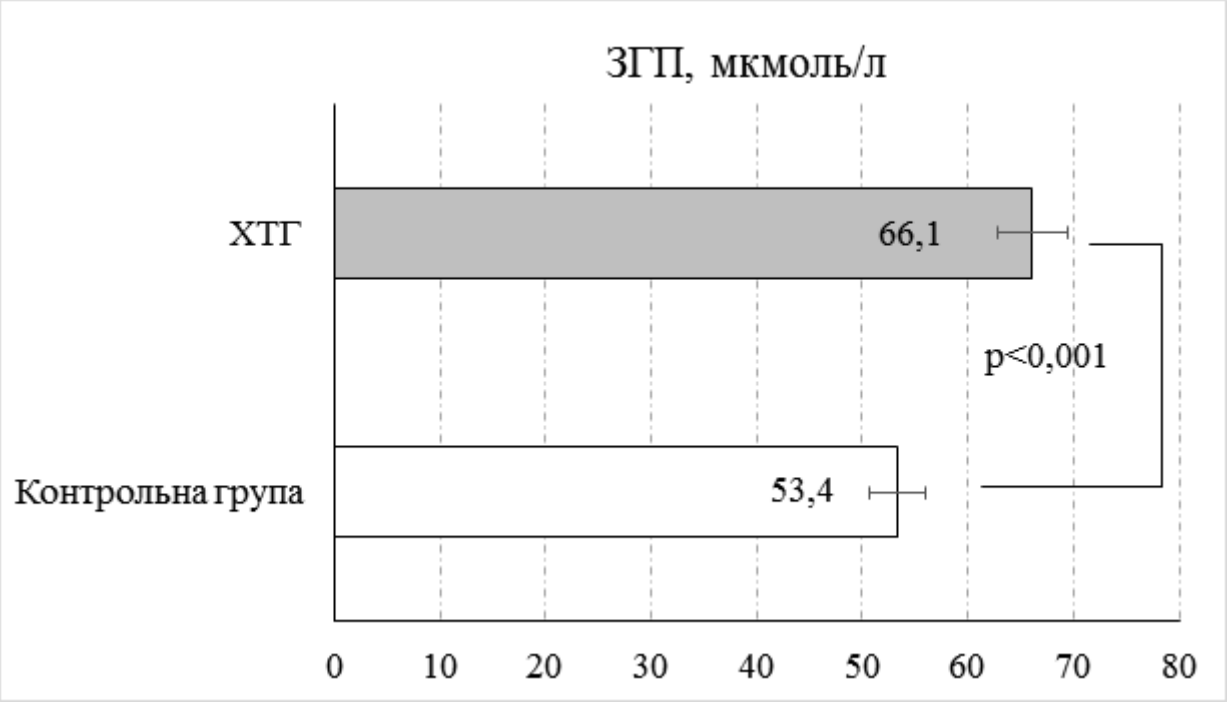

Рис. 3.1 Вплив хронічного токсичного гепатиту на рівень загального гідроксипроліну в сироватці крові щурів (M±m, n=12).

Застосування лізиноприлу та препарату порівняння L-аргініну L-глутамату на тлі хронічного токсичного гепатиту чинить коригуючий вплив на вміст загального гідроксипроліну в сироватці крові (табл. 3.1). В групі тварин, лікованих лізиноприлом, рівень загального гідроксипроліну за середнім показником був на 24,5% меншим ($p<0,01$), ніж у групі «ХТГ», показник медіани становив 49,7 (95% CI 37,7-63,3) мкмоль/л, а P_{25}-P_{75} був у межах 39,6-57,7 мкмоль/л. За цих умов вміст загального гідроксипроліну в сироватці крові статистично достовірно не відрізнявся від такого в контрольній групі тварин.

Використання референс-препарату з метою корекції хронічного токсичного гепатиту чинить менший вплив на сироватковий вміст загального гідроксипроліну, ніж лізиноприл: його рівень за середнім показником був на 19,1% меншим ($p<0,01$), ніж у групі «ХТГ», показник медіани становив 53,6 (95% CI 39,2-69,1) мкмоль/л, а P_{25}-P_{75} був у межах 44,0-62,9 мкмоль/л. В групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» середній показник рівня загального гідроксипроліну вірогідно не відрізняється від таких у щурів, лікованих лізиноприлом, та контрольної групи тварин.

Таблиця 3.1

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на рівень загального гідроксипроліну в сироватці крові у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	ЗГП, мкмоль/л
1	Контрольна група	53,4±2,32
2	ХТГ	66,1±2,26*
3	ХТГ + лізиноприл	49,9±2,87#
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	53,5±3,33#

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,001$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$).

Хронічний токсичний гепатит, індукований введенням тетрахлорметану та етанолу, асоціюється з посиленням процесів деградації незрілого колагену, про що свідчать зміни сироваткового рівня фракції вільного гідроксипроліну (рис. 3.2).

В контрольній групі тварин показник медіани рівня вільного гідроксипроліну в сироватці крові дорівнював 22,6 (95% CI 15,3-35,8) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} коливався в діапазоні 21,3-30,2 мкмоль/л.

За хронічного токсичного гепатиту реєструвалось статистично вірогідне зростання сироваткового рівня вільного гідроксипроліну: його середній показник на 23,3% ($p<0,05$) перевищував такий в контрольній групі тварин. За результатами персентильного аналізу в групі щурів «ХТГ» медіана вмісту вільного гідроксипроліну в сироватці крові становила 30,2 (95% CI 23,1-37,9) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} перебував в межах 25,2-35,1 мкмоль/л.

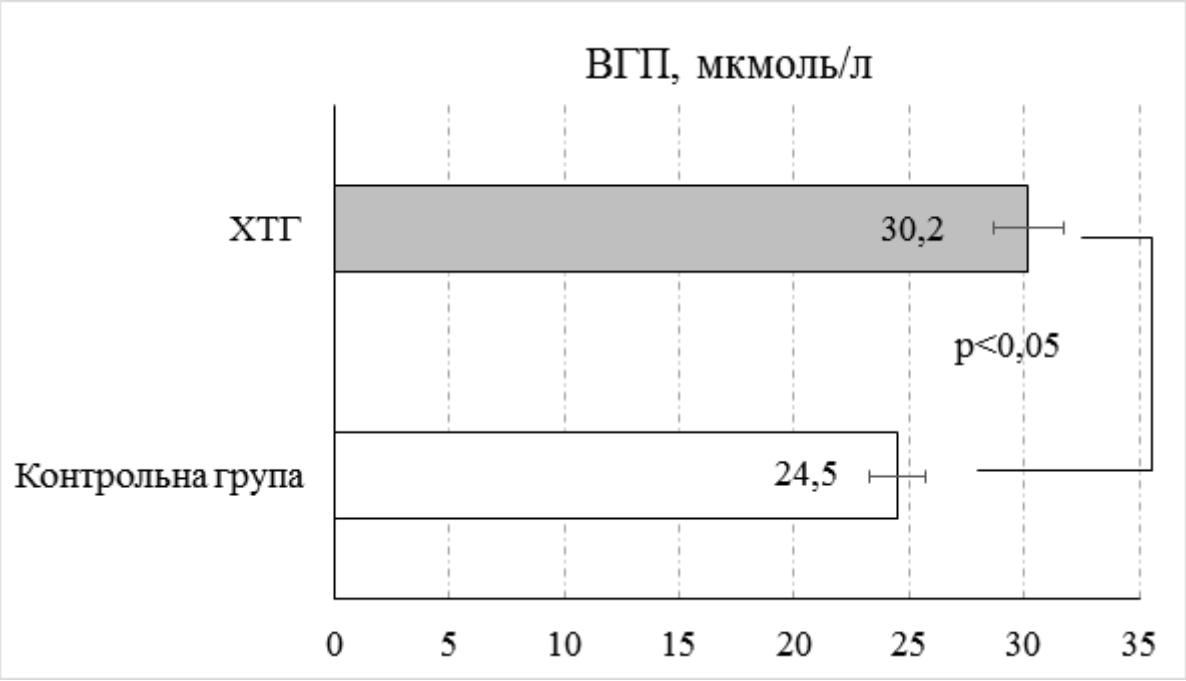

Рис. 3.2 Вплив хронічного токсичного гепатиту на рівень вільного гідроксипроліну в сироватці крові щурів (M±m, n=12).

Застосована медикаментозна терапія з різною ефективністю чинила коригуючий вплив на зміни рівня вільного гідроксипроліну в сироватці крові щурів, індуковані хронічним токсичним гепатитом (табл. 3.2).

В групі тварин «ХТГ+лізиноприл» рівень вільного гідроксипроліну в сироватці крові за середнім показником був вірогідно меншим на 18,2% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами; показник медіани становив 24,5 (95% CI 19,3-29,3) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} був у діапазоні 22,0-28,5 мкмоль/л. За цих умов були відсутні вірогідні відмінності середнього рівня вільного гідроксипроліну, порівняно з таким у тварин контрольної групи.

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту L-аргініном L-глутаматом в меншій мірі коригувала процеси деградації незрілого колагену, порівняно з лізиноприлом: середній вміст вільного гідроксипроліну вірогідно не відрізнявся від такого у групі нелікованих тварин, хоча і був на 15,2% ($p>0,05$) меншим. В групі тварин «L-аргінін L-глутамат» були відсутні вірогідні відмінності за середньою величиною цього показника з такими у контрольній групі та тварин, лікованих лізиноприлом.

Таблиця 3.2

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на рівень вільного гідроксипроліну в сироватці крові у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	ВГП, мкмоль/л
1	Контрольна група	24,5±2,09
2	ХТГ	30,2±1,63*
3	ХТГ + лізиноприл	24,7±1,11#
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	25,6±3,97

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,05$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$).

Введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу супроводжується посиленням процесу синтезу колагену в організмі щурів про що доказово свідчать достовірні зміни рівня пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові (рис. 3.3).

Встановлено, що у тварин контрольної групи показник медіани рівня пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові становив 29,4 (95% CI 17,1-40,2) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} коливався в діапазоні 24,2-32,9 мкмоль/л.

Хронічний токсичний гепатит супроводжувався зростання середнього рівня пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові на 17,4% ($p<0,05$), порівняно з таким у тварин контрольної групи. Проведення персентильного аналізу показало, що у тварин групи «ХТГ» величина медіани рівня пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові становила 35,2 (95% CI 26,4-39,7) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} змінювався в діапазоні 30,3-37,4 мкмоль/л.

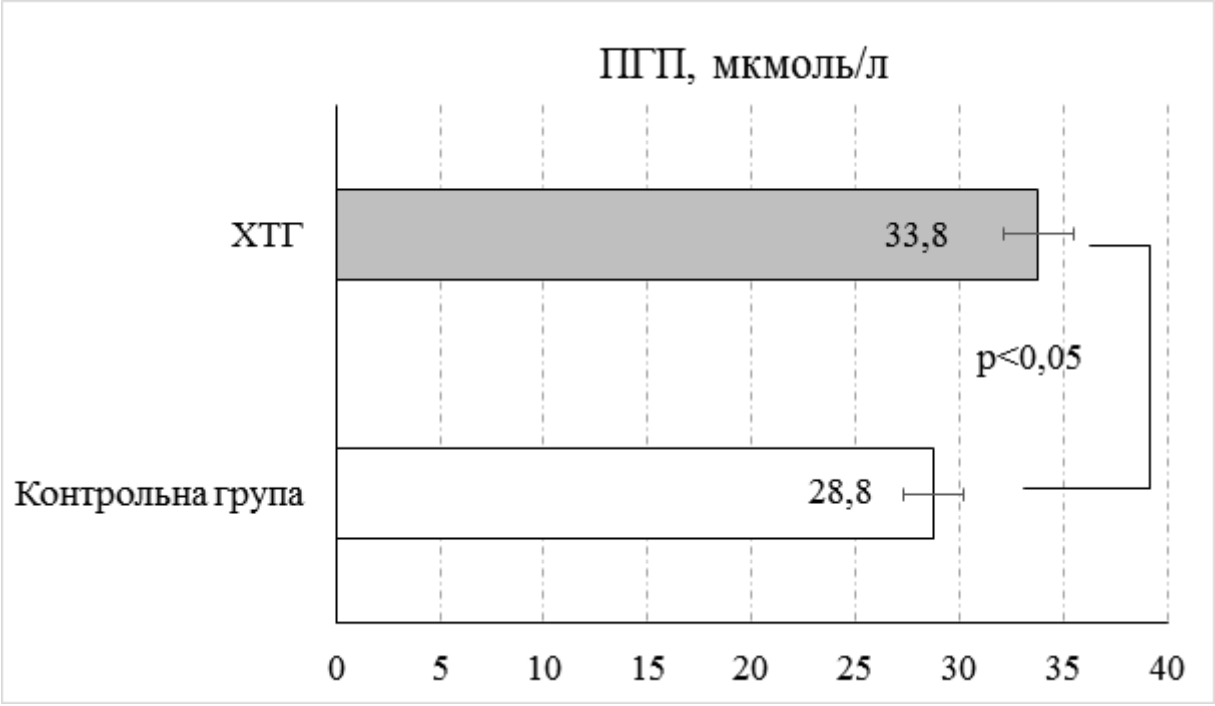

Рис. 3.3 Вплив хронічного токсичного гепатиту на рівень пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові щурів (M±m, n=12).

Застосована терапія мала різну ефективність щодо корекції процесів колагеногенезу (за показником рівня пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові щурів) в організмі щурів за умов хронічного токсичного гепатиту (табл. 3.3).

З'ясувалось, що у тварин, лікованих лізиноприлом, середній показник рівня пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові був вірогідно меншим на 25,4% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. За цих умов були відсутні статистично вірогідна різниця середнього рівня метаболіту, порівняно з тваринами контрольної групи. Персентильний аналіз встановив, що у тварин групи «ХТГ + лізиноприл» показник медіани становив 24,9 (95% CI 16,6-33,7) мкмоль/л, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} був у діапазоні 20,1-31,2 мкмоль/л.

Застосування L-аргініну L-глутамату з меншою ефективністю коригувало колагеногенез в організмі щурів за хронічного токсичного гепатиту: середній вміст пептидозв'язаного гідроксипроліну гідроксипроліну вірогідно не відрізнявся від такого у групі нелікованих тварин, але був меншим на 17,5% ($p>0,05$).

Таблиця 3.3

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на рівень пептидозв'язаного гідроксипроліну в сироватці крові у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	ПГП, мкмоль/л
1	Контрольна група	28,8±2,31
2	ХТГ	33,8±1,38*
3	ХТГ + лізиноприл	25,2±1,89#
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	27,9±4,29

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,05$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$).

У подальшому нами оцінено зміни метаболізму колагену безпосередньо в печінці та нирках щурів (за рівнем вільного гідроксипроліну) на тлі хронічного токсичного гепатиту та його корекції (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на рівень вільного гідроксипроліну в печінці та нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	ВГП, мкмоль/г тканини	
		Печінка	Нирки
1	Контрольна група	3,11±0,12	1,25±0,08
2	ХТГ	4,75±0,14*	1,74±0,11*
3	ХТГ + лізиноприл	$3,65±0,15^{\#*}$	$1,31±0,12^{\#}$
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	$4,12±0,16^{\#*\&}$	1,55±0,09*

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,001$);
2. $^{\#}$ - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$);
3. $^{\&}$ - достовірність відмінностей між групами 3 та 4 ($p<0,05$).

Персентильний аналіз показав, що у контрольної групи щурів медіани рівнів вільного гідроксипроліну в печінці та нирках становили відповідно 3,15 (95% CI 2,46-3,69) та 1,26 (95% CI 0,90-1,65) мкмоль/г тканини, а інтерквартильний інтервал був у межах 2,86-3,40 мкмоль/г тканини (в печінці) та 1,07-1,42 мкмоль/г тканини (в нирках).

Хронічний токсичний гепатит асоціювався з посиленням процесів розпаду колагену в печінці та нирках щурів, доказом чого було зростання середніх показників вмісту вільного гідроксипроліну в органах відповідно на 52,7 та 39,2% ($p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи. У групі тварин «ХТГ» показники медіан рівнів вільного гідроксипроліну в печінці та

нирках становили відповідно 4,76 (95% CI 3,95-5,35) та 1,83 (95% CI 1,21-2,27) мкмоль/г тканини, а інтерквартильний інтервал був у межах 4,53-5,18 мкмоль/г тканини (в печінці) та 1,36-1,99 мкмоль/г тканини (в нирках).

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту по різному впливала на процеси катаболізму колагену в органах щурів. У щурів, які отримували лізиноприл, відмічалось найбільш суттєве пригнічення процесів розпаду колагену в печінці та нирках. Так, у тварин групи «ХТГ + лізиноприл» середній рівень вільного гідроксипроліну в печінці та нирках був меншим відповідно на 23,2 та 24,7% ($p<0,01$), порівняно з нелікованими тваринами; показники медіан становили відповідно 3,76 (95% CI 2,87-4,39) мкмоль/г тканини у печінці та 1,35 (95% CI 0,65-1,81) мкмоль/г тканини у нирках, а інтерквартильний інтервал був у межах 3,22-3,96 мкмоль/г тканини (в печінці) та 0,97-1,69 мкмоль/г тканини (в нирках).

Введення референс-препарату за хронічного токсичного гепатиту виявляло меншу здатність коригувати процеси розпаду колагену, порівняно з лізиноприлом. Виявилось, що у тварин групи «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» за середнім показником вміст вільного гідроксипроліну в печінці та нирках був меншим відповідно на 13,3% ($p<0,01$) та 10,9% ($p<0,01$), ніж у нелікованих тварин. Поряд з цим досліджуваний показник був вірогідно вищим, порівняно з таким у тварин, лікованих лізиноприлом. За результатами персентильного аналізу у групі «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» величини медіан рівня вільного гідроксипроліну у органах дорівнювали відповідно 4,19 (95% CI 3,24-4,87) та 1,56 (95% CI 1,10-1,98) мкмоль/г тканини, а інтерквартильний інтервал - 3,85-4,47 та 1,41-1,70 мкмоль/г тканини.

Таким чином введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликало порушення метаболізму колагену та розвиток фіброзу в печінці та нирках щурів. За цих умов використання інгібітору АПФ лізиноприлу супроводжувалось вірогідним зменшенням пертурбацій обміну колагену та антифіброгенною дією в печінці та нирках. За вказаним ефектом лізиноприл значно випереджав препарат порівняння L-аргінін L-глутамат.

3.2 Рівні TGF-β та IGF-1 в сироватці крові та їх зв'язок з показниками метаболізму колагену в печінці, нирках й сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом

Дослідження сироваткового рівня профіброгенного цитокіну TGF-β показало важливу роль TGF-β-опосередкованого сигнального шляху в механізмах токсичної дії тетрахлорметану та етанолу (рис. 3.4).

Встановлено, що в групі контролю величина медіани рівня TGF-β у сироватці крові становила 56,7 (95% CI 43,6-64,8) нг/мл, а інтерквартильний інтервал перебувавав в межах 49,6-60,7 нг/мл.

Моделювання хронічного токсичного гепатиту супроводжувалось вірогідним зростанням середнього рівня цитокіну на 13,5 % ($p<0,001$), відносно показника контрольної групи тварин. За результатами персентильного аналізу в групі тварин «ХТГ» величина медіани рівня TGF-β у сироватці крові становила 63,2 (95% CI 48,0-77,8) нг/мл, а інтерквартильний інтервал перебував у межах 57,4-67,8 нг/мл.

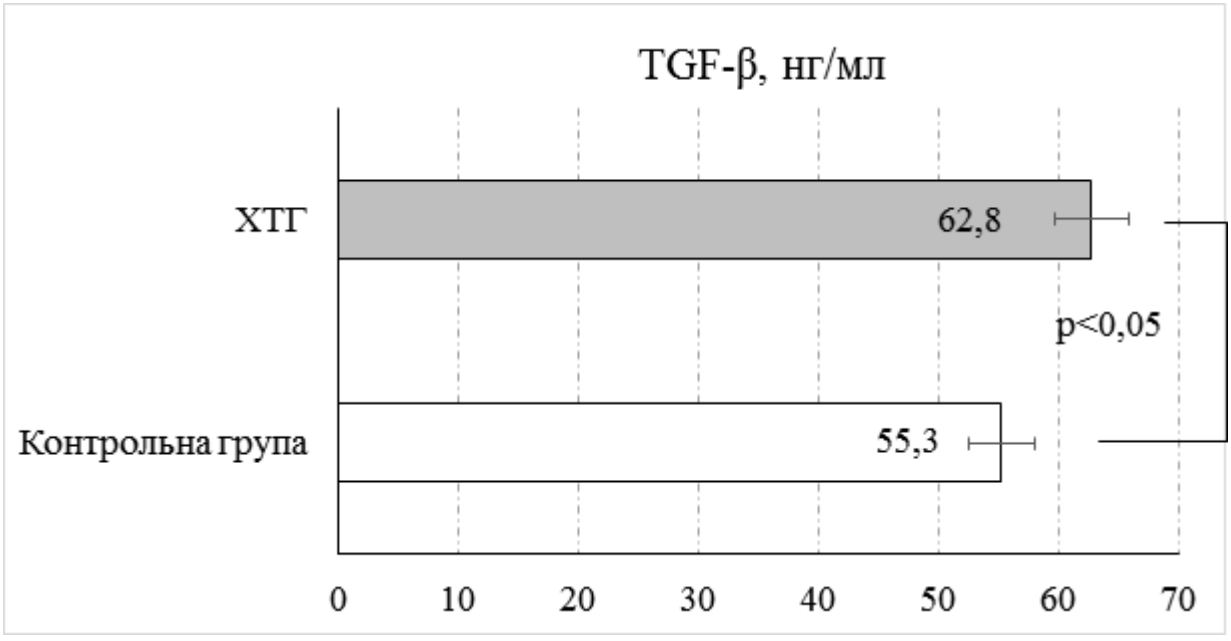

Рис. 3.4 Вплив хронічного токсичного гепатиту на рівень TGF-β в сироватці крові щурів (M±m, n=12).

Медикаментозна терапія хронічного токсичного гепатиту коригувала рівень TGF-β в сироватці крові, однак ефективність залежала від обраного лікування (рис. 3.5). Застосування лізиноприлу виявляло найбільшу здатність нормалізувати рівень вказаного цитокіну. У групі «ХТГ+лізиноприл» середній показник вмісту TGF-β в сироватці крові був на 54,1% меншим ($p<0,001$), порівняно з групою нелікованих тварин. За цих умов медіана рівня TGF-β у сироватці крові становила 30,6 (95% CI 12,4-42,9) нг/мл, а інтерквартильний інтервал знаходився у межах 19,7-38,7 нг/мл.

Використання L-аргініну L-глутамату значно поступалось лізиноприлу за впливом на TGF-β-опосередкований сигнальний шлях. У групі «ХТГ+ L-аргінін L-глутамат» середній показник вмісту TGF-β в сироватці крові був на 36,8% меншим ($p<0,001$), порівняно з групою нелікованих тварин. За цих умов медіана рівня TGF-β у сироватці крові становила 41,1 (95% CI 17,3-56,2) нг/мл, а інтерквартильний інтервал знаходився у межах 32,7-50,7 нг/мл.

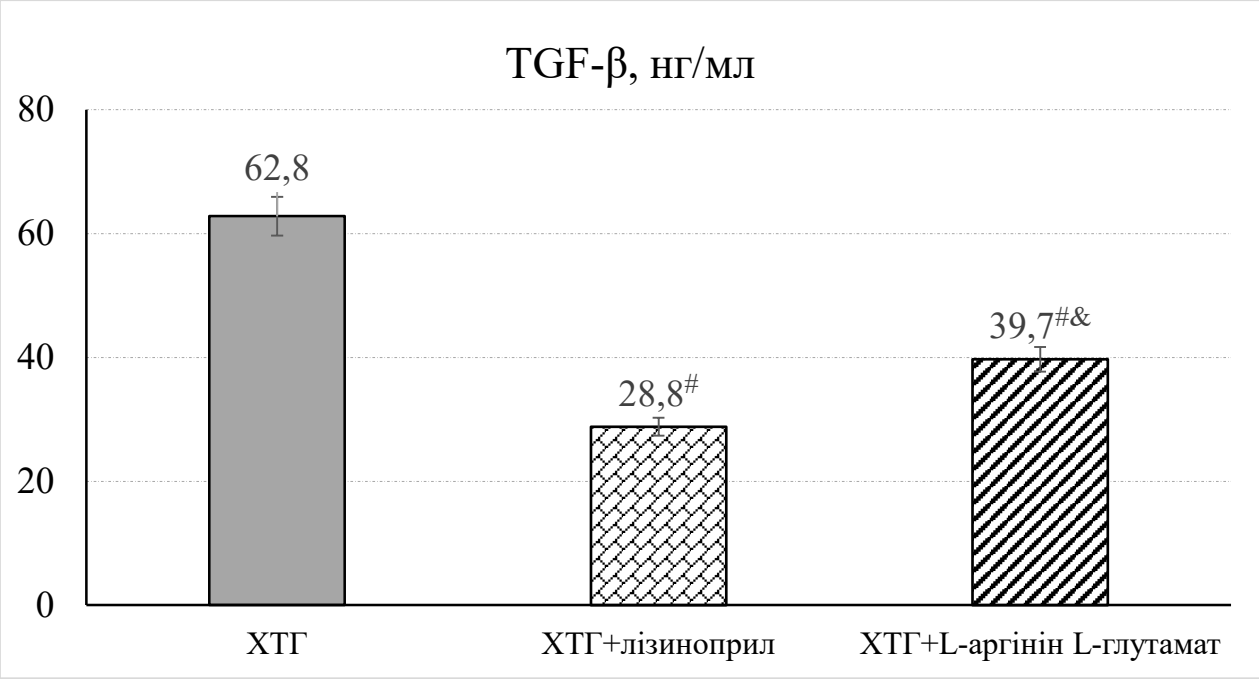

Рис. 3.5 Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на рівень TGF-β в сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12). Примітки: 1.$^{\#}$ - достовірність відмінностей відносно групи ХТГ ($p<0,001$); 2.$^{\&}$ - достовірність відмінностей між групами тварин, лікованих лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом ($p<0,01$).

Оцінка сироваткового вмісту цитокіну IGF-1 показало, що сигнальний шлях, опосередкований IGF-1, має причетність до механізмів токсичної дії тетрахлорметану та етанолу (рис. 3.6).

У ході персентильного аналізу виявилось, що в контрольній групі тварин для рівня IGF-1 в сироватці крові показник медіани дорівнював 344 (95% CI 284-372) нг/мл, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився у діапазоні 311-364 нг/мл.

Хронічний токсичний гепатит, індукований сумісним введенням тетрахлорметану та етанолу, супроводжувався статистично достовірним зростанням середнього показника сироваткового рівня IGF-1, порівняно з таким у контрольної групи тварин. За результатами персентильного аналізу з'ясувалось, що у групі тварин «ХТГ» рівень IGF-1 в сироватці крові змінювався від 337 до 430 нг/мл, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} відповідав діапазону 361-408 нг/мл.

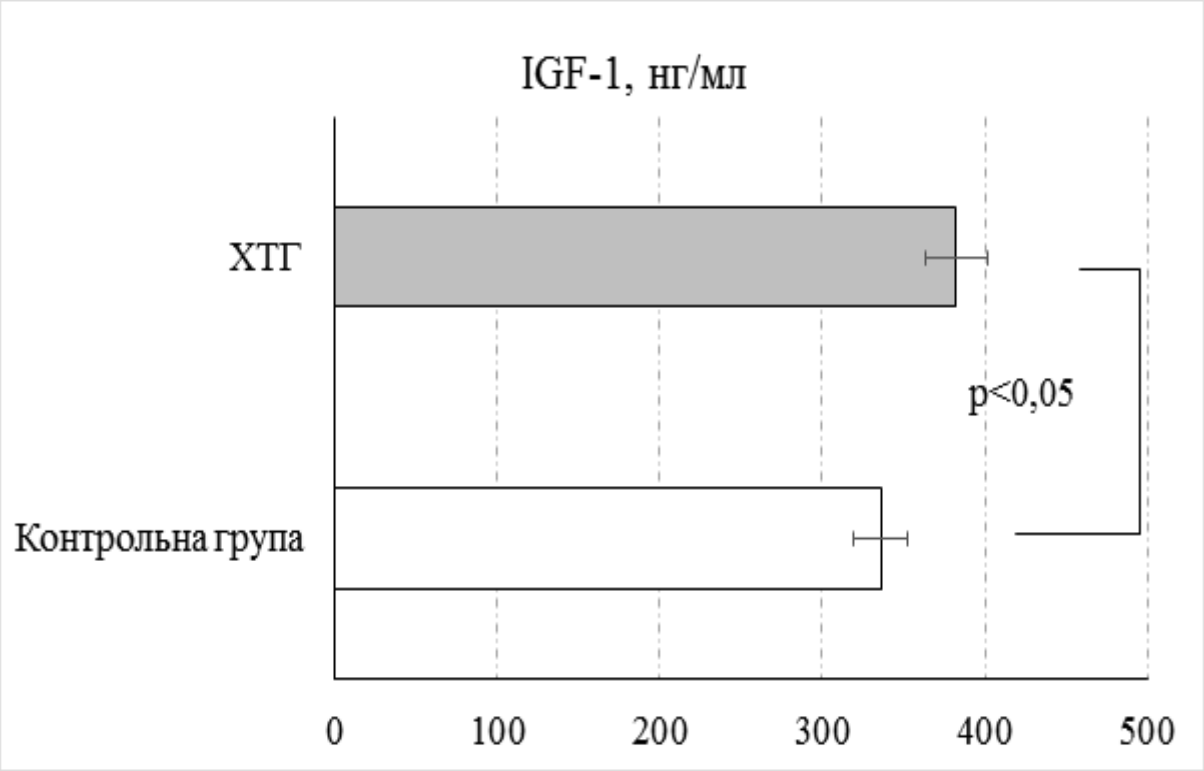

Рис. 3.6 Вплив хронічного токсичного гепатиту на рівень IGF-1 в сироватці крові щурів (M±m, n=12).

Вплив застосованої терапії на вміст IGF-1 в сироватці крові не залежав від обраного препарату (рис. 3.7). Використання лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на тлі хронічного токсичного гепатиту приблизно з однаковою ефективністю коригували рівень цитокіну в сироватці крові.

З'ясувалось, що в групі «ХТГ+лізиноприл» середній показник вмісту IGF-1 в сироватці крові був вірогідно меншим, порівняно з групою нелікованих тварин. За цих умов медіана рівня IGF-1 у сироватці крові становила 348 (95% CI 290-379) нг/мл, а інтерквартильний інтервал знаходився у межах 309-352 нг/мл.

Використання L-аргініну L-глутамату не поступалось лізиноприлу за впливом на IGF-1-опосередкований сигнальний шлях. В групі «ХТГ+ L-аргінін L-глутамат» середній показник рівня IGF-1 у сироватці крові вірогідно не відрізнявся від групи тварин, лікованих лізиноприлом, медіана становила 319 (95% CI 277-56,2) нг/мл, а інтерквартильний інтервал знаходився у межах 277-367 нг/мл.

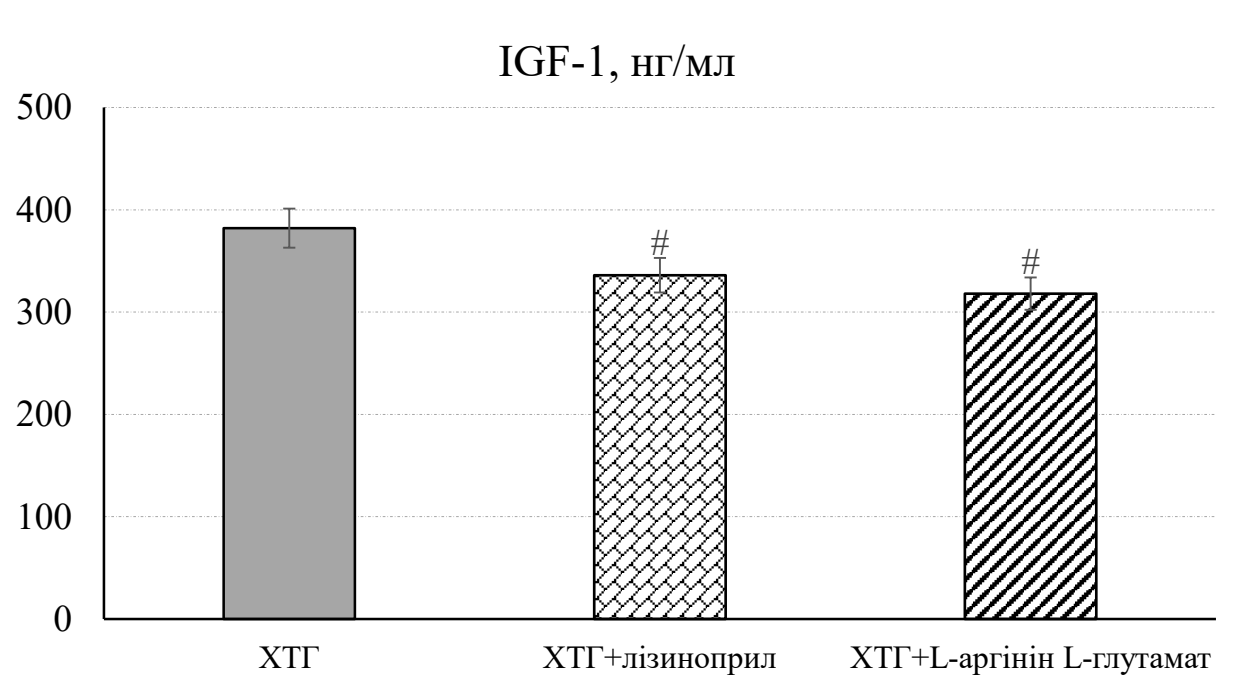

Рис. 3.7 Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на рівень IGF-1 в сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12). Примітка. # - достовірність відмінностей відносно групи ХТГ ($p<0,01$).

Кореляційний аналіз (табл. 3.5) показав, що за умов хронічного токсичного гепатиту найбільш тісні та достовірні асоціативні зв'язки існують між рівнем TGF-β в сироватці крові та вмістом вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Отримані дані засвідчують важливу роль TGF-β-опосередкованого сигнального шляху в механізмах індукції фіброгенезу в печінці й нирках за умов сумісного застосування токсикантів тетрахлорметану та етанолу. Поряд з цим сильний та достовірний кореляційний зв'язок між вказаними параметрами виявлявся у групі тварин з хронічним токсичним гепатитом, які отримували лікування лізиноприлом, що може свідчити про причетність сигнального шляху, опосередкованого цитокіном TGF-β, до механізмів антифіброгенної дії досліджуваного інгібітору АПФ.

Таблиця 3.5

Кореляційний зв'язок між рівнем TGF-β та вмістом фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту і на тлі лікування лізиноприлом

Показники	TGF-β, нг/мл	
	ХТГ	ХТГ + лізиноприл
ВГП сироватки крові, мкмоль/л	0,69*	0,70*
ПГП сироватки крові, мкмоль/л	0,66*	0,60*
ВГП печінки, мкг/г тканини	0,82*	0,78*
ВГП нирок, мкг/г тканини	0,78*	0,70*

Примітка. * – коефіцієнти кореляції $|r| \geq 0{,}55$ є достовірними ($p<0{,}05$).

У подальшому нами проведений кореляційний аналіз взаємозв'язків між рівнем IGF-1 та вмістом фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту і на тлі лікування лізиноприлом (табл. 3.6).

Виявилось, що за умов хронічного токсичного гепатиту зростання сироваткового вмісту IGF-1 найбільш тісно та вірогідно асоціюється зі збільшенням рівня вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Вказані дані підтверджують важливу роль сигнального шляху, асоційованого з IGF-1, у механізмах розвитку фіброзу печінки та нирок за використання тетрахлорметану та етанолу.

На основі проведеного кореляційного аналізу також встановлено, що зменшення вмісту IGF-1 в сироватці крові у групі тварин, лікованих лізиноприлом, тісно асоціюється зі зниженням рівня вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Отримані дані можуть засвідчувати роль IGF-1-сигнального шляху в механізмах антифіброгенної дії лізиноприлу.

Таблиця 3.6

Кореляційний зв'язок між рівнем IGF-1 та вмістом фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту і на тлі лікування лізиноприлом

Показники	IGF-1, нг/мл	
	ХТГ	ХТГ + лізиноприл
ВГП сироватки крові, мкмоль/л	0,55*	0,58*
ПГП сироватки крові, мкмоль/л	-0,19	0,49
ВГП печінки, мкг/г тканини	0,74*	0,66*
ВГП нирок, мкг/г тканини	0,62*	0,58*

Примітка. * – коефіцієнти кореляції $|r| \geq 0{,}55$ є достовірними ($p<0{,}05$).

Таким чином, проведені дослідження засвідчили, що введення тетрахлорметану та етанолу викликають порушення метаболізму колагену та розвиток фіброзу печінки й нирок. За цих умов важливу роль в механізмах ініціації фіброгенезу належить сигнальним шляхам, які опосередковуються через цитокіни TGF-β та IGF-1.

Використання інгібітору АПФ лізиноприлу за хронічного токсичного гепатиту виявляє потужний антифіброгенний потенціал в печінці та нирках, що асоціюється з його впливом на систему цитокінів TGF-β та IGF-1. В той же час, антифіброгенна дія референс-препарату L-аргініну L-глутамату значно поступається лізиноприлу.

Результати даного розділу опубліковано у працях [65, 73, 248].

РОЗДІЛ 4
ЗМІНИ ПОКАЗНИКІВ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ, ПЛОЇДНОСТІ ТА ФРАГМЕНТАЦІЇ ЯДЕРНОЇ ДНК В ПЕЧІНЦІ Й НИРКАХ ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

У попередньому розділі нами розширені уявлення щодо молекулярних механізмів пошкодження та регенерації тканин печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту, індукованого введенням тетрахлорметану та етанолу, а також на тлі корекції лізиноприлом та препаратом порівняння L-аргініном L-глутаматом. Зокрема, було показано, що за хронічного токсичного гепатиту активуються сигнальні системи, асоційовані з TGF-β та IGF-1, які причетні до ремоделювання сполучної тканини та розвитку фіброзу в печінці та нирках щурів. Застосована терапія, особливо використання інгібітору АПФ лізиноприлу, виявляє потужну антифіброгенну дію, яка асоційована з їх депримуючим впливом на рівень цитокінів TGF-β та IGF-1. Однак, залишаються невивченими зміни клітинного циклу, ядерної ДНК в органах щурів, їх зв’язок з TGF-β і IGF-1 за хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом, що і стало метою дослідження цього розділу.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні завдання:

1. Оцінити показники клітинного циклу в печінці й нирках щурів та їх зв’язок з рівнем TGF-β й IGF-1 в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (препарат порівняння).
2. Визначити плоїдність й фрагментацію ядерної ДНК в печінці й нирках щурів та їх зв’язок з рівнем TGF-β й IGF-1 в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (препарат порівняння).

4.1 Дослідження фаз клітинного циклу, плоїдності й фрагментації ядерної ДНК в печінці щурів, їх зв'язку з рівнем TGF-β й IGF-1 в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом

Дослідження плоїдності ДНК в ядрах клітин печінки показало, що за умов хронічного токсичного гепатиту реєструється порушення розподілу клітин з диплоїдним та поліплоїдним набором хромосом (рис. 4.1).

У контрольній групі тварин переважає частка ядер клітин з диплоїдним набором: частка клітин з набором хромосом 2c коливається в межах 69,0-82,8% (P_5-P_{95}), медіана становить 77,7%. У той же час, частка ядер клітин з набором хромосом 4c перебуває в межах 12,3-25,3%, медіана дорівнює 17,2%. Найменша кількість ядер клітин містять число хромосом 8c та більше: показник медіани становить 5,91%. Такий розподіл клітин з різним набором хромосом є закономірним явищем, адже саме клітини з диплоїдним набором хромосом забезпечують виконання фізіологічних функцій, активно вступають в клітинний цикл і мають високу здатність до регенерації.

Хронічний токсичний гепатит, індукований тетрахлорметаном та етанолом, викликає перерозподіл клітин з різним набором хромосом: вірогідно зменшується частка ядер клітин з диплоїдним набором на 12,3% ($p<0,001$) та зростає частка ядер з наборами хромосом 4c, ≥8c відповідно на 21,7 та 51,6% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою тварин. Персентильний аналіз показав, що в групі тварин «ХТГ» частка ядер клітин з набором хромосом 2c коливається від 63,5 до 74,0% (медіана становить 66,8%), частка ядер з набором хромосом 4c – 17,6-24,6% (медіана – 23,0%), а частка ядер з набором хромосом 8c і більше – 5,44-11,8% (медіана – 8,84%). За цих умов зменшення числа ядер клітин з диплоїдним набором хромосом є наслідком цитотоксичної дії тетрахлорметану та етанолу, тоді як зростання числа ядер клітин з поліплоїдним набором хромосом ймовірно є компенсаторним процесом у

відповідь на пошкодження і забезпечує до певної міри регенерацію ушкодженого органу.

Проведений кореляційний аналіз показав, що у групі тварин з ХТГ зменшення частки ядер клітин з диплоїдним набором достовірно корелюють зі збільшенням рівнів TGF-β й IGF-1 в сироватці крові (r=-(0,62-0,68), p<0,05). Поряд з цим зростання числа ядер клітин з набором хромосом 4c вірогідно та прямо корелюють з сироватковим рівнем досліджуваних цитокінів (r=0,56-0,59), p<0,05). Отримані дані засвідчують причетність сигнальних шляхів, асоційованих з TGF-β й IGF-1, до розвитку поліплоїдії у клітинах печінки щурів за хронічного токсичного гепатиту.

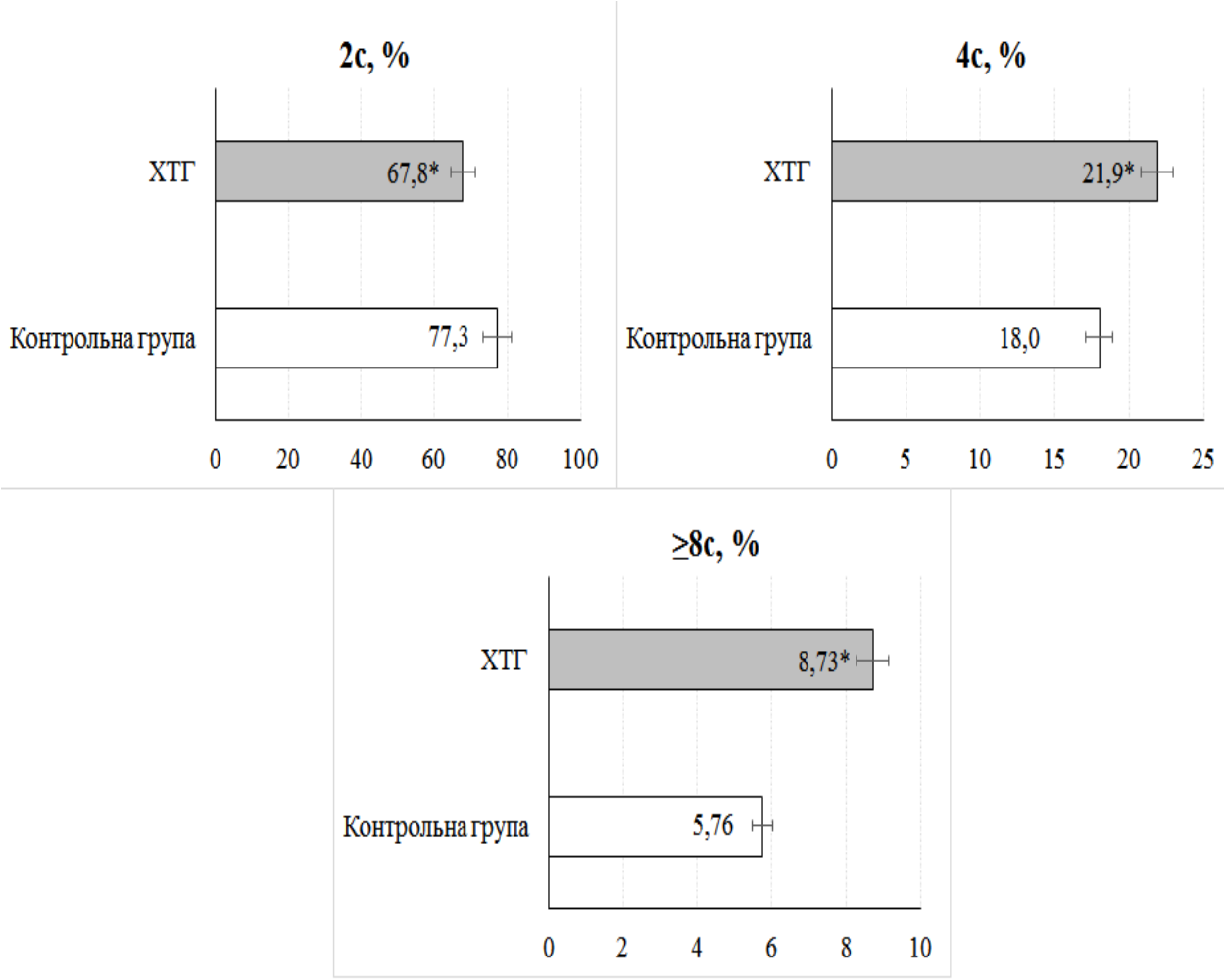

Рис. 4.1 Вплив хронічного токсичного гепатиту на показники плоїдності набору ДНК в ядрах клітин печінки (M±m, n=12). Примітка. * - достовірність відмінностей відносно контрольної групи (p<0,05).

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту викликала зменшення ступеня поліплоїдії, однак ефективність залежала від обраного препарату (табл. 4.1).

Введення лізиноприлу мало найбільшу ефективність щодо зменшення ступеня поліплоїдії. У групі тварин «ХТГ + лізиноприл» частка ядер клітин з диплоїдним набором хромосом було на 18,0% більшим ($p<0,001$), ніж у нелікованих щурів; медіана становила 80,7 (95% CI 72,8-85,6)%. Поряд з цим частки ядер клітин з наборами хромосом 4c та ≥8c були відповідно на 37 та 29,1% меншими ($p<0,01$), порівняно з нелікованими тваринами; медіани дорівнювали відповідно 13,2 (95% CI 11,0-17,3) та 6,72 (95% CI 2,54-8,85)%. У тварин, лікованих лізиноприлом частки клітин з наборами хромосом 2c та ≥8c вірогідно не відрізнялись від показників контрольної групи тварин

На основі проведеного кореляційного аналізу з'ясовано, що зменшення сироваткового рівня TGF-β й IGF-1 достовірно корелюють зі зростанням числа диплоїдних клітин в печінці ($r=-(0,57-0,60)$, $p<0,05$) та зменшенням частки поліплоїдних клітин ($r=0,56-0,57$, $p<0,05$), що засвідчує про роль вказаних сигнальних шляхів у механізмах цитопротекторної дії лізиноприлу.

Застосування референс-препарату L-аргініну L-глутамату поступалось лізиноприлу за ефективністю зменшувати ступінь поліплоїдії на тлі хронічного токсичного гепатиту. У групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» частка ядер клітин з диплоїдним набором хромосом було на 11,2% більшим ($p<0,01$), ніж у нелікованих щурів; медіана становила 75,3 (95% CI 69,4-80,7)%. У той же час частка ядер клітин з наборами хромосом 4c та ≥8c були відповідно на 19,6 та 19,8% меншими ($p<0,01$), порівняно з нелікованими тваринами; медіани дорівнювали відповідно 18,0 (95% CI 13,8-20,6) та 7,00 (95% CI 4,07-10,7)%. У тварин, лікованих L-аргініном L-глутаматом частка клітин з набором хромосом 2c була достовірно меншою, а частки клітин з наборами хромосом 4c та ≥8c були вірогідно меншими, порівняно з такими у групі щурів, які отримували лізиноприл, а також вірогідно не відрізнялись від показників контрольної групи тварин

Таблиця 4.1

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на показники плоїдності набору ДНК в ядрах клітин печінки у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	Набір ДНК, % клітин		
		2c, %	4c, %	≥8c, %
1	Контрольна група	77,3±1,43	18,0±1,41	5,76±0,36
2	ХТГ	67,8±1,05*	21,9±0,73*	8,73±0,32*
3	ХТГ + лізиноприл	80,0±1,33$^{\#}$	13,8±0,69$^{\#*}$	6,19±0,31$^{\#}$
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	75,4±1,09$^{\#\&}$	17,6±0,72$^{\#\&}$	7,00±0,35$^{\#\&}$

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,05$);
2. $^{\#}$ - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$);
3. $^{\&}$ - достовірність відмінностей між групами 3 та 4 ($p<0,05$).

Введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликало порушення показників клітинного циклу (табл. 4.2, рис. 4.2-4.4). Так, в групі контролю переважала відносна кількість клітин у фазі спокою G0G1 (медіана становить 77,8 (95% CI 73,7-80,2)%), менша кількість клітин була у фазі G2M (медіана становить 19,5 (95% CI 17,2-24,3)%) і найменша частка клітин - у синтетичній фазі S (медіана становить 2,25 (95% CI 1,49-3,32)%).

Хронічний токсичний гепатит супроводжувався вірогідним зменшенням на 8,5% ($p<0,01$) відносної кількості клітин у фазі G0G1 порівняно з контролем (показник медіани дорівнює 70,7 (95% CI 66,4-75,5)%), що ймовірно є наслідком альтерації високоспеціалізованих гепатоцитів на тлі дії токсикантів та мобілізації резервів з фази G0 для забезпечення регенерації. Поряд з цим реєструвалось статистично достовірне зростання на 72,2% ($p<0,01$) відносного числа клітин у фазі S (показник медіани дорівнює 3,67 (95% CI 1,92-6,03)%) та на 27,1% ($p<0,01$) частки клітин у фазі G2M (показник

медіани дорівнює 25,8 (95% CI 21,9-30,0)%), що є свідченням більш активної поліплоїдизації та проліферації клітин печінки.

Застосовані лікарські препарати з різною ефективністю коригували індуковані хронічним токсичним гепатитом зміни показників клітинного циклу. Найвищу ефективність показав лізиноприл, а препарат порівняння L-аргінін L-глутамат значно поступався йому. Так, в групі тварин «ХТГ + лізиноприл» реєструвалось вірогідне зростання частки клітин у фазі G0G1 на 17,3% ($p<0,01$) та достовірне зменшення частки клітин у фазах S та G2M відповідно на 40,7 та 43,7% ($p<0,01$), порівняно з показниками у нелікованих тварин. У той же час у групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» відмічалось вірогідне зростання частки клітин у фазі G0G1 на 6,63% ($p<0,01$) та достовірне зменшення частки клітин у фазах S та G2M відповідно на 34,3 та 15,8% ($p<0,01$), порівняно з показниками у нелікованих тварин. Поряд з цим у тварин, лікованих L-аргініном L-глутаматом показник відносної кількості клітин у фазі G0G1 був вірогідно меншим, а у фазах S та G2M – достовірно більшим, порівняно з такими показниками у тварин, які отримували лізиноприл.

Таблиця 4.2

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на показники клітинного циклу в печінці щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	Показники клітинного циклу, %		
		G0G1	S	G2M
1	Контрольна група	77,4±0,69	2,30±0,20	20,4±0,75
2	ХТГ	70,9±0,99*	3,96±0,44*	25,9±0,82*
3	ХТГ + лізиноприл	83,1±0,84$^{\#}$	2,35±0,10$^{\#*}$	14,6±0,77$^{\#*}$
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	75,6±0,71$^{\#\&}$	2,60±0,18$^{\#}$	21,8±0,79$^{\#\&}$

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,01$);
2. $^{\#}$ - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$);
3. $^{\&}$ - достовірність відмінностей між групами 3 та 4 ($p<0,05$).

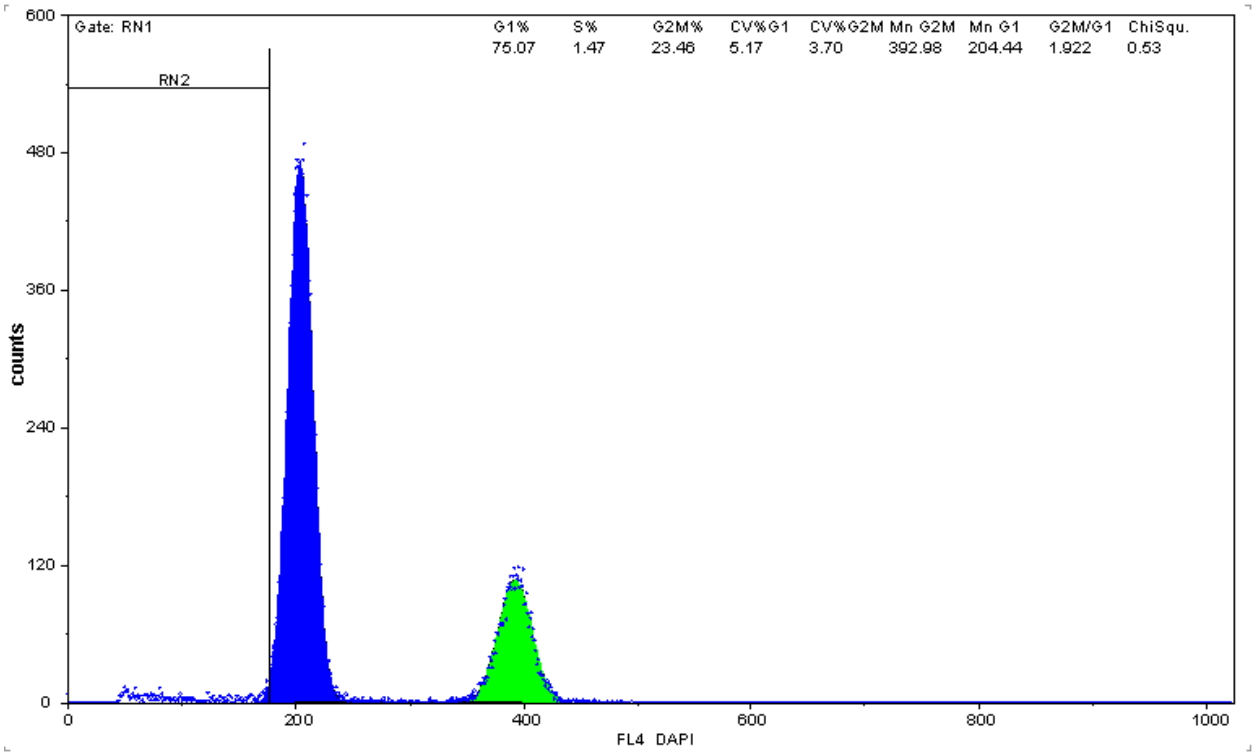

Рис. 4.2 Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК (інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка) та фази клітинного циклу ядер клітин печінки статевонезрілого щура з ХТГ.

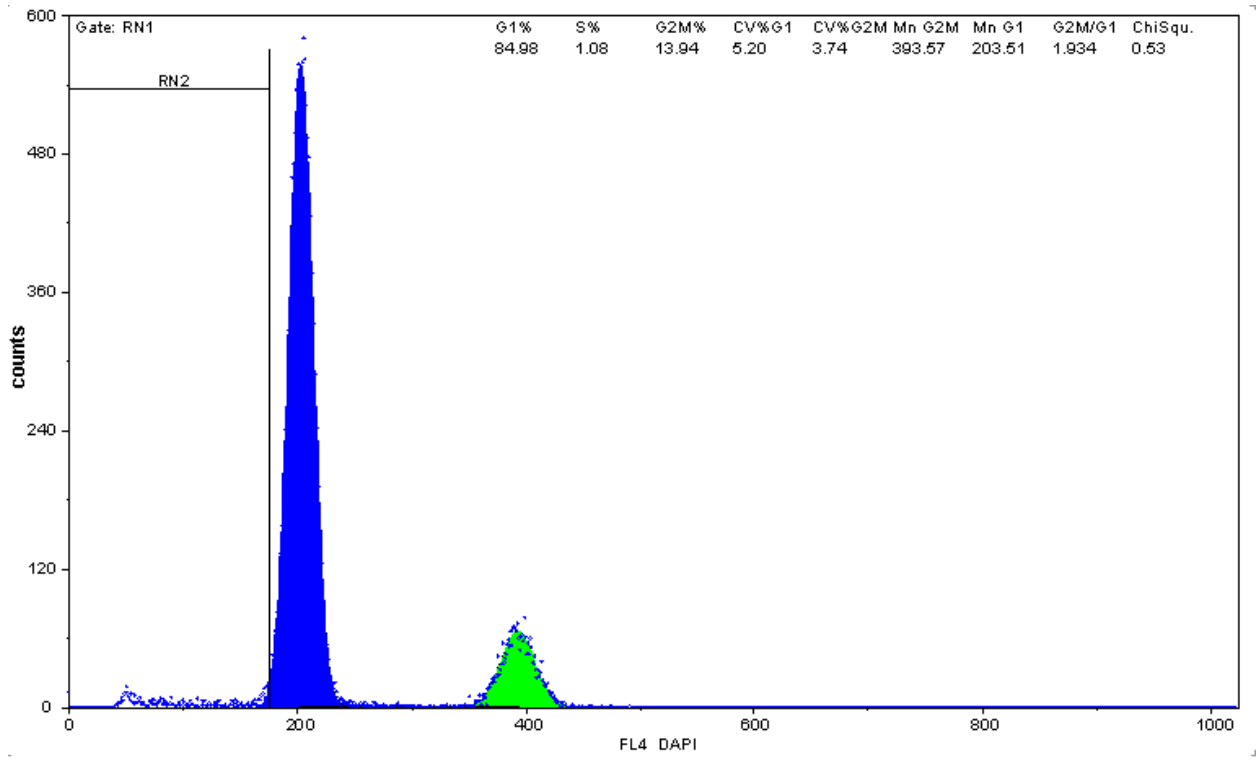

Рис. 4.3 Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК (інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка) та фази клітинного циклу ядер клітин печінки статевонезрілого щура з ХТГ на тлі лікування лізиноприлом.

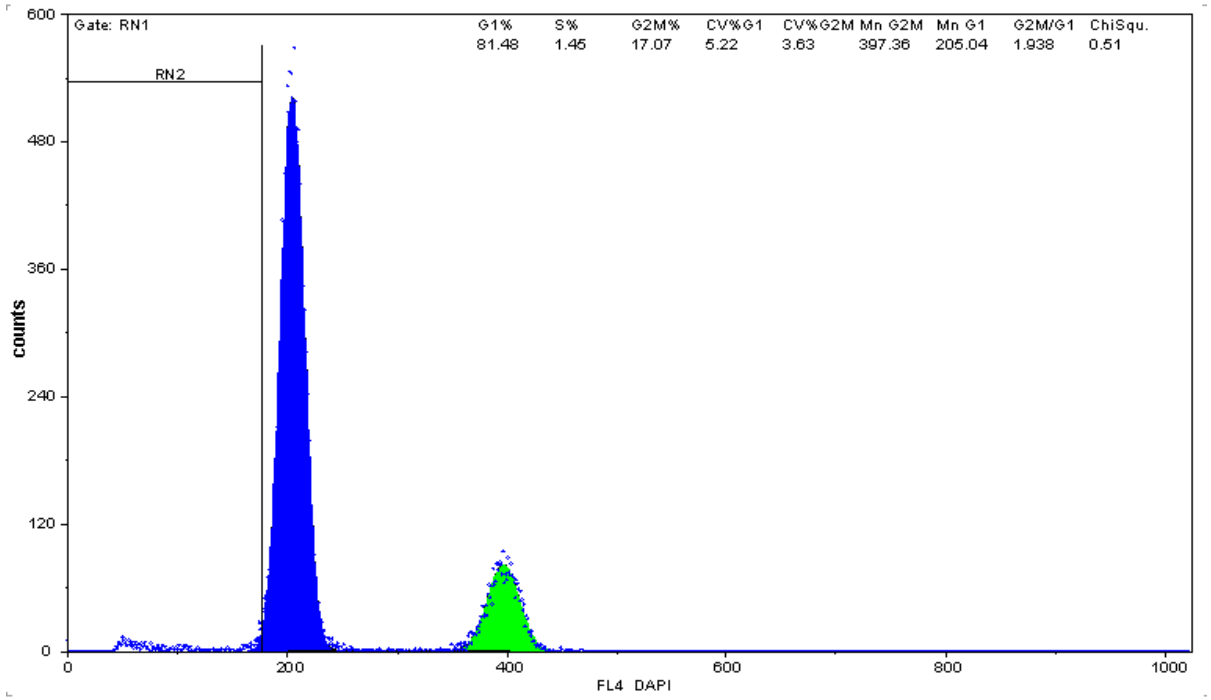

Рис. 4.4 Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК (інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка) та фази клітинного циклу ядер клітин печінки статевонезрілого щура з ХТГ на тлі лікування L-аргініном L-глутаматом.

З’ясувалось, що введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликали посилення проліферації клітин печінки, про що доказово свідчили зміни показника індексу проліферації (рис. 4.5).

У контрольній групі щурів на основі персентильного аналізу було встановлено, що медіана індексу проліферації становила 22,3 (95% CI 19,6-26,8)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 21,1-24,2%.

Моделювання хронічного токсичного гепатиту супроводжувалось індукцією проліферації клітин печінки: індекс проліферації був вірогідно більшим на 31,3% ($p<0,001$), відносно середнього показника контрольної групи. За цих умов медіана індексу проліферації становила 30,3 (95% CI 23,8-33,8)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 28,6-32,0%. Кореляційний аналіз засвідчив, що важливу роль в посиленні проліферації клітин печінки відіграють TGF-β та IGF-1 (між індексом проліферації та

рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - r=0,60-0,68, p<0,05)

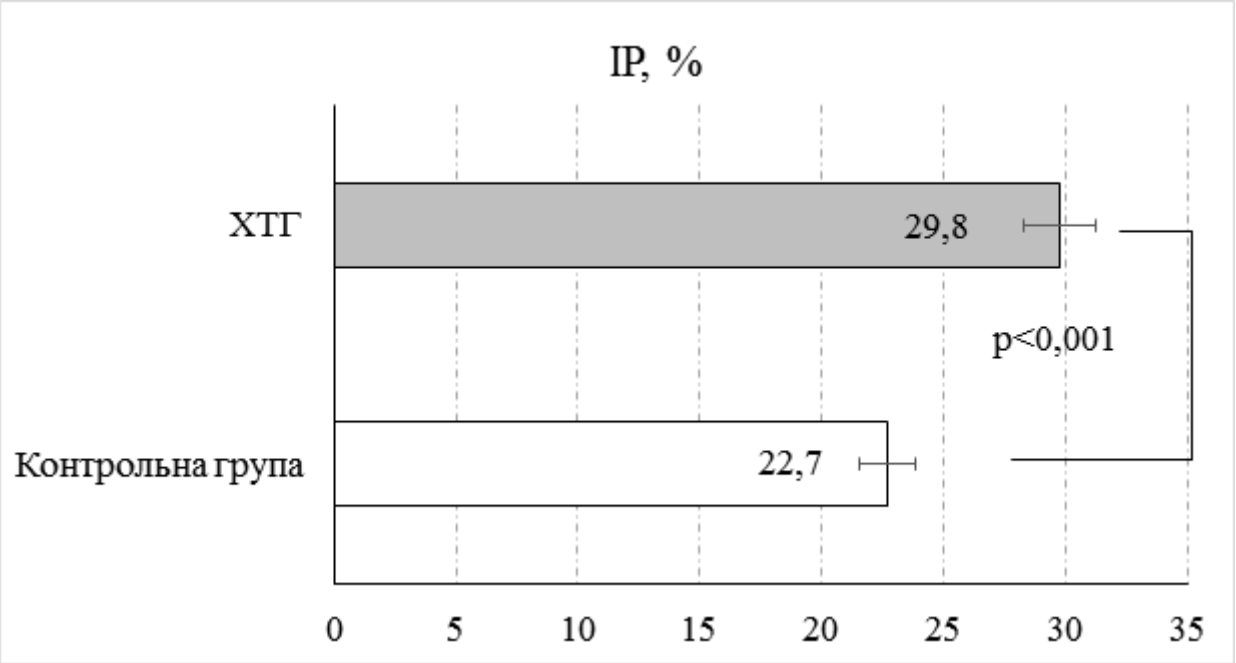

Рис. 4.5 Вплив хронічного токсичного гепатиту на індекс проліферації клітин печінки (M±m, n=12). Примітка. * - достовірність відмінностей відносно контрольної групи (p<0,05).

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту викликала зменшення інтенсивності проліферації, однак ефективність залежала від обраного препарату (табл. 4.3). Найбільший антипроліферативний потенціал виявляв лізиноприл, тоді як L-аргінін L-глутамат значно поступався йому за вказаним ефектом.

У групі «ХТГ + лізиноприл» індекс проліферації був на 25,6% меншим (p<0,001), ніж у нелікованих тварин; медіана становила 16,3 (95% CI 13,3-21,0)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 14,8-19,7%. Антипроліферативна дія лізиноприлу асоціювалась з впливом на сигнальні системи цитокінів TGF-β та IGF-1, про що доказово свідчать результати кореляційного аналізу (між рівнем цитокінів та індексом проліферації виникають достовірні кореляції - r=0,57-0,67, p<0,05).

У групі «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» індекс проліферації був на 18,1% меншим (p<0,001), ніж у нелікованих тварин; медіана становила 24,2 (95% CI 20,9-28,6)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 22,6-26,2%. За цих умов індекс проліферації був вірогідно більшим, ніж у тварин, лікованих лізиноприлом, але достовірно не відрізнявся від контролю.

Таблиця 4.3

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на індекс проліферації клітин печінки у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	IP, %
1	Контрольна група	22,7±0,71
2	ХТГ	29,8±0,96*
3	ХТГ + лізиноприл	16,9±0,84#
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	24,4±0,78#&

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,001).
3. & - достовірність відмінностей між групами 3 та 4 (p<0,05).

Хронічний токсичний гепатит супроводжувався індукцією апоптозу гепатоцитів, доказом чого була зміна показника відносної кількості клітин з фрагментованою ДНК в фазі SUB-G0G1 (рис. 4.2; 4.6). За результатами персентильного аналізу у тварин контрольної групи медіана показника відносної кількості клітин з фрагментованою ДНК в фазі SUB-G0G1 становила 3,06 (95% CI 2,21-3,92)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 2,60-3,41%.

У тварин з моделлю хронічного токсичного гепатиту реєструвалось посилення апоптозу: частка клітин в фазі SUB-G0G1 була вірогідно більшою на 76,4% (p<0,001), відносно середнього показника контрольної групи. За цих

умов медіана показника відносної кількості клітин з фрагментованою ДНК становила 5,46 (95% CI 4,15-6,12)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 5,22-5,79%. Кореляційний аналіз надав докази причетності цитокінів TGF-β та IGF-1 в індукції апоптозу гепатоцитів (між часткою клітин з фрагментованою ДНК та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - r=0,72-0,78, p<0,01)

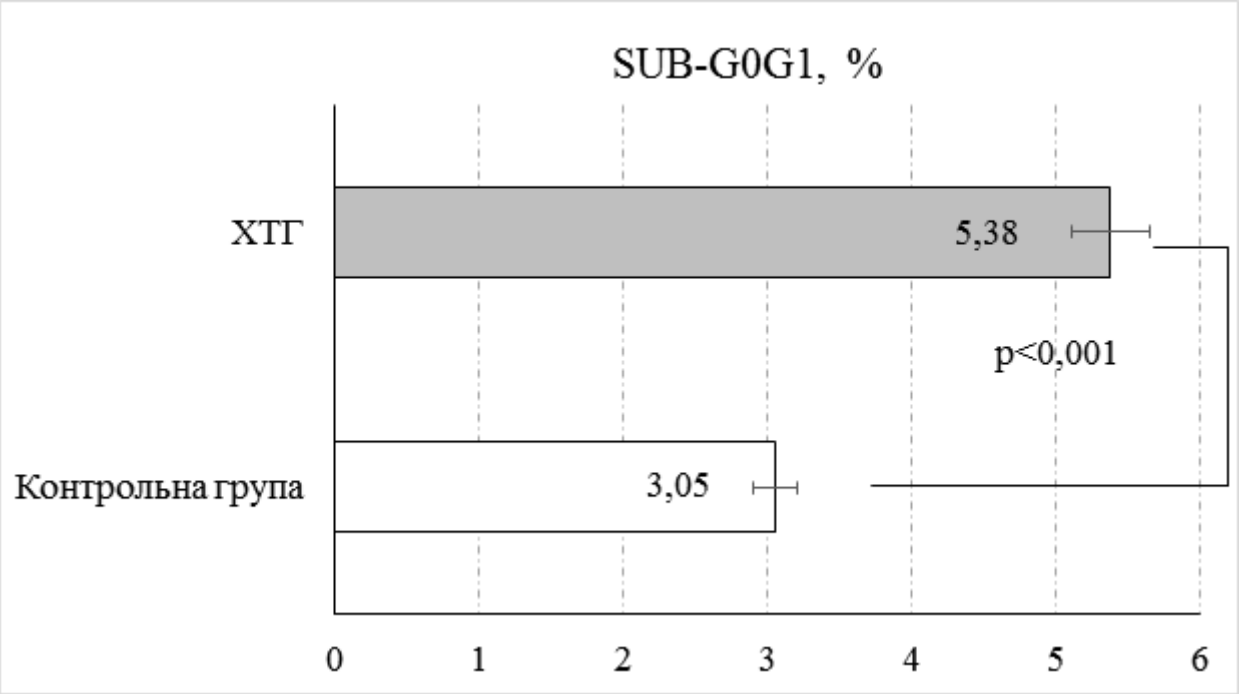

Рис. 4.6 Вплив хронічного токсичного гепатиту на показник апоптозу клітин печінки (M±m, n=12). Примітка. * - достовірність відмінностей відносно контрольної групи (p<0,05).

Застосована терапія мала різний вплив на активність апоптозу гепатоцитів за хронічного токсичного гепатиту, що залежало від обраного препарату (табл. 4.4, рис. 4.3-4.4). Використання лізиноприлу виявляло потужну антиапоптотичну дію: середній показник частки клітин у фазі SUB-G0G1 був вірогідно меншим на 33,1% (p<0,001), порівняно з нелікованими тваринами; показник медіани становив 3,53 (95% CI 3,37-3,86)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 3,49-3,72%. Антиапоптотична дія лізиноприлу асоціюється з впливом на системи

цитокінів TGF-β та IGF-1 (між часткою клітин з фрагментованою ДНК та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - r=0,70-0,73, p<0,01).

Застосування L-аргініну L-глутамату не впливало на активність апоптозу гепатоцитів: середній показник частки клітин з фрагментованою ДНК вірогідно не відрізнявся від такого у нелікованих тварин та був вірогідно вищим по відношенню до контрольної групи; показник медіани становив 5,41 (95% CI 4,38-6,48)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 4,98-6,11%.

Таблиця 4.4

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на показник апоптозу клітин печінки у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	SUB-G0G1, %
1	Контрольна група	3,05±0,17
2	ХТГ	5,38±0,19*
3	ХТГ + лізиноприл	3,60±0,05$^{\#}$
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	5,46±0,22*

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 (p<0,001);
2. $^{\#}$ - достовірність відмінностей відносно групи 2 (p<0,001).
3. $^{\&}$ - достовірність відмінностей між групами 3 та 4 (p<0,05).

Проведені дослідження засвідчили, що хронічний токсичний гепатит супроводжується збільшенням плоїдності ДНК ядер клітин печінки, індукцією апоптозу гепатоцитів та збільшенням проліферативної активності клітин печінки, що асоціюється з активацією сигнальних шляхів, залежних від TGF-β та IGF-1. Застосування лізиноприлу за хронічного токсичного гепатиту виявляє потужну антиапоптотичну, антипроліферативну дії та зменшує ступінь поліплоїдії, що супряжено зі зниженням сироваткових

рівнів TGF-β та IGF-1. Референс-препарат L-аргінін L-глутамат співставляється з лізиноприлом за антипроліферативною дією та здатністю зменшувати ступінь поліплоїдії, проте вірогідно не впливає на апоптоз клітин печінки.

4.2 Дослідження фаз клітинного циклу й фрагментації ядерної ДНК в кірковій речовині нирок щурів, їх зв'язку з рівнем TGF-β й IGF-1 в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом

Хронічний токсичний гепатит супроводжувався значними змінами показників клітинного циклу в кірковій речовині нирок щурів (табл. 4.5, рис. 4.7-4.9). В контрольній групі переважала відносна кількість клітин у фазі спокою G0G1 (медіана становить 84,5 (95% CI 83,4-85,5)%), менша кількість клітин була у фазі G2M (медіана - 12,1 (95% CI 11,3-12,9)%) і найменша частка клітин перебувала у синтетичній фазі S (медіана - 2,87 (95% CI 2,27-3,41)%).

Таблиця 4.5

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на показники клітинного циклу в кірковій речовині нирок щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	Показники клітинного циклу, %		
		G0G1	S	G2M
1	Контрольна група	84,4±0,22	2,88±0,12	12,1±0,17
2	ХТГ	93,0±0,13*	1,27±0,07*	5,76±0,14*
3	ХТГ + лізиноприл	84,1±0,54$^{\#}$	1,62±0,09$^{\#*}$	14,3±0,45$^{\#*}$
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	83,0±0,62$^{\#*}$	1,48±0,09$^{\#*}$	15,5±0,62$^{\#*}$

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,01$);
2. $^{\#}$ - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,01$);

За умов введення тетрахлорметану та етанолу відмічалось достовірне зростання на 10,2% (p<0,01) відносної кількості клітин у фазі G0G1 порівняно з контролем (показник медіани дорівнює 84,5 (95% CI 83,4-85,5)%). Поряд з цим реєструвалось статистично достовірне зниження на 55,9% (p<0,01) відносного числа клітин у фазі S (показник медіани дорівнює 2,87 (95% CI 2,27-3,41)%) та на 52,4% (p<0,01) частки клітин у фазі G2M (показник медіани дорівнює 12,1 (95% CI 11,3-12,9)%), що є свідченням зниження активності проліферації клітин нирок.

Застосовані лікарські препарати приблизно з однаковою ефективністю коригували індуковані хронічним токсичним гепатитом зміни показників клітинного циклу в кірковій речовині нирок. У тварин, лікованих лізиноприлом, реєструвалось вірогідне зменшення частки клітин у фазі G0G1 на 9,6% (p<0,01) та достовірне збільшення частки клітин у фазах S (на 27,6%, p<0,01) та G2M (в 2,5 рази, p<0,01), порівняно з показниками у нелікованих тварин. У групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» відмічалось вірогідне зниження частки клітин у фазі G0G1 на 10,8% (p<0,01) та достовірне збільшення частки клітин у фазах S (на 16,5%, p<0,01) та G2M (в 2,7 рази, p<0,01), порівняно з показниками у нелікованих тварин.

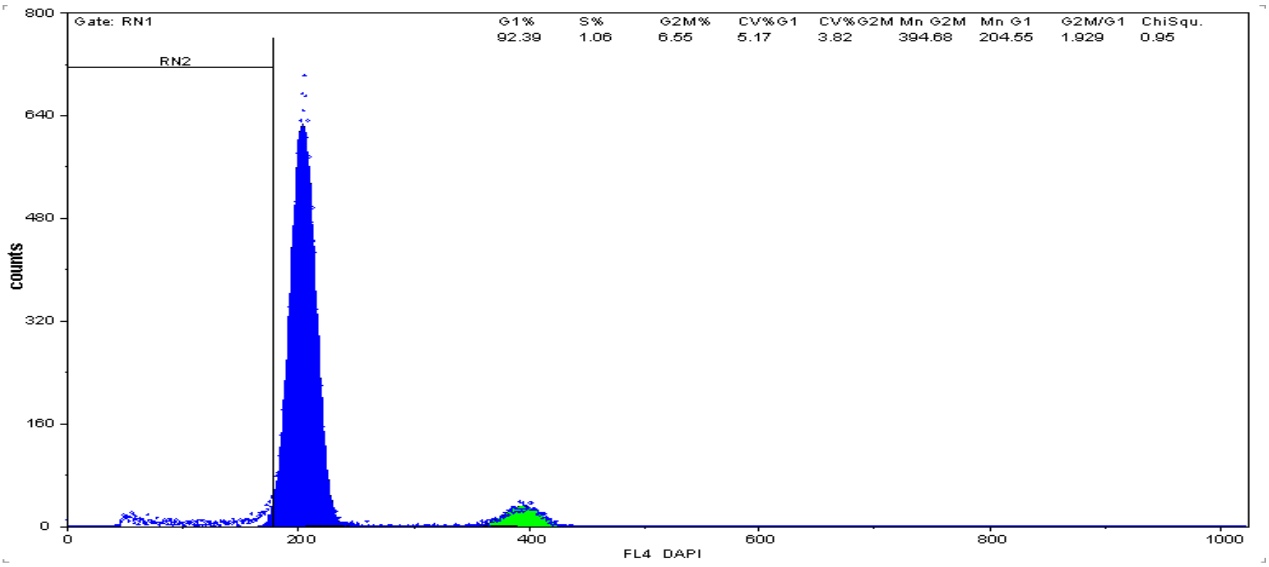

Рис. 4.7 Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК (інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка) та фази клітинного циклу ядер клітин кіркової речовини нирок статевонезрілого щура з ХТГ.

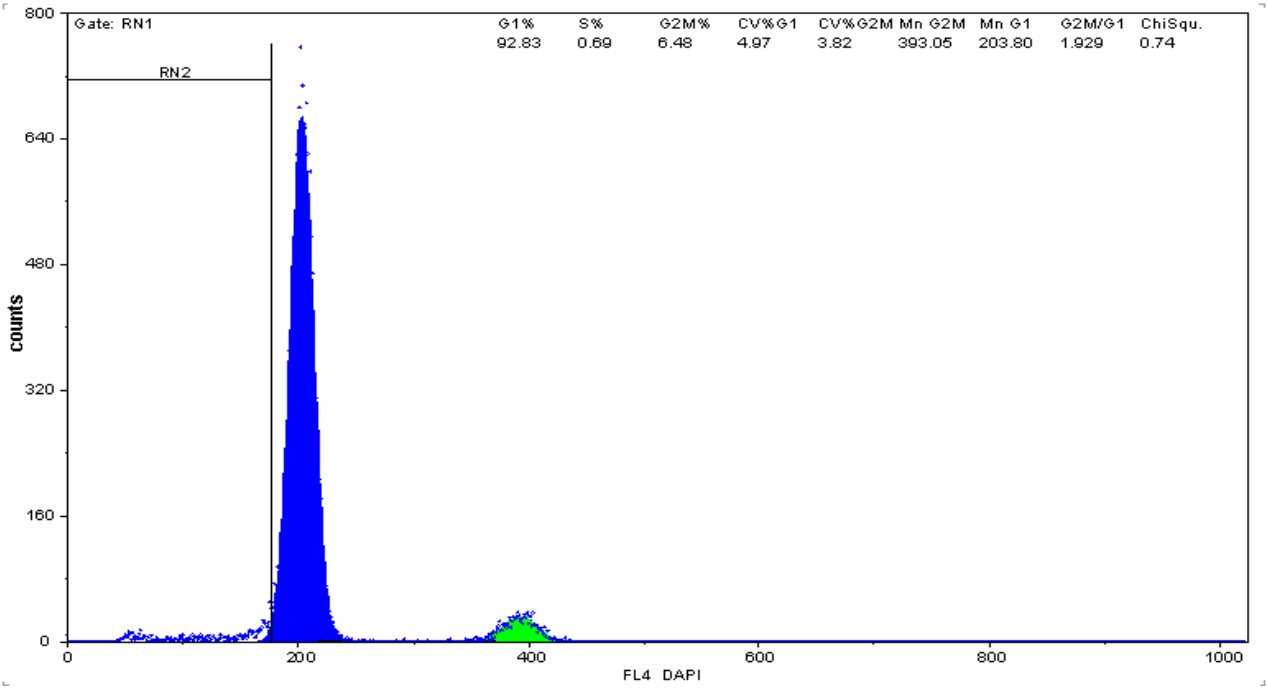

Рис. 4.8 Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК (інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка) та фази клітинного циклу ядер клітин кіркової речовини нирок статевонезрілого щура з ХТГ на тлі введення лізиноприлу.

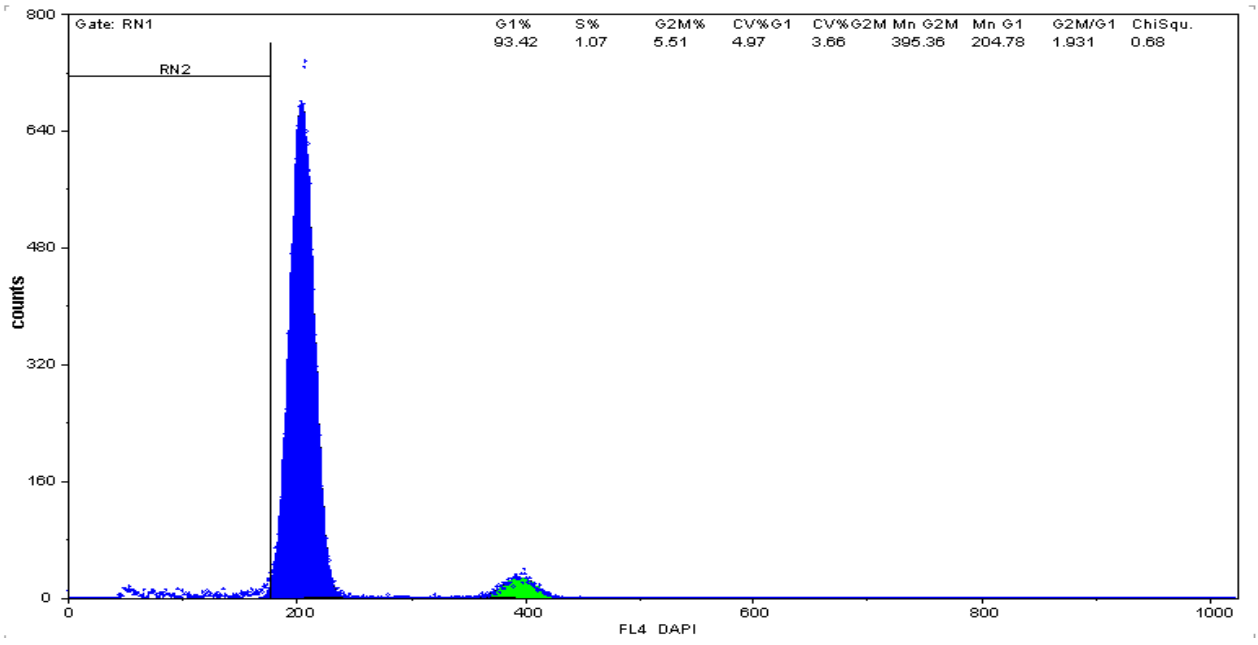

Рис. 4.9 Приклад гістограми на якій представлені фрагментація ядерної ДНК (інтервал RN1 – субдиплоїдна ділянка) та фази клітинного циклу ядер клітин кіркової речовини нирок статевонезрілого щура з ХТГ на тлі введення L-аргініну L-глутамату.

Показано, що на тлі хронічного токсичного гепатиту відмічалось пригнічення проліферації клітин кіркової речовини нирок, доказом чого були зміни показника індексу проліферації (рис. 4.10). У контрольній групі щурів на основі персентильного аналізу було встановлено, що медіана індексу проліферації в клітинах нирок становила 15,0 (95% CI 13,9-15,9)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 14,7-15,5%.

За хронічного токсичного гепатиту реєструвалось пригнічення проліферації клітин кіркової речовини нирок: індекс проліферації був вірогідно меншим на 53,1% ($p<0,001$), відносно показника контрольної групи. У групі тварин «ХТГ» медіана індексу проліферації становила 6,97 (95% CI 5,82-7,97)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 6,50-7,79%. За результатами кореляційного аналізу показано, що пригнічення процесів проліферації клітин нирок асоціюється зі збільшенням сироваткового рівня TGF-β та IGF-1 (між індексом проліферації та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні обернені кореляції - r=-(0,56-0,59), $p<0,05$).

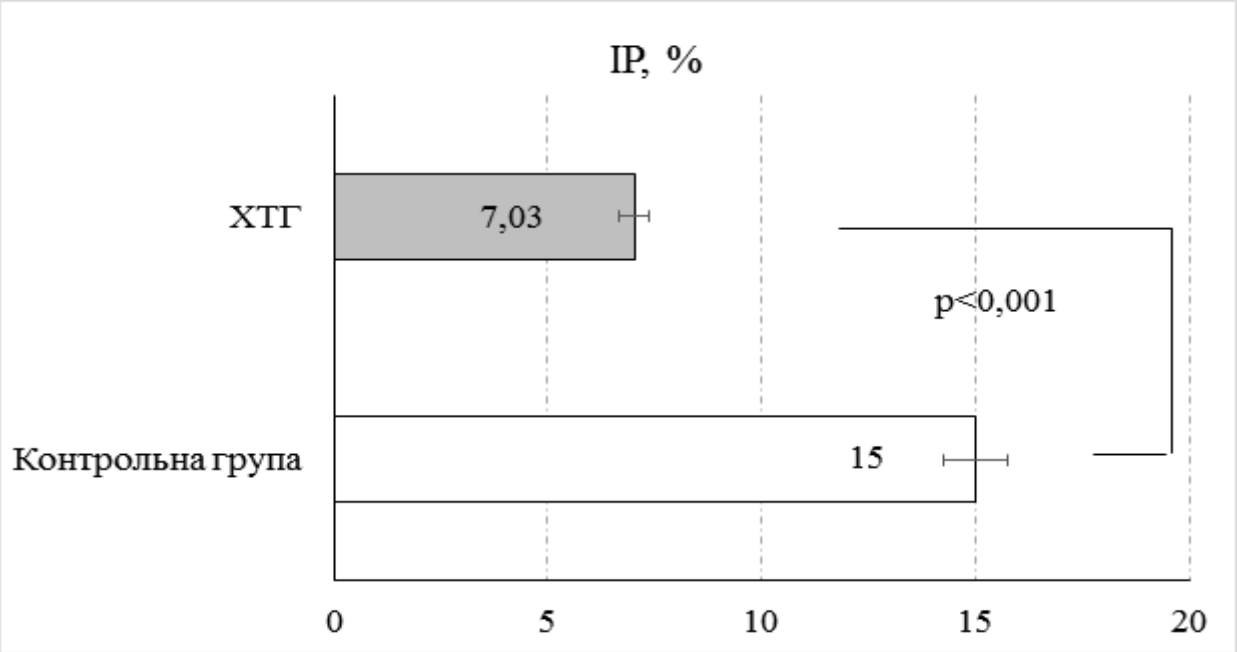

Рис. 4.10 Вплив хронічного токсичного гепатиту на індекс проліферації клітин кіркової речовини нирок (M±m, n=12). Примітка. * - достовірність відмінностей відносно контрольної групи ($p<0,05$).

Застосована терапія хронічного токсичного гепатиту приблизно в однаковій мірі збільшувала інтенсивність проліферації (табл. 4.6). У тварин, яким вводили лізиноприл, індекс проліферації був у 2,26 рази більшим ($p<0,001$), ніж у нелікованих тварин; медіана становила 15,8 (95% CI 13,8-18,6)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 14,5-17,0%. Здатність лізиноприлу посилювати проліферацію клітин кіркової речовини нирок тісно супряжено з впливом на сигнальні системи цитокінів TGF-β та IGF-1, про що доказово свідчать результати кореляційного аналізу (між рівнем цитокінів та індексом проліферації виникають достовірні обернені кореляції - $r=-(0,55-0,60)$, $p<0,05$).

Застосування L-аргініну L-глутамату для лікування хронічного токсичного гепатиту асоціювалось зі зростанням індексу проліферації у 2,42 рази ($p<0,001$), порівняно з нелікованими тваринами; медіана індексу проліферації клітин нирок становила 17,7 (95% CI 13,4-20,1)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 14,8-19,0%. За цих умов індекс проліферації вірогідно не відрізнявся від такого у тварин, лікованих лізиноприлом.

Таблиця 4.6

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на індекс проліферації клітин кіркової речовини нирок у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	IP, %
1	Контрольна група	15,0±0,19
2	ХТГ	7,03±0,23*
3	ХТГ + лізиноприл	15,9±0,51#
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	17,0±0,73#

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,001$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,001$).

Введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликало індукцію апоптозу клітин кіркової речовини нирок, про що свідчить зміна показника відносної кількості клітин з фрагментованою ДНК в фазі SUB-G0G1 (рис. 4.7; 4.11). Персентильний аналіз виявив, що у тварин контрольної групи медіана показника відносної кількості клітин з фрагментованою ДНК в фазі SUB-G0G1 становила 5,30 (95% CI 3,73-7,01)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 4,39-6,02%.

Моделювання хронічного токсичного гепатиту супроводжувалось індукцією апоптозу клітин кіркової речовини нирок: частка клітин в фазі SUB-G0G1 була вірогідно більшою на 36,5% ($p<0,001$), відносно середнього показника контрольної групи. За цих умов медіана показника відносної кількості клітин кіркової речовини нирок з фрагментованою ДНК становила 7,21 (95% CI 6,02-8,58)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 6,68-7,83%. За даними кореляційного аналізу індукція апоптозу під впливом токсикантів тісно супряжено з TGF-β та IGF-1 (між часткою клітин з фрагментованою ДНК та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - $r=0,70-0,72$, $p<0,01$)

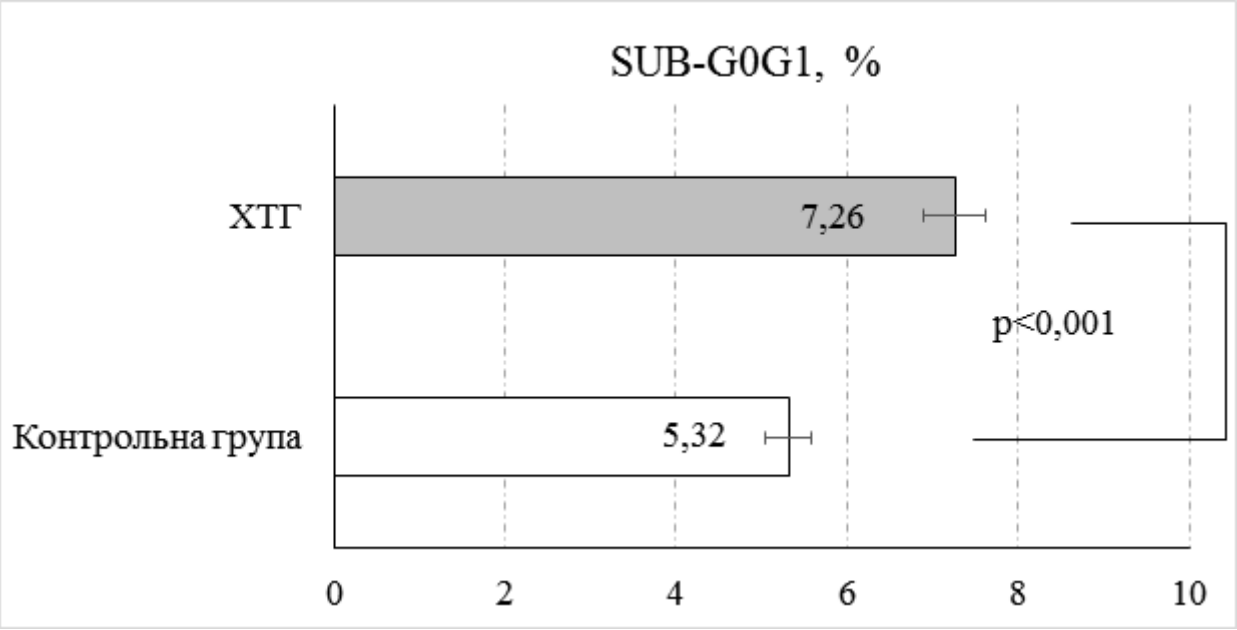

Рис. 4.11 Вплив хронічного токсичного гепатиту на показник апоптозу клітин кіркової речовини нирок (M±m, n=12). Примітка. * - достовірність відмінностей відносно контрольної групи ($p<0,05$).

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту мала різний вплив на активність апоптозу клітин кіркової речовини нирок, що залежало від обраного препарату (табл. 4.7, рис. 4.8-4.9). Застосування лізиноприлу виявляло потужну антиапоптотичну дію щодо клітин нирок: середня величина частки клітин у фазі SUB-G0G1 була вірогідно меншою на 14,5% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами; показник медіани становив 5,80 (95% CI 4,04-8,75)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 4,73-7,73%. За цих умов антиапоптотична дія лізиноприлу супряжена з впливом на системи цитокінів TGF-β та IGF-1 (між часткою клітин нирок з фрагментованою ДНК та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - $r=0,61-0,67$, $p<0,01$).

Застосування L-аргініну L-глутамату не впливало на активність апоптозу клітин кіркової речовини нирок: середній показник частки клітин з фрагментованою ДНК вірогідно не відрізнявся від такого у нелікованих тварин та був вірогідно вищим по відношенню до контрольної групи; показник медіани становив 6,85 (95% CI 5,46-7,58)%, а інтерквартильний інтервал P_{25}-P_{75} знаходився в межах 5,85-7,35%.

Таблиця 4.7

Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на показник апоптозу клітин кіркової речовини нирок у щурів за хронічного токсичного гепатиту (M±m, n=12)

№ групи	Дослідні групи щурів	SUB-G0G1, %
1	Контрольна група	5,32±0,34
2	ХТГ	7,26±0,25*
3	ХТГ + лізиноприл	6,21±0,53#
4	ХТГ + L-аргінін L-глутамат	6,66±0,24*

Примітки:

1. * - достовірність відмінностей відносно групи 1 ($p<0,001$);
2. # - достовірність відмінностей відносно групи 2 ($p<0,05$).

Результати досліджень показали, що хронічний токсичний гепатит викликає посилення апоптозу та зменшення проліферативної активності клітин кіркової речовини нирок, що супряжено з активацією сигнальних шляхів за участі TGF-β та IGF-1. Застосування лізиноприлу за хронічного токсичного гепатиту виявляє потужну антиапоптотичну дію та стимулює проліферацію клітин кіркової речовини нирок, що асоціюється зі зниженням сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1. Препарат порівняння L-аргінін L-глутамат співставляється з лізиноприлом за здатністю стимулювати проліферацію клітин нирок, однак вірогідно не впливає на процеси апоптозу.

Результати даного розділу опубліковано у працях [62, 241].

РОЗДІЛ 5
МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ТКАНИН ПЕЧІНКИ ТА НИРОК ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ХРОНІЧНОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ

5.1 Структурні зміни тканин печінки у щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції

Гістологічні дослідження печінки щурів з експериментально індукованим хронічним токсичним гепатитом встановили наявність виражених змін її структурної організації. Відмічали порушення часточкової будови органу та балкового впорядкування гепатоцитів. Більшість з них були дискомплексованими, що особливо чітко спостерігалось в периферичних відділах. Центральні вени характеризувались ознаками їх нерівномірного кровонаповнення. Стінки їх були потовщеними, набряклими. В окремих полях зору візуалізувались явища десквамації ендотеліального шару від базальної мембрани, а також сладжі еритроцитів. Просвіти синусоїдних капілярів були звуженими, внаслідок набряку сполучнотканинних елементів, переважно колагенових волокон, просторів Діссе.

Гепатоцити за даних умов були поліморфними, цитоплазма їх просвітлена, набрякла. Необхідно відмітити, що клітини печінки мали прояви вакуольної дистрофії, що, ймовірно, є свідченням розвитку їх жирової інфільтрації. Спостерігали наявність поодиноких вогнищ фокальних некрозів. Ядра гепатоцитів були гіперхромними, містили переважно 2 ядерця, в них переважав гетерохроматин, що розміщувався примембранно. Подекуди відмічали гепатоцити, які характеризувались наявністю декількох ядер. Дане явище може свідчити на користь запуску компенсаторно-пристосувальних реакцій в тканині печінки дослідних тварин у відповідь на пошкодження, а

також про підвищену синтетичну активність клітин органу та готовності до відновлення (рис. 5.1).

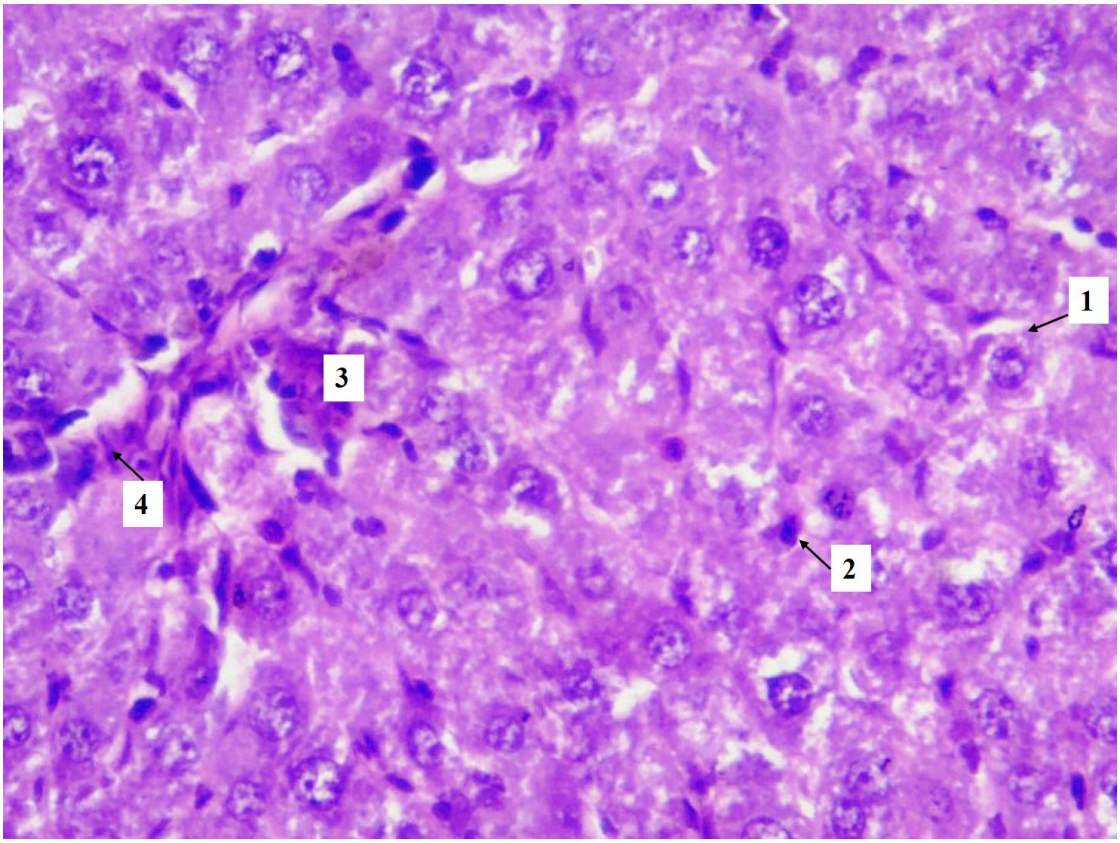

Рис. 5.1. Мікроскопічні зміни тканини печінки щура за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту. Дистрофія гепатоцитів (1), фокальний некроз (2), гістіо-лейкоцитарна інфільтрація (3), перипортальний фіброз (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

В окремих полях зору спостерігали прояви каріолізису, каріопікнозу та, так звані, апоптотичні тільця Каунсільмена. Часто виявляли ознаки значного розвитку елементів сполучної тканини переважно в ділянках перисинусоїдних просторів. На гістологічних зразках тканини печінки також зустрічали скупчення алкогольного гіаліну в оточенні лейкоцитів, що носять назву тілець Малорі. Перипортальні відділи були розширеними, в них виявляли ознаки вираженого фіброзу, гістіо-лейкоцитарної інфільтрації (рис. 5.2, 5.3, 5.4, 5.5).

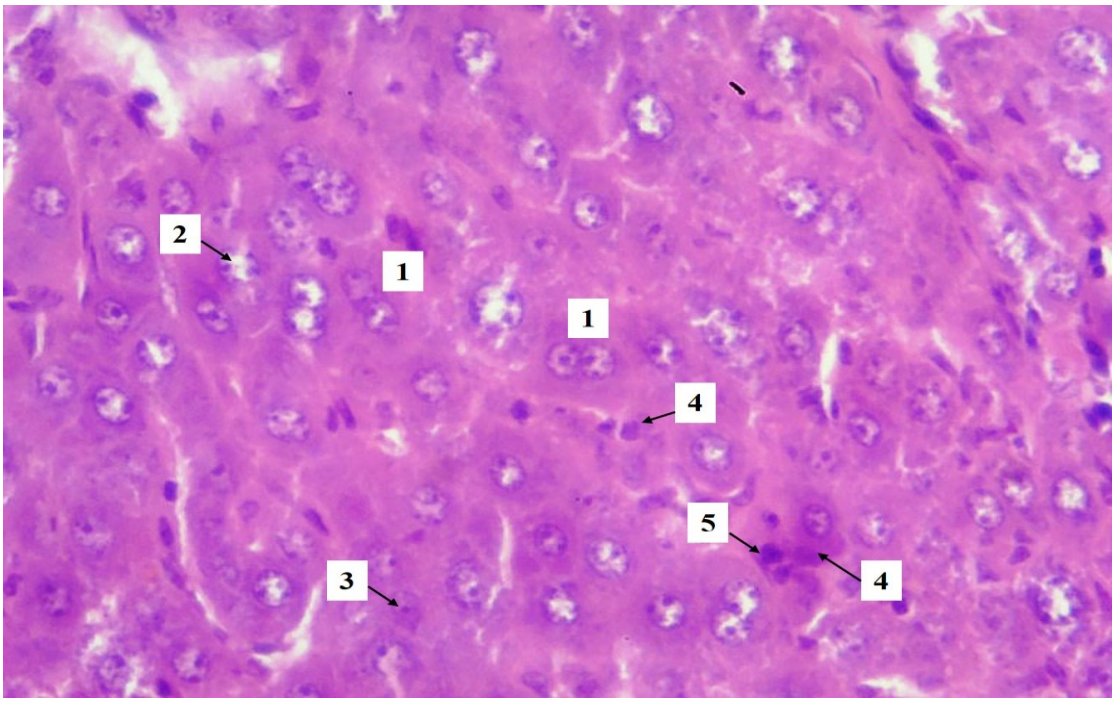

Рис. 5.2 Гістологічні зміни структури печінки щура при хронічному токсичному гепатиті. Двоядерні гепатоцити (1), каріолізис (2), каріопікноз (3), тільця Малорі (4), тільця Каунсільмена (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 200.

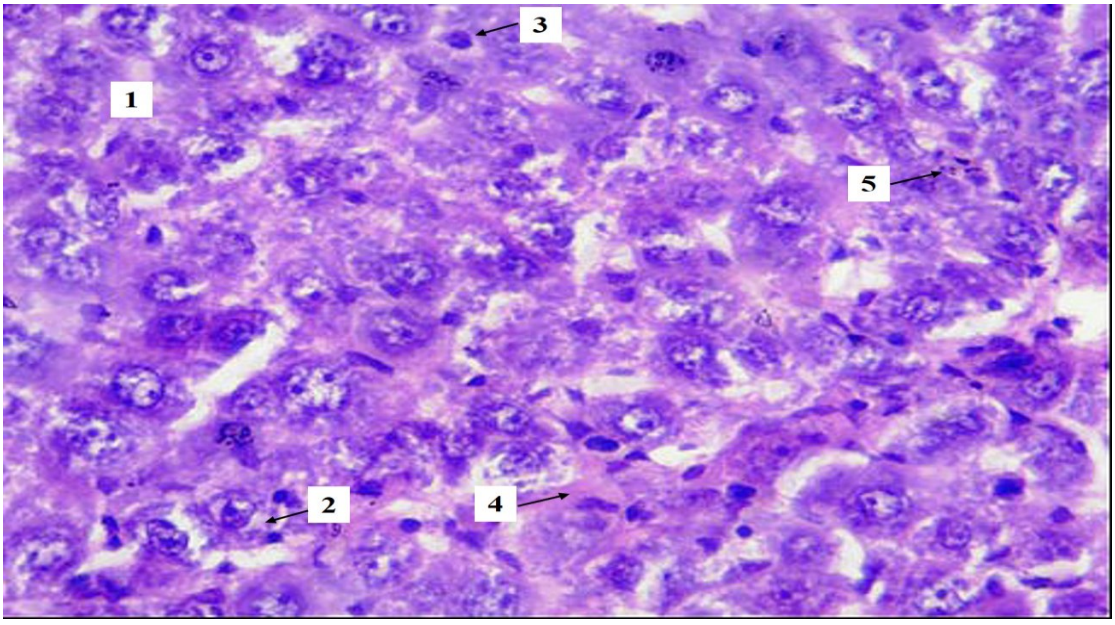

Рис. 5.3 Мікроскопічна організація тканини печінки щура за умов змодельованого хронічного токсичного гепатиту. Дискомплексація гепатоцитів (1), дистрофія гепатоцитів (2), фокальний некроз (3), розростання елементів сполучної тканини в перисинусоїдних просторах (4), тільце Малорі (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

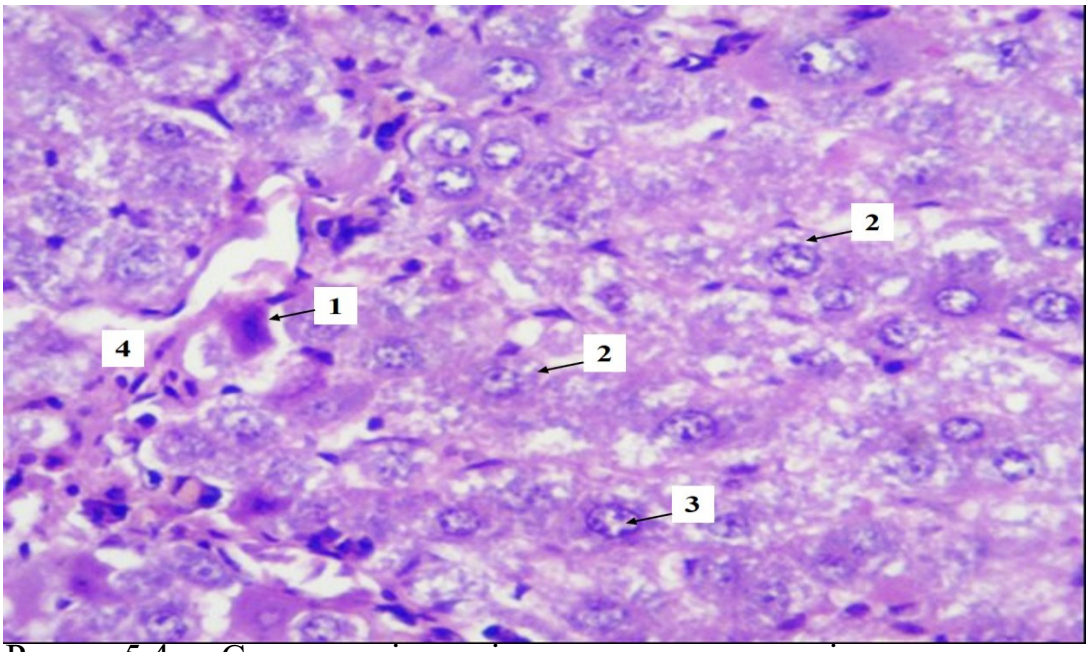

Рис. 5.4 Структурні зміни тканини печінки щура при експериментальному хронічному токсичному гепатиті. Тільце Каунсільмена (1), вакуольна дистрофія гепатоцитів (2), каріолізис (3), гістіо-лейкоцитарна інфільтрація (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

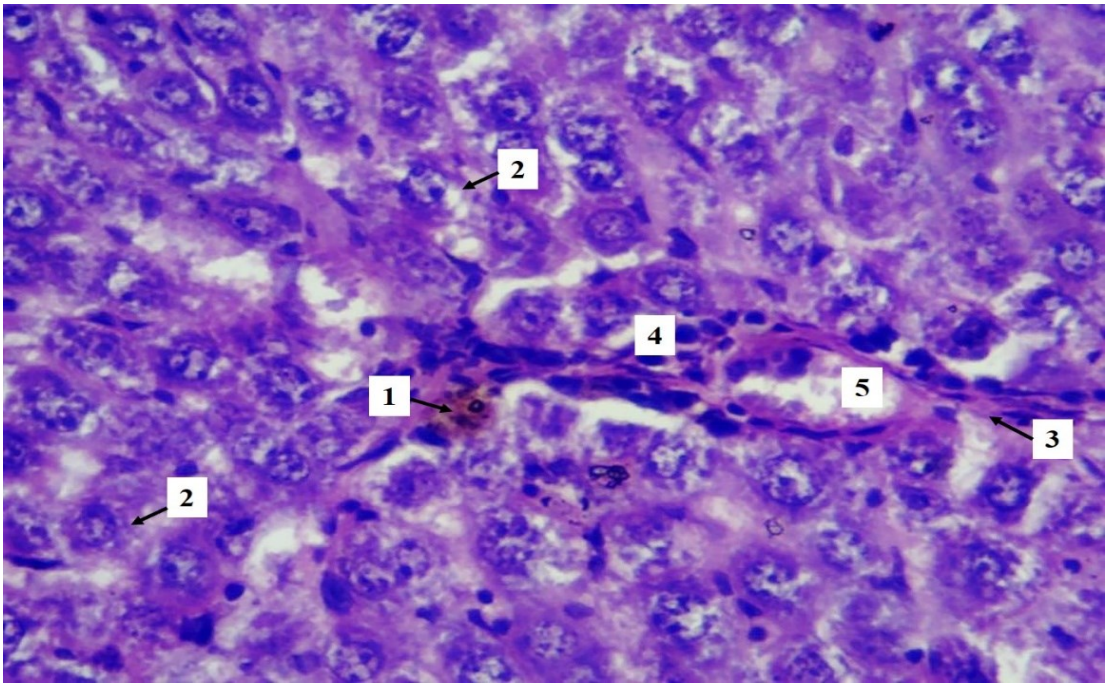

Рис. 5.5 Структурні зміни тканини печінки щура за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту. Тільце Малорі (1), дистрофія гепатоцитів (2), перипортальний фіброз (3), гістіо-лейкоцитарна інфільтрація (4), сладжі еритроцитів (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

При корекції хронічного гепатиту лізиноприлом у печінці експериментальних щурів характерним було відновлення радіального впорядкування печінкових пластинок. Часточки органу мали близьку до полігональної форму. Цитоплазма гепатоцитів була гомогенною, відмічали зменшення проявів їх вакуольної дистрофії. Ядра більшості клітин печінки характеризувались ознаками гіпертрофії, інтенсивно фарбувались гістогогічними барвниками. Вони були гіперхромними, з переважанням гетерохроматину, що локалізувався біля каріолеми. У порівнянні з тваринами, яким не проводили медикаментозну корекцію, в даній групі щурів значно зростала кількість двоядерних клітин. Крім того, гепатоцити мали високий ядерно-цитоплазматичний індекс, що свідчить про значний потенціал їх до регенерації. Спостерігали також явища активації макрофагальної системи печінки у вигляді зростання чисельності клітин Купфера, що розміщувались в просвітах синусоїдів, а їх відростки досягали просторів Діссе. У перипортальних зонах все ще зберігались ознаки гістіо-лейкоцитарної інфільтрації та фіброзу. Виявляли поодинокі тільця Каунсільмена та Малорі. Просвіти центральних вени були не розширені. Структура їх ендотеліального шару не порушена. В окремих полях зору зустрічаються ознаки повнокрів'я центральних вен (рис. 5.6, 5.7, 5.8, 5.9).

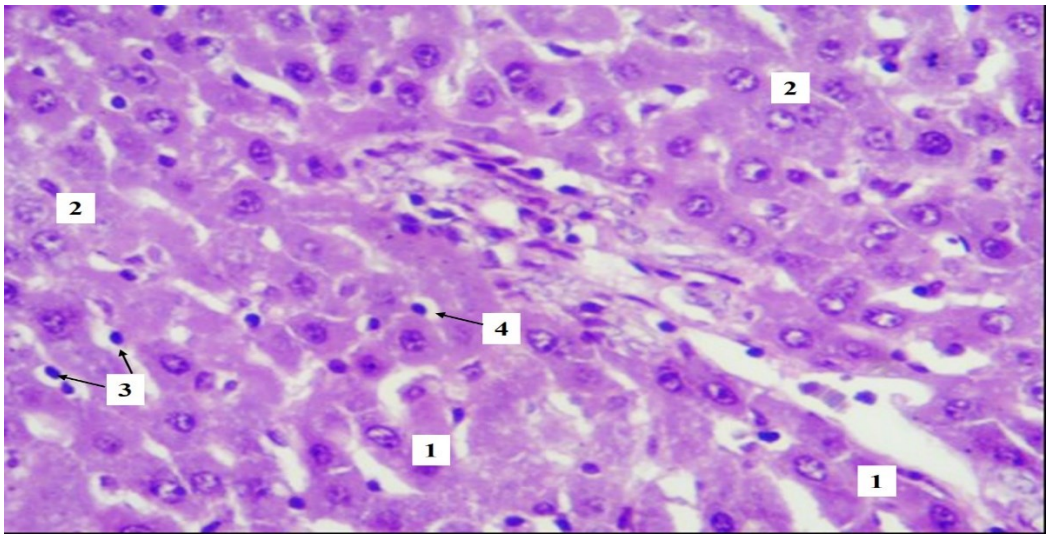

Рис. 5.6 Мікроскопічні зміни тканини печінки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції лізиноприлом. Радіальне впорядкування

печінкових балок (1), двоядерні гепатоцити (2), клітини Купфера (3), просвіт синусоїда (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

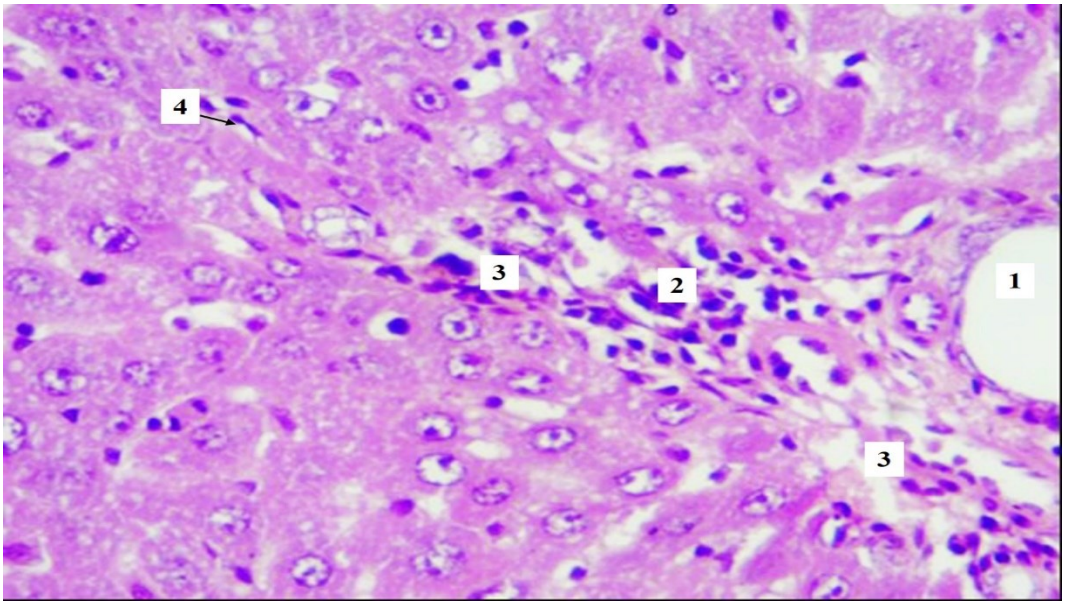

Рис. 5.7 Структурна організація тканини печінки щура за умов хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. Центральна вена (1), гістіо-лейкоцитарна інфільтрація (2), перипортальний фіброз (3), клітини Купфера (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

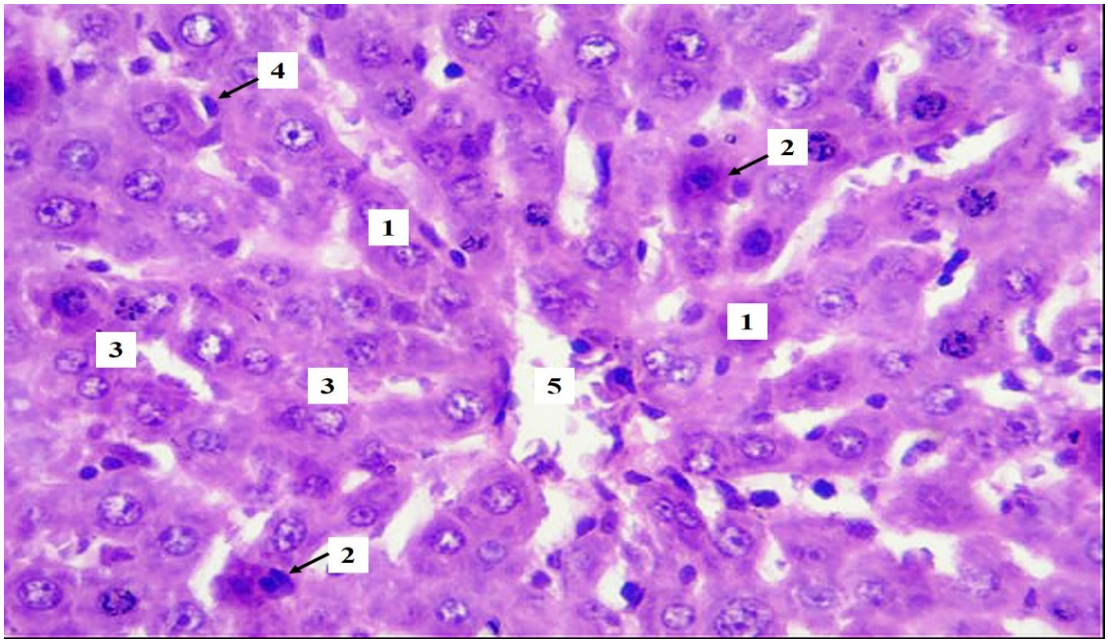

Рис. 5.8 Гістологічні зміни структури печінки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції лізиноприлом. Печінкові балки (1), тільця Каунсільмена (2), двоядерні гепатоцити (3), клітини Купфера (4), центральна вена (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

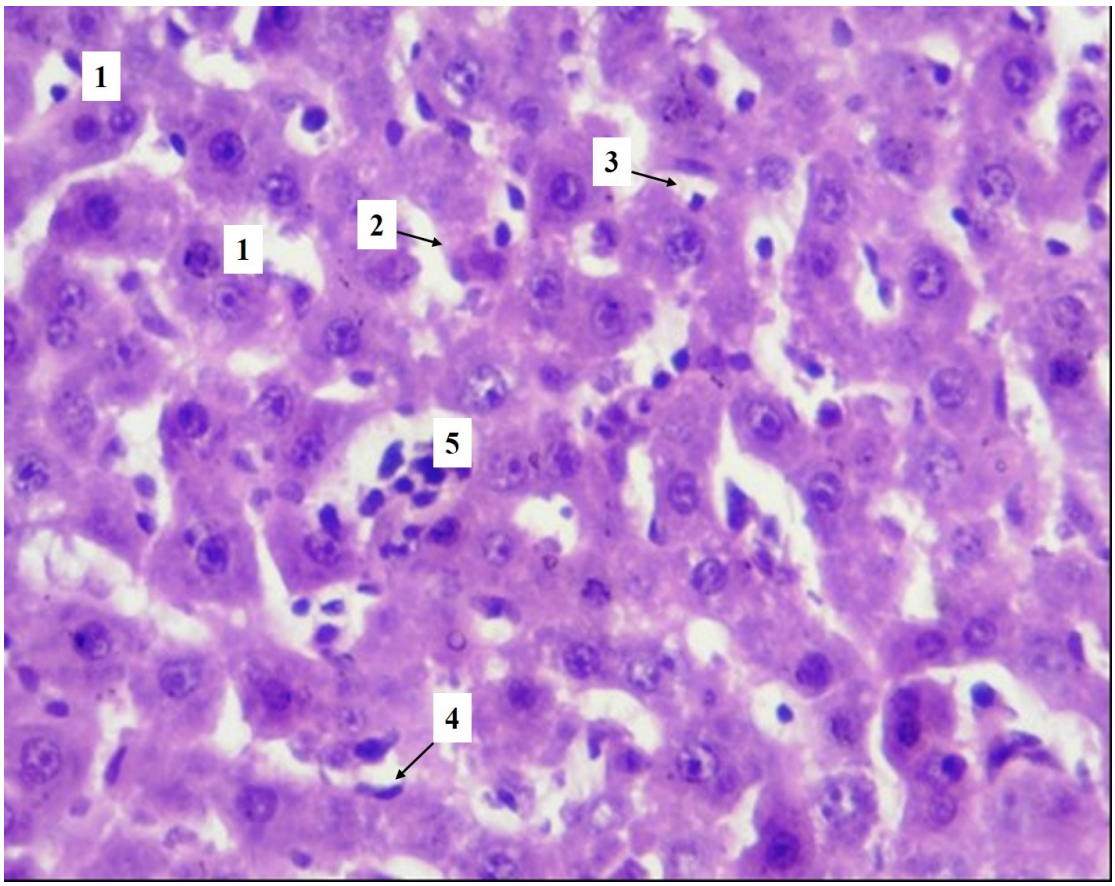

Рис. 5.9 Мікроскопічні зміни печінки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції лізиноприлом. Двоядерні гепатоцити (1), перисинусоїдні простори (2), просвіт синусоїда (3), клітини Купфера (4), гістіо-лейкоцитарна інфільтрація (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

За умов медикаментозної корекції L-аргініном L-глутаматом експериментального хронічного токсичного гепатиту у щурів при мікроскопічному дослідженні встановлено наявність незначних позитивних змін гістологічної структури тканини печінки. Зокрема, в перипортальних ділянках відмічали ознаки відновлення радіальної структури печінкових балок. При цьому, на периферії часточок гепатоцити характеризувались хаотичним розташуванням, дискомплексацією. Більшість клітин органу мали нечіткі, іноді розмиті контури, міжклітинні контакти їх порушені або втрачені. Цитоплазма гепатоцитів була зернистою, просвітленою, в них зберігались виражені прояви вакульної дистрофії. Ядра клітин гіпертрофовані,

просвітлені, обриси їх нечіткі, хроматин розріджений, займав примембранне розташування. У синусоїдних капілярах визначались поодинокі клітини Купфера. Частіше, ніж в групі тварин, що отримували лізиноприл, спостерігали тільця Малорі. Перисинусоїдні простори були значно розширені. У перипортальних ділянках виявляли ознаки вираженого фіброзу тканини печінки. Просвіти центральних вен були розширені, повнокрівні, з явищами адгезії еритроцитів та лейкоцитів до ендотеліального вистилення їх інтими. Останній характеризувався також проявами набряку і розпушення (рис. 5.10, 5.11).

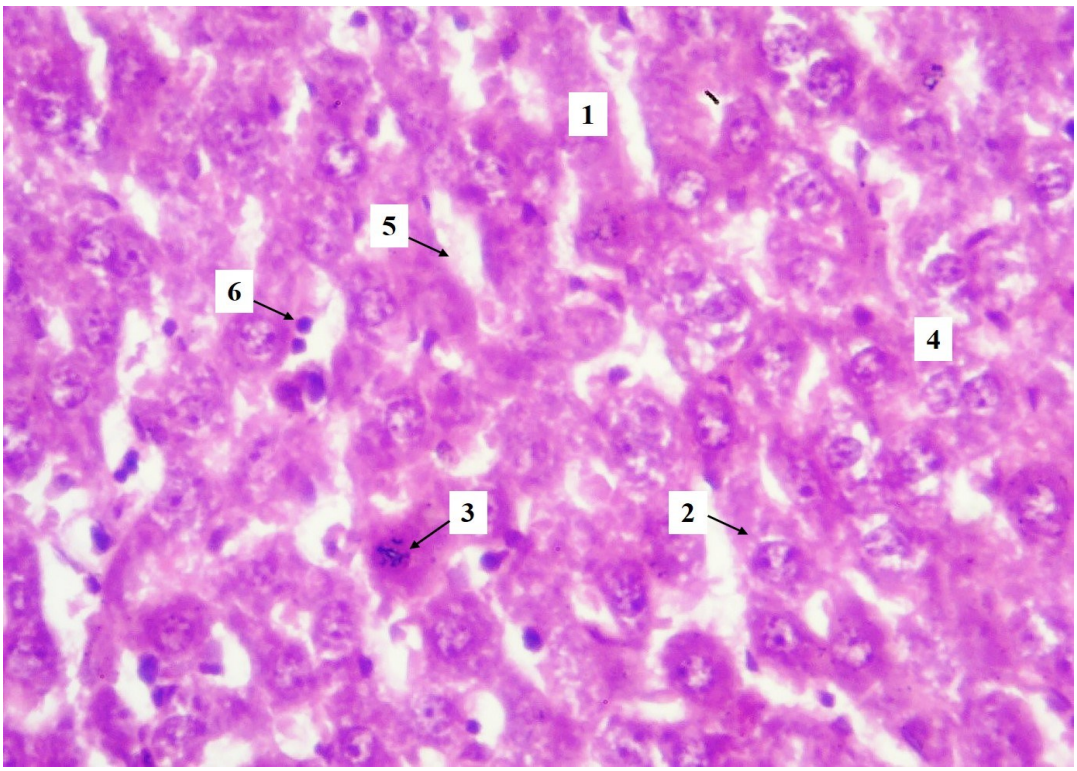

Рис. 5.10 Мікроскопічні зміни тканини печінки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції L-аргініном L-глутаматом. Печінкові пластинки (1), дистрофія гепатоцитів (2), тільце Малорі (3), дискомплексація гепатоцитів (4), перисинусоїдні простори (5), клітини Купфера (6). Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 200.

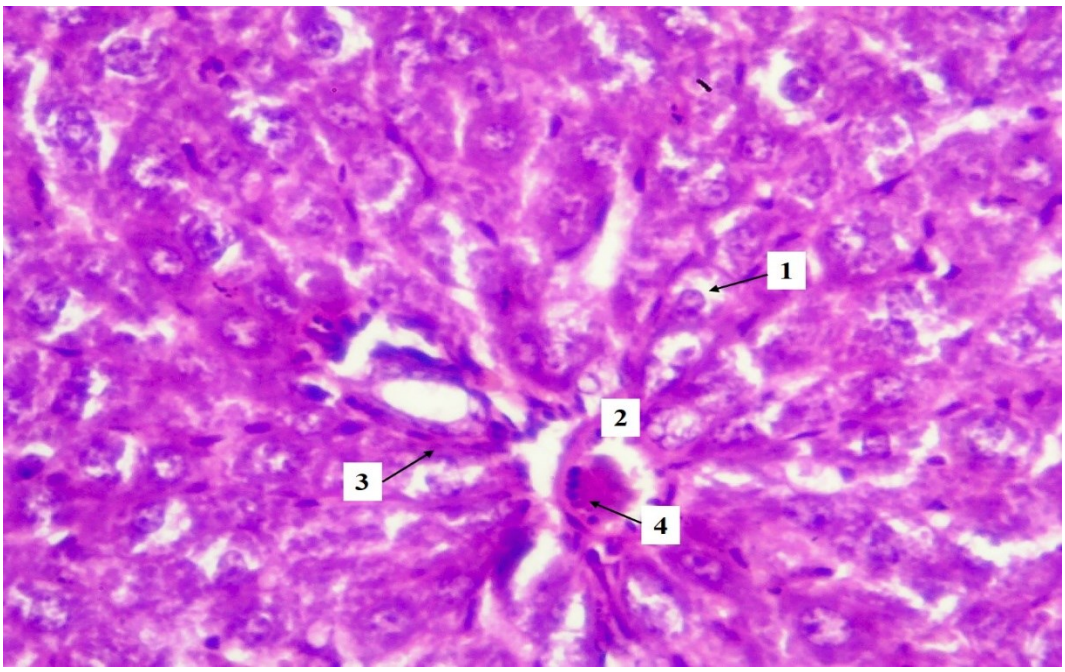

Рис. 5.11 Структурні зміни тканини печінки щура за умов хронічного токсичного гепатиту та корекції L-аргініном L-глутаматом. Дистрофія гепатоцитів (1), центральна вена (2), перипортальний фіброз (3), адгезія еритроцитів та лейкоцитів (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 200.

5.2. Структурні зміни тканин нирок у щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції

При експериментально індукованому хронічному токсичному гепатиті в тканині нирок щурів дослідної групи спостерігали наявність виражених деструктивно-дегенеративних змін. Ниркові тільця збільшувались в розмірах, сечові простори їх були розширеними. Капіляри судинних клубочків мали нерівномірне кровонаповнення, їх ендотеліальний шар та базальні мембрани володіли проявами деструкції. Характерним було руйнування внутрішнього та зовнішнього листків капсули Боумена. Навколо зовнішньої стінки капсули клубочка відмічали значну гістіо-лейкоцитарну інфільтрацію, а в просвітах приносних і виносних артеріол спостерігали чисельні скупчення клітин лейкоцитарного ряду, що може свідчити про розвиток запального процесу. В

клітинах мезангіуму наявні явища дистрофії. На окремих гістологічних препаратах виявлено ознаки гломерулосклерозу та фрагментації ниркових тілець. Епітеліоцити канальців нефрону були гіпертрофовані, цитоплазма їх просвітлена, набрякла. Ядра цих клітин збільшені в розмірах, містили розріджений хроматин. Виявляли ознаки десквамації епітеліального вистилення в просвіт трубочок нефронів. В останніх були елементи фібрину, клітинного детриту, циліндри. Крім того, в деяких полях зору присутні прояви порушення цілісності стінок канальців, розвиток тубулорексису і тубулонекрозу. Контури канальців при цьому були нечіткі, розмиті, межі між ними відсутні. В окремих трубочках відмічали явища геморагічного просочування стінок і появу еритроцитів в їх просвіті. Останній факт, ймовірно, пов'язаний з порушенням цілісності фільтраційного бар'єру та / або локальною деструкцією кровоносних судин і пропотіванням плазми крові в просвіти канальців. Також на гістологічних зразках тканини нирок щурів подекуди виявляли інтерканалікулярний набряк (рис. 5.12, 5.13, 5.14, 5.14, 5.16).

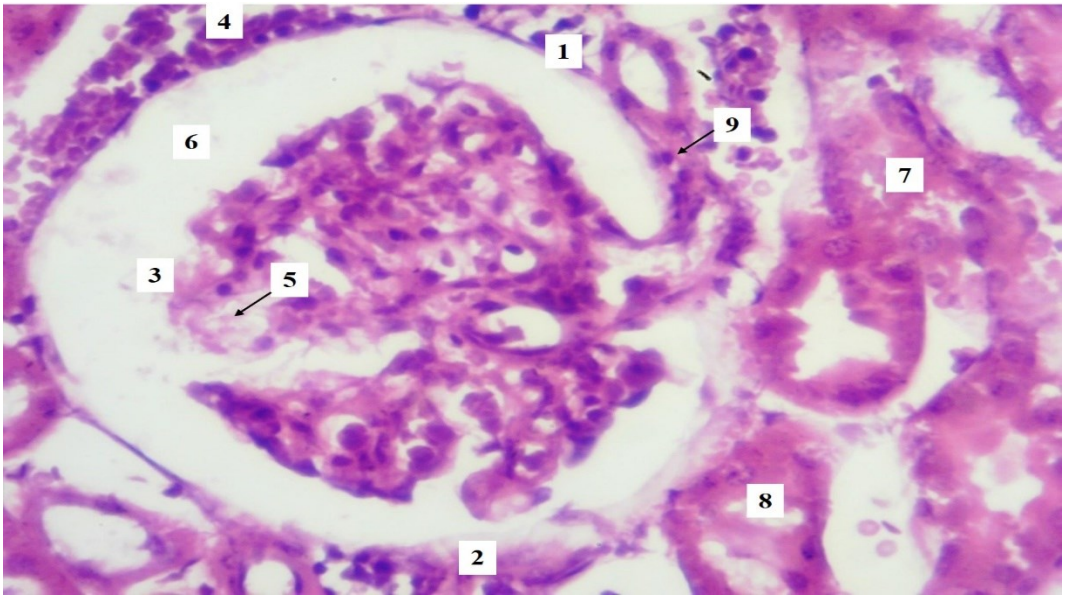

Рис. 5.12 Мікроскопічні зміни кіркової речовини нирки щура при хронічному токсичному гепатиті. Ниркове тільце (1), руйнування зовнішнього листка капсули Боумена (2), деструкція внутрішнього листка капсули Боумена (3), гістіо-лейкоцитарна інфільтрація (4), дистрофічні зміни капілярів клубочка (5), розширений сечовий простір (6), тубулонекроз (7), елементи

фібрину в просвіті канальця (8), клітини лейкоцитарного ряду в просвітах артеріол (9). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 400.

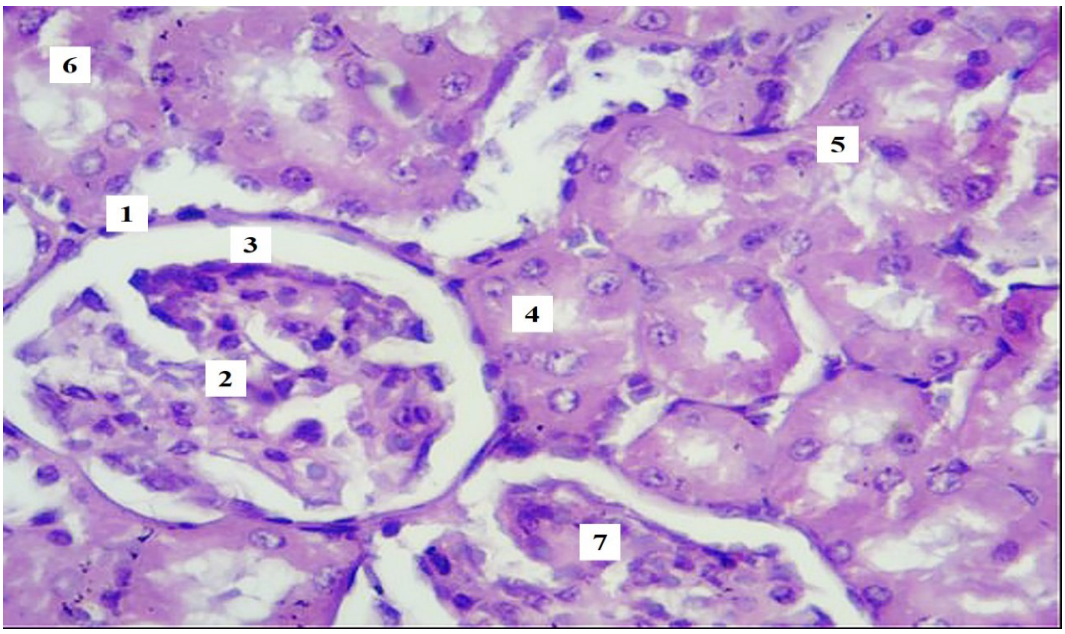

Рис. 5.13. Гістологічні зміни тканини нирки щура при експериментальному хронічному токсичному гепатиті. Ниркове тільце (1), судинний клубочок (2), сечовий простір (3), набряк епітеліоцитів канальців нефрону (4), тубулонекроз (5), клітинний детрит в просвіті канальця (6), гломерулосклероз (7). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

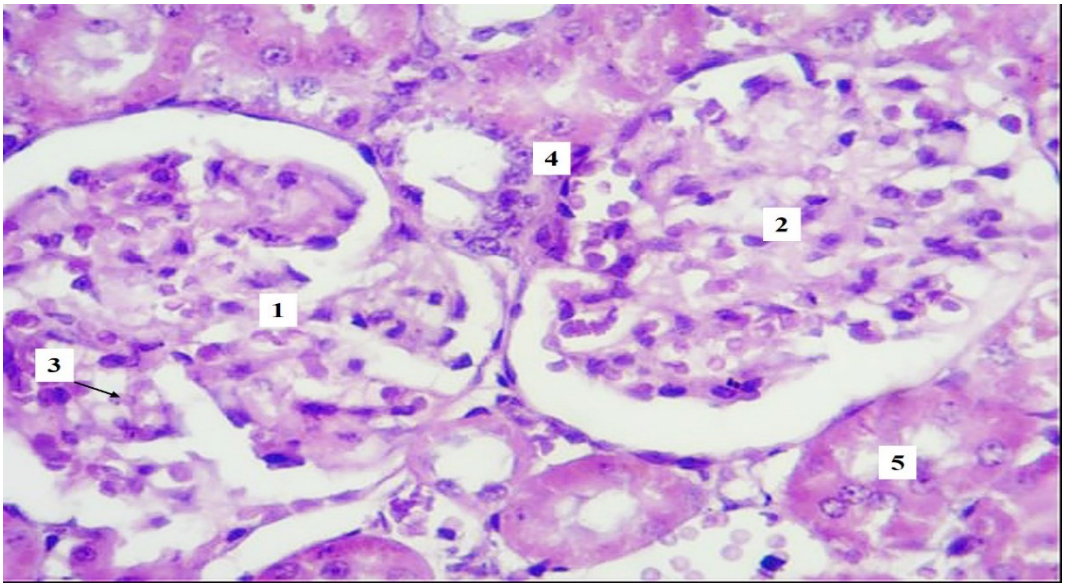

Рис. 5.14 Морфологічні зміни кіркової речовини нирки щура при експериментально індукованому хронічному токсичному гепатиті. Фрагментація ниркового тільця (1), гломерулосклероз (2), дистрофія

мезангіальних клітин (3), набряк стінок приносних і виносних артеріол (4), тубулорексис (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

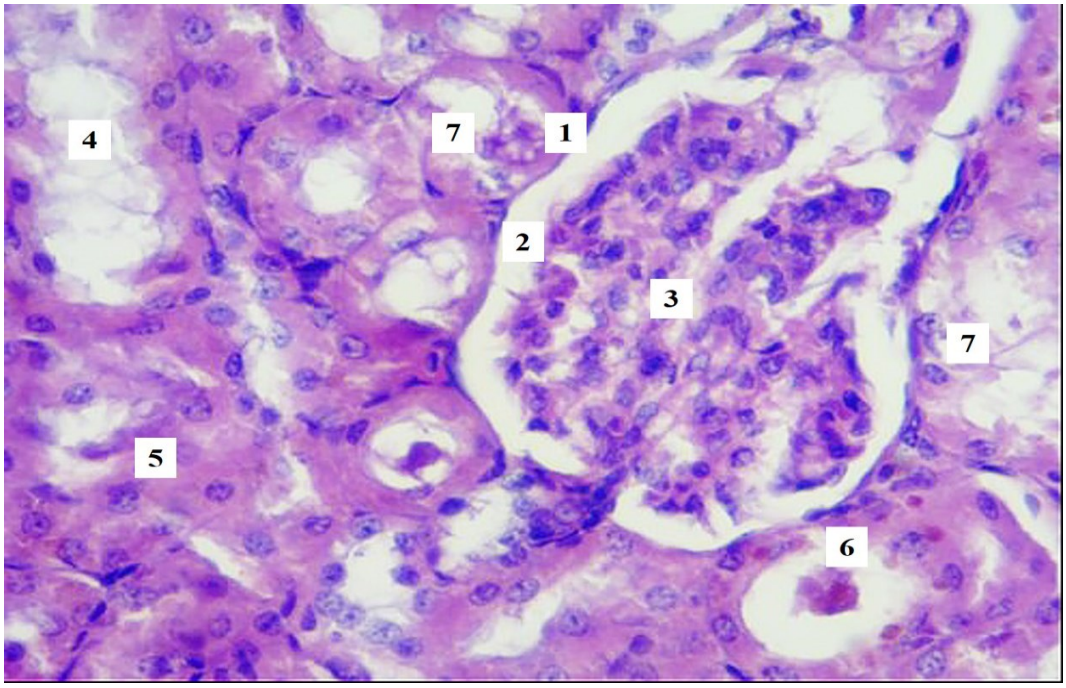

Рис. 5.15. Гістологічні зміни кіркової речовини нирки щура за умов хронічного токсичного гепатиту. Ниркове тільце (1), сечовий простір (2), гломерулосклероз (3), розширення просвіту канальця нефрону (4), нечіткі, розмиті контури між канальцями (5), геморагічний вміст в просвіті канальця (6), некротичні зміни стінки канальця нефрону (7). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

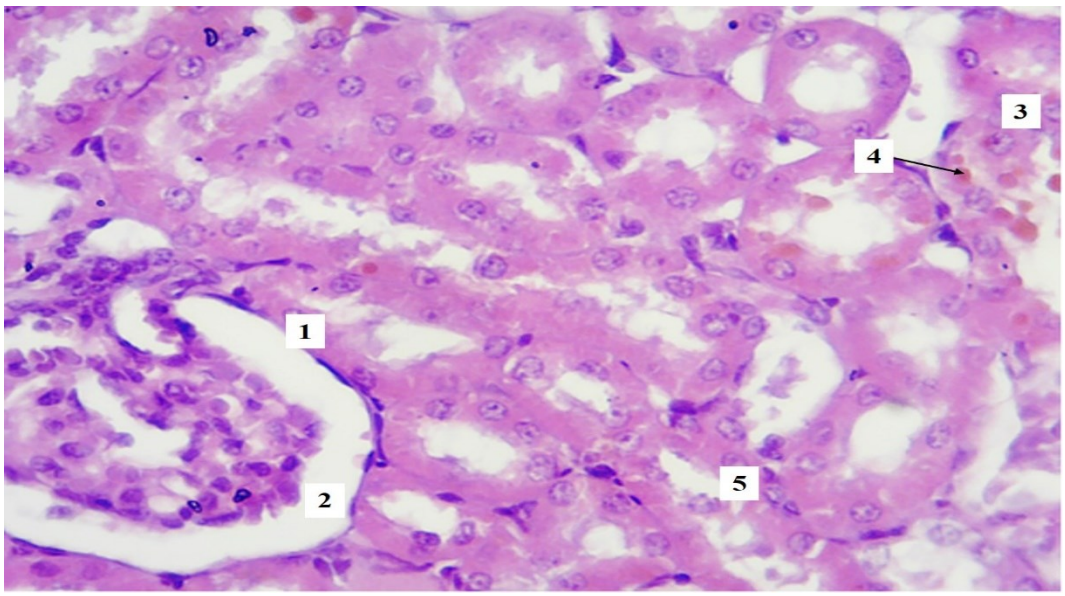

Рис. 5.16 Мікроскопічні зміни тканини нирки щура при експериментальному хронічному токсичному гепатиті. Ниркове тільце (1),

сечовий простір (2), вогнища некрозу епітеліоцитів стінок канальців нефрону (3), еритроцити в просвіті канальця (4), десквамація епітеліального вистилення в просвіт канальця (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

У щурів, яким проводили корекцію змодельованого патологічного процесу лізиноприлом відмічали позитивні зміни структурних компонентів тканини нирок. Ниркові тільця мали здебільшого однакові розміри, були не збільшеними, сечові простори їх не розширені. На відміну від групи тварин, які не підлягали медикаментозній корекції, в даному випадку не спостерігали ознак руйнування зовнішньої та внутрішньої стінок капсули клубочка, епітеліальне вистилення їх збережене, без явищ десквамації. Капіляри судинних клубочків мали близьку до типової організацію, характеризувались помірно вираженим повнокрів'ям. Ендотелій їх та базальні мембрани були цілісні. Мезангіальні клітини зазнавали проліферації, подоцити не мали проявів патологічних змін. Подекуди виявляли фрагментовані ниркові тільця та вогнищеві крововиливи. Епітеліоцити канальців нефрона зменшувались в розмірах, в порівнянні зі щурами, яким не проводили корекцію. Цитоплазма їх була гомогенною, іноді з ознаками набряку. Ядра даних клітин гіпертрофовані, нормо- чи гіперхромні, хроматин в них здебільшого деконденсований. Епітеліоцити канальців нефрона за умов корекції лізиноприлом відрізнялись високим ядерно-цитоплазматичним індексом, що разом зі значним вмістом в ядрах еухроматину має сприятливі прогностичні наслідки та є проявом збереження і підвищення здатності клітин до регенерації. Окремі трубочки нефронів мали незначні дистрофічні зміни їх епітелію. На деяких гістологічних препаратах виявляли також клітинний детрит та циліндри в просвітах ниркових канальців (рис. 5.17, 5.18, 5.19, 5.20).

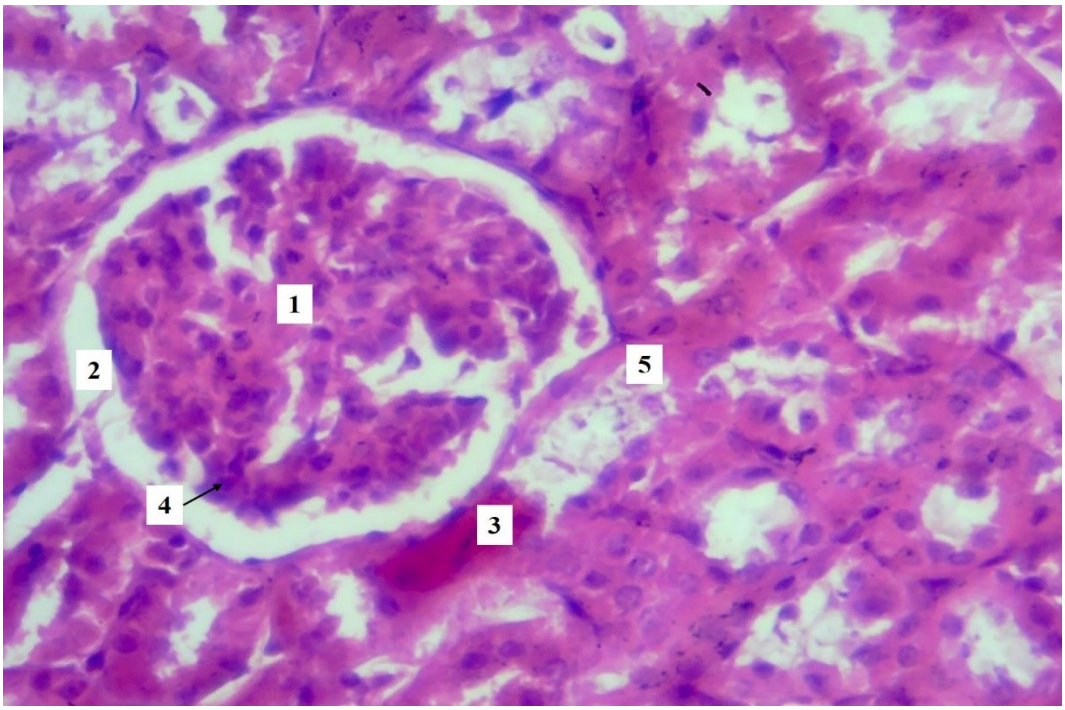

Рис. 5.17 Мікроскопічні зміни кіркової речовини нирки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції лізиноприлом. Ознаки фрагментації ниркового тільця (1), сечовий простір (2), вогнищевий крововилив (3), проліферація мезангіальних клітин (4), клітинний детрит в просвіті канальця (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

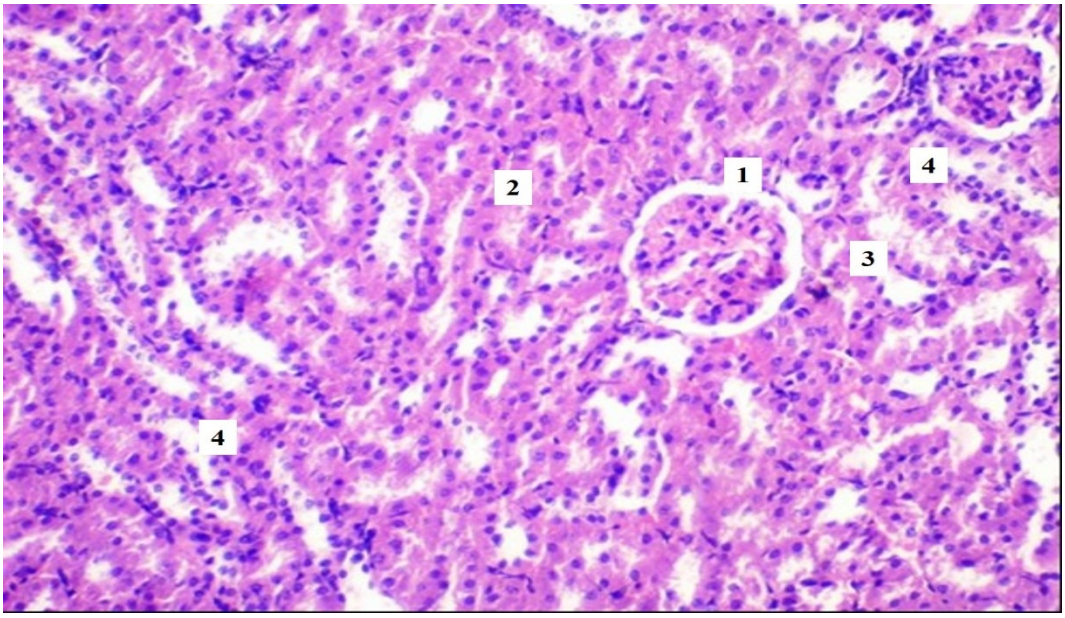

Рис. 5.18 Гістологічна організація кіркової речовини нирки щура за умов хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. Ниркове тільце (1), проксимальні канальці нефрону (2), дистальні канальці нефрону (3),

дистрофічні зміни епітелію окремих канальців нефрону (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 100.

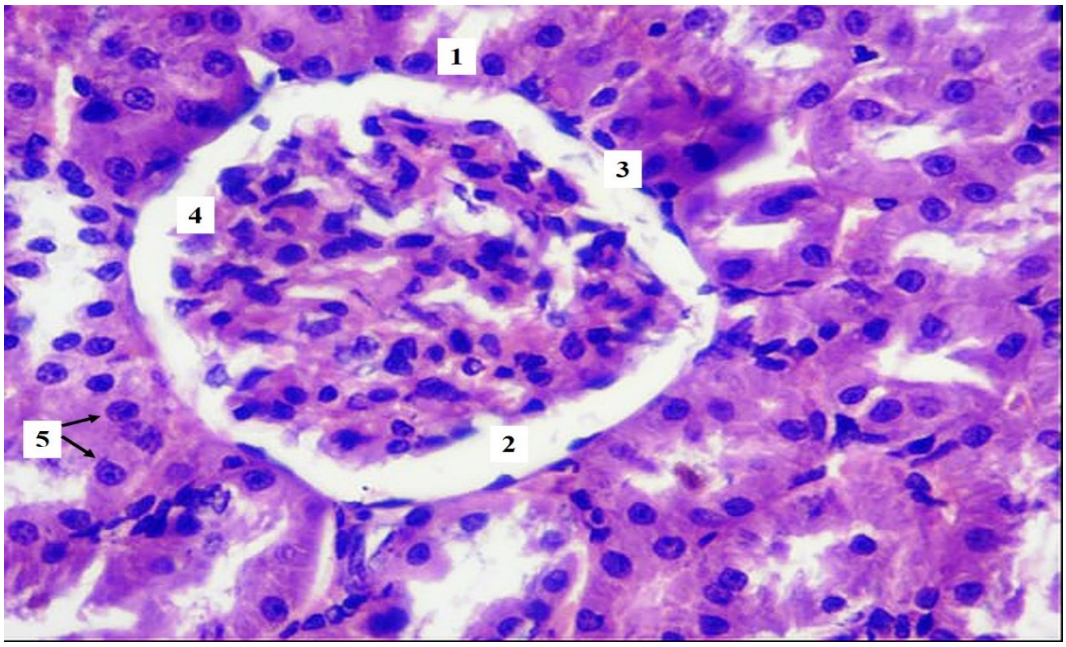

Рис. 5.19 Структурні зміни тканини нирки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції лізиноприлом. Ниркове тільце (1), сечовий простір (2), зовнішня стінка капсули клубочка (3), внутрішня стінка капсули клубочка (4), гіпертрофія ядер епітеліоцитів канальців нефрону (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

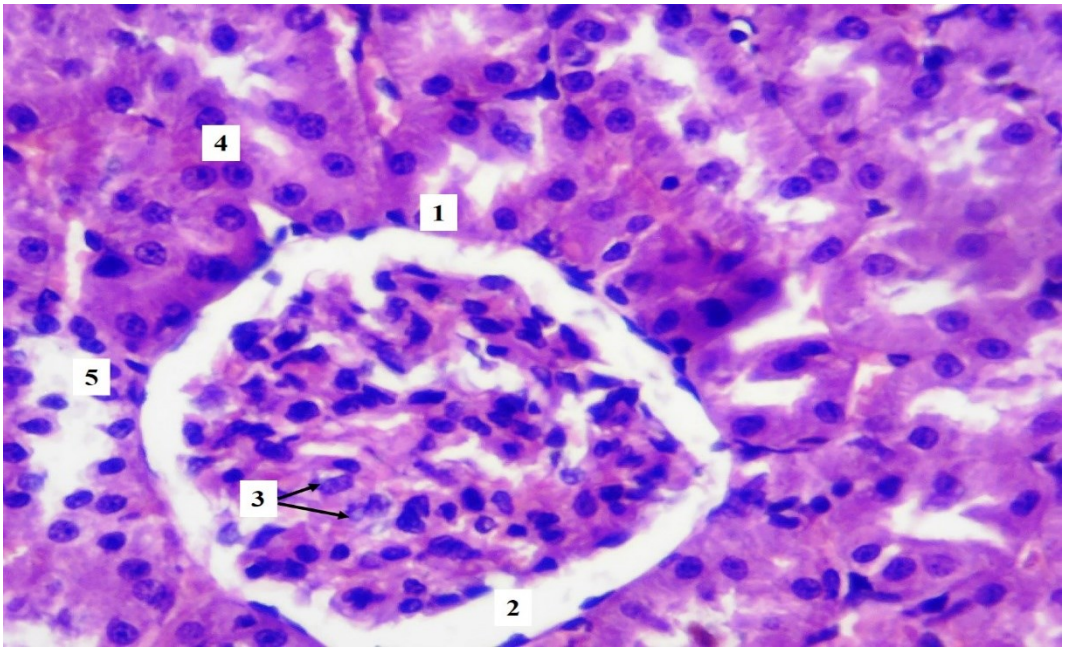

Рис. 5.20 Мікроскопічні зміни кіркової речовини нирки щура за умов хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. Ниркове тільце (1),

сечовий простір (2), проліферація мезангіоцитів (3), гіпертрофія ядер епітеліоцитів канальців нефрону (4), ділянки дистрофії епітелію канальців нефрону (5). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

У щурів з експериментальним хронічним токсичним гепатитом, що отримували в якості медикаментозної корекції L-аргінін L-глутамат не спостерігали виразних позитивних змін гістологічної структури нирок. Ниркові тільця за даних умов при морфологічному дослідженні буди деформованими. Виявляли руйнування внутрішнього листка капсули Боумена та вихід формених елементів крові і фібрину в сечовий простір. Капіляри судинних клубочків мали прояви нерівномірного кровонаповнення. Ядра ендотеліоцитів стінок капілярів були дещо гіпертрофованими, базальні мембрани їх без деструктивних змін. В нижньому полюсі ниркового тільця часто спостерігали формування злук між листками капсули Боумена, а у верхньому полюсі його були залишкові явища руйнування ендотеліального шару зовнішньої стінки капсули клубочка. Мезангіоцити та подоцити володіли незначно вираженими дистрофічними змінами.

Епітеліальні клітини стінок канальців нефронів мали дещо просвітлену цитоплазму. Ядра їх гіпертрофовані, гіперхромні. В більшості полів зору спостерігали дистрофічно-некротичні зміни канальців нефрону. Характерними були вогнищеві некрози, порушення цілісності їх стінок. При цьому упорядкування епітеліоцитів в ниркових трубочках було хаотичним, не можливою є чітка ідентифікація проксимальних та дистальних канальців. Крім того, за даних умов наявні ознаки проліферації елементів сполучної тканини та розростання компонентів строми органу і, ймовірно, розвиток фіброзу (рис. 5.21, 5.22).

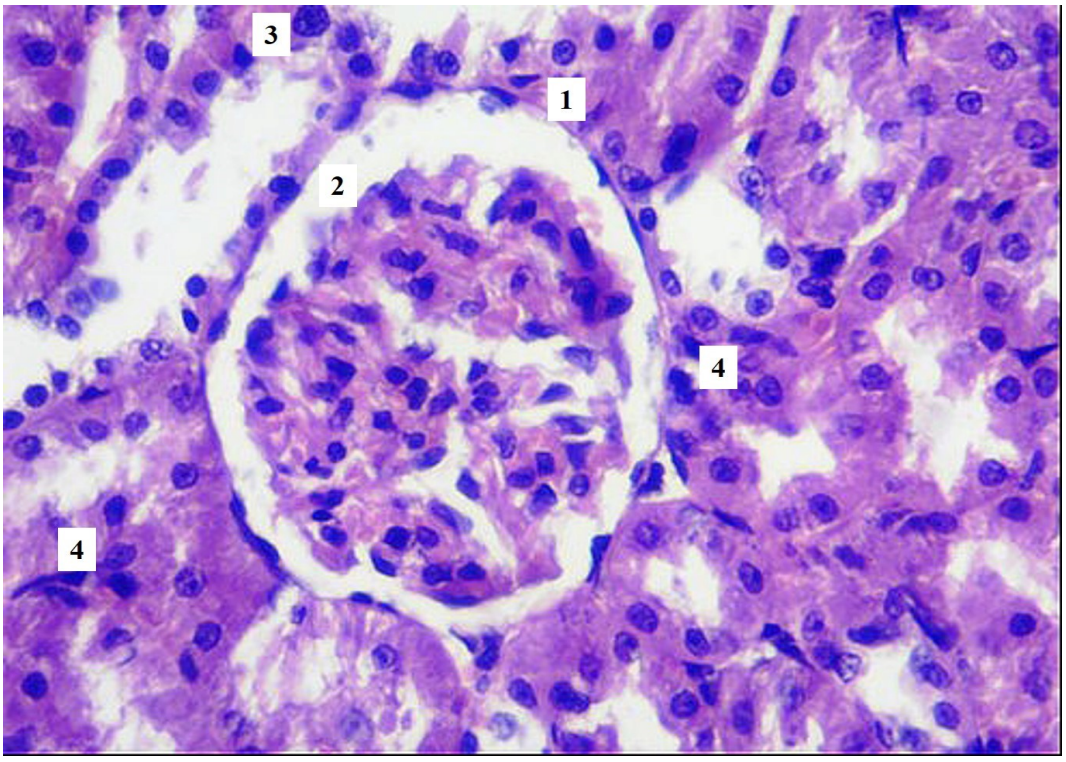

Рис. 5.21. Мікроскопічні зміни тканини нирки щура при хронічному токсичному гепатиті та корекції L-аргініну L-глутаматом. Ниркове тільце (1), сечовий простір (2), гіпертрофія ядер епітеліоцитів канальців нефрону (3), дистрофічно-некротичні зміни епітелію канальців нефрону (4). Забарвлення гематоксиліном та еозином. х 200.

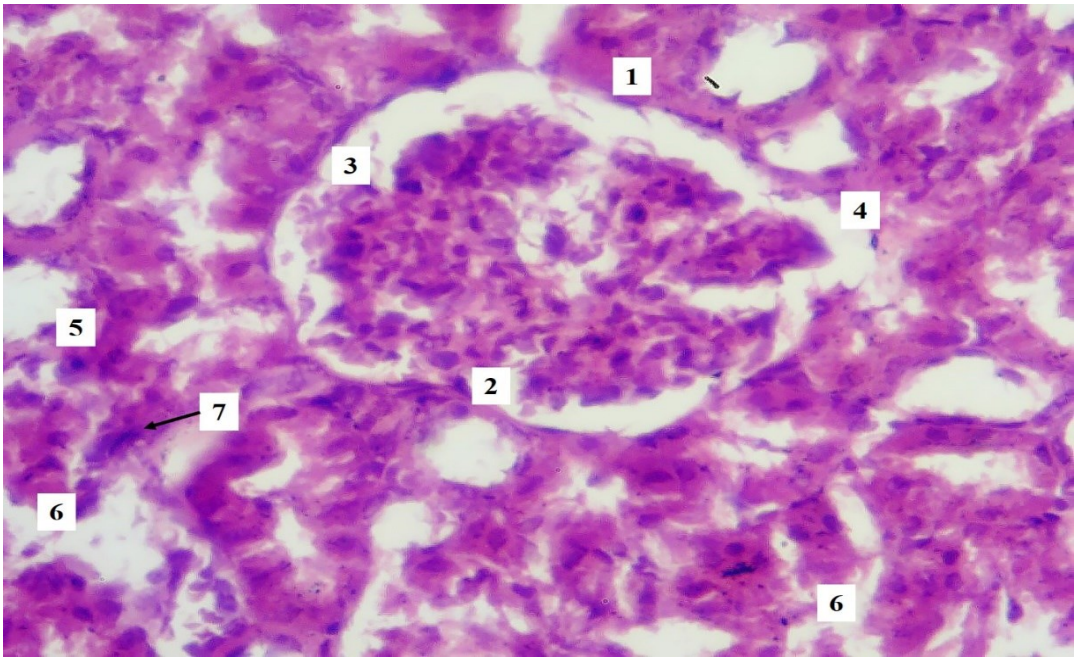

Рис. 5.22 Структурні зміни кіркової речовини нирки щура за умов хронічного токсичного гепатиту та корекції L-аргініну L-глутаматом. Деформація ниркового тільця (1), злукові процеси між листками капсули

Боумена (2), формені елементи крові та фібрин в сечовому просторі (3), залишкові ознаки деструкції зовнішнього листка капсули Боумена (4), вогнищеві некрози (5), порушення цілісності стінок канальців (6), проліферація елементів сполучної тканини (7). Забарвлення гематоксиліном та еозином × 200.

Таким чином, за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту в тканині печінки та нирок щурів при гістологічному дослідженні спостерігали розвиток компенсаторно-адаптаційних та деструктивних змін. Характерним було порушення часточкової будови печінки, балкового впорядкування гепатоцитів, розвиток їх вакуольної дистрофії, наявність фокальних некрозів. Крім того, ядра клітин органу володіли подекуди ознаками каріолізису та каріопікнозу. Виявляли апоптотичні тільця Каунсільмена та скупчення алкогольного гіаліну всередині клітин і екстрацелюлярно. При даному змодельованому патологічному процесі в печінці відмічали гістіо-лейкоцитарну інфільтрацію та перипортальний фіброз. Слід зазначити, що фіксували ураження стінок кровоносних судин, зокрема, синусоїдних капілярів і центральних вен.

У нирках експериментальних щурів виявлені зміни як гломерулярного, так і канальцевого апаратів органу. Так, ниркові тільця були гіпертрофованими, капіляри судинних клубочків мали ознаки пошкодження їх ендотеліального вистилення і базальних мембран, а зовнішній та внутрішній листки капсули Боумена зазнавали деструкції. В нирках також спостерігали розвиток запального процесу, що морфологічно проявлявся у вигляді вираженої гістіо-лейкоцитарної інфільтрації, особливо в ділянках навколо зовнішньої стінки капсули клубочка. Важливими знахідками були гломерулосклероз та фрагментація ниркових тілець. Значні зміни виявлено і в канальцях нефронів. Епітеліоцити їх мали прояви дистрофії, часто з десквамацією в просвіт трубочок нефронів. На окремих гістологічних

препаратах відмічали явища тубулорексису і тубулонекрозу, геморагічного просочування стінок канальців, іноді їх руйнування. Просвіти канальців нефронів при цьому були заповнені клітинним детритом, фібрином, циліндрами або форменими елементами крові.

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту лізиноприлом асоціювалась з позитивними морфологічними змінами структури як печінки, так і нирок. Зокрема, в печінці спостерігали відновлення радіального розміщення печінкових балок, зменшення проявів перипортального фіброзу, вакуольної дистрофії гепатоцитів, зростання чисельності двоядерних клітин та гепатоцитів з високим ядерно-цитоплазматичним індексом, що носить сприятливий прогностичний характер відносно регенерації.

У кірковій речовині нирок дослідних тварин за корекції лізиноприлом встановлено відсутність ознак деструкції стінок капсули клубочка та ендотеліального шару і базальних мембран капілярів судинних клубочків. Ниркові тільця зменшувались в розмірах, сечові простори їх були не розширені. Рідше зустрічались епітеліоцити канальців нефронів з явищами їх дистрофії. Вони також, як і гепатоцити, володіли високим ядерно-цитоплазматичним індексом і значним потенціалом до відновлення.

Застосування в якості медикаментозної корекції L-аргініну L-глутамату у тварин з хронічним токсичним гепатитом не призводило до появи яскраво виражених покращень структурної організації тканини печінки та нирок. Необхідно відмітити, що при введені даного препарату виявлено лише часткове відновлення радіальної структури печінкових балок в перипортальних зонах.

У кірковій речовині нирок при морфологічному дослідженні спостерігали незначне зменшення проявів деструкції листків капсули Боумена, дистрофічних змін мезангіоцитів і подоцитів. Характерною була проліферація елементів сполучної тканини і розростання строми органу, що

можливо є наслідком початку відновних процесів у відповідь на дію пошкоджуючого фактору.

Отже, за результатами морфологічного дослідження можна стверджувати, що при експериментальному хронічному токсичному гепатиті, індукованого сумісним введенням тетрахлорметану та етанолу, серед двох засобів медикаментозної корекції лише лізиноприл проявляв відновлюючі та захисні властивості щодо тканини печінки та нирок дослідних щурів.

Результати даного розділу опубліковано у працях [64, 65, 249].

РОЗДІЛ 6
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Останнім часом в Україні складається несприятлива епідеміологічна ситуація щодо хвороб органів травлення – спостерігається зростання їх захворюваності та смертності. Особливо на цьому фоні виділяється зростання смертності від цирозу печінки та хронічного гепатиту, що підтверджує певне неблагополуччя у соціально-економічному становищі на масовому популяційному рівні [26].

За даними ВООЗ, протягом останніх двох десятиліть у світі зростає кількість хворих із захворюваннями печінки, що на сьогодні перевищує 2 млрд осіб. У країнах СНД щорічно реєструється від 500 тис. до 1 млн осіб із різноманітними захворюваннями печінки. Значна поширеність токсичних гепатитів, істотне омолодження основних груп хворих, зростання хронічних форм хвороби, що призводять до зниження працездатності, визначають багатогранність проблеми й актуальність її дослідження [3]. У структурі хронічних дифузних захворювань печінки переважають токсичні – 52,4 % та вірусні – 47 % ураження. Більшу частину хронічних токсичних гепатитів (ХТГ) складають захворювання алкогольної етіології [104].

Токсичні ураження печінки досить часто поєднуються з пошкодженням нирок, що значно ускладнює лікування цих пацієнтів. Однією із причин розвитку патології нирок за цих умов є пряма нефротоксична дія токсиканту [309]. Поряд з цим розлади функцій нирок можуть бути наслідком прогресування патології печінки – гепаторенальний синдром (ГРС) [158, 246]. На сьогодні відомо, що тригерним чинником ГРС є надмірна активація РААС, яка з однієї сторони залучена до розвитку фіброзу в печінці, а з іншої сторони спричиняє порушення функціонального стану нирок [246]. Проте, залишаються до кінця нез’ясованими молекулярні механізми через які реалізується пошкоджуючий вплив РААС на тканин печінки та нирок за

окремих видів токсичних гепатитів (наприклад, ініційованого тетрахлорметаном та етанолом), що до певної міри стримує розробку ефективних засобів корекції.

Враховуючи вищевикладене, стає очевидно, що проблема хронічного токсичного гепатиту та цирозу печінки є актуальною. Важливим для сучасної медицини є розробка і впровадження нових схем лікування, які поряд з потужною гепатопротекторною дією мають здатність попереджувати розвиток ниркової дисфункції. З цієї точки зору найбільш перспективним напрямком терапії є використання інгібіторів РААС, а саме інгібіторів АПФ та інгібіторів рецепторів до ангіотензину II. В багатьох експериментальних дослідженнях показано, що використання цих препаратів сповільнює розвиток фіброзу в печінці та покращує процеси регенерації тканини печінки [121, 173, 187, 237, 244, 287, 290, 308]. Поряд з цим показано, що інгібітори АПФ виявляють захисну дію щодо нирок за хронічної патології печінки [28]. Однак, залишаються невивченим нефро- та гепатопротекторні ефекти інгібіторів АПФ за окремих токсичних гепатитів (наприклад, ініційованих сумісним введенням тетрахлорметану та етанолу), а також недостатньо досліджені молекулярні механізми через які вони реалізуються.

Тому, ***метою дослідження*** було встановити механізми пошкодження та регенерації тканин печінки й нирок щурів за хронічного токсичного ураження тетрахлорметаном й етанолом і на тлі корекції лізиноприлом та референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом.

Серед інгібіторів АПФ в якості препарату коректора використовували лізиноприл, адже він не метаболізується через печінку, є гідрофільним, має тривалу дію та призначається 1 раз на добу [28]. Препаратом порівняння був обраний L-аргінін L-глутамат, який є відомим гепатопротектором, виявляє гіпоамоніемічну, антиоксидантну, антигіпоксичну дії, значно посилює обмін речовин в печінці, нормалізує процеси енергозабезпечення в гепатоцитах [102]. Поряд з цим у L-аргініну L-глутамату виявлено здатність стримувати фіброз печінки за токсичної дії тетрахлорметану [58, 75, 95, 97, 101].

Для досягнення поставленої мети нами були проведені експериментальні дослідження на 120 білих нелінійних лабораторних статевонезрілих щурах-самицях з масою 60-80 г, отриманих з віварію ВНМУ ім. М. І. Пирогова. У ході експерименту усі піддослідні тварини поділені на чотири групи (по 24 щура у кожній). Перша група – інтактні щурі, які перебували в стандартних умовах віварію. У другій, третій та четвертій групах тварин моделювали хронічний токсичний гепатит шляхом інтрагастрального введення 20% олійного розчину тетрахлорметану в дозі 0,1 мл/100 г маси двічі на тиждень у комбінації з 5% розчином етанолу протягом 8 тижнів [67]. У третій та четвертій групах паралельно з веденням гепатотоксинів протягом 8 тижнів проводили корекцію відповідно інгібітором ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприлом (Лізиноприл-Астрафарм, ТОВ «Астрафарм», Україна) – у дозі 20 мг/кг/добу, інтрагастрально, а також відомим гепатопротектором L-аргініном L-глутаматом (Глутаргін, ТОВ «Здоров'я», Україна) – в дозі 35мг/кг/добу, інтрагастрально [90]. Після знеживлювання тварин проводили забір крові, печінки та нирок, які в подальшому були використані для біохімічних, імуноферментних, морфологічного та цитофлуориметричного досліджень.

Під час біохімічних досліджень визначали вміст фракцій гідроксипроліну (вільного, пептидозвя’заного та загального) в сироватці крові та рівень вільного гідроксипроліну в гомогенатах печінки та нирок за реакцією з пара-диметиламінобензальдегідом [99]. Імуноферментними методами оцінювали вміст трансформуючого фактору росту бета (TGF-β) та інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1) з використанням відповідних наборів «Rat TGF beta 1 Platinum ELISA» (eBioscience, Австрія) та «m/r IGF-1-ELISA (IGFBP-blocked)» (Mediagnost, Німеччина) відповідно до інструкції фірми-виробника на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Цитофлуориметричні дослідження проведені з метою оцінки плоїдності клітин печінки, показників клітинного циклу та фрагментації ядерної ДНК в гепатоцитах та клітинах кіркової речовини нирок. Морфологічні дослідження

забезпечили можливість оцінити мікроструктуру тканин печінки та нирок в досліджуваних групах тварин.

На першому етапі досліджено особливості обміну колагену в тканинах печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту (індукованого тетрахлорметаном і етанолом) та його корекції лізиноприлом і референс-препаратом L-аргініном L-глутаматом (розділ. 3.1).

Показано, що введення щурам тетрахлорметану та етанолу спричиняє пертурбації метаболізму колагену в печінці та нирках щурів, викликає ремоделювання сполучної тканини та розвиток фіброзу. Хронічний токсичний гепатит асоціювався з посиленням процесів розпаду колагену в печінці та нирках щурів, доказом чого було зростання середніх показників вмісту вільного гідроксипроліну в органах відповідно на 52,7 та 39,2% ($p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи (табл. 3.4). Поряд з цим відмічались зміни фракційного розподілу гідроксипроліну в сироватці крові (рис. 3.1-3.3). За хронічного токсичного гепатиту реєструвалось зростання в сироватці крові вмісту загального гідроксипроліну (на 23,8%, $p<0,001$), вільного гідроксипроліну (на 23,3%, $p<0,05$) та пептидозв'язаного гідроксипроліну (на 17,4%, $p<0,05$).

Відомо, що при хронічних гепатитах та цирозі печінки інтенсивність процесів синтезу і розпаду колагену відображають фракції ГП [6, 33, 36, 69]. За даними Siddiqi, N. J. & Alhomida, A. S. (2003) максимальний синтез колагену має місце при активному ХТГ, про що свідчить підвищення вмісту в сироватці крові пептидно-зв'язаного гідроксипроліну (ПГП), який характеризує колагеноутворення [265]. У цих хворих має місце і вірогідне підвищення вільного гідроксипроліну (ВГП), який відображає процеси синтезу і деструкції незрілого колагену на тлі зниження еластазної активності.

Особлива роль у прогресуванні фіброзу належить продуктам перекисного окиснення ліпідів. Накопичення ТБК-активних продуктів стимулює функціональну активність ретикулоендотеліоцитів (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 [84, 103, 167].

Далі ми оцінили зміни метаболізму колагену в печінці та нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту на тлі застосування коректорів лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату (табл. 3.1-3.4). Встановлено, що медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту по різному впливала на процеси катаболізму колагену в органах щурів, що залежало від обраного препарату. У щурів, які отримували лізиноприл, відмічалось найбільш суттєве пригнічення процесів розпаду колагену в печінці та нирках. Так, у тварин групи «Хронічний токсичний гепатит + лізиноприл» середній рівень вільного гідроксипроліну в печінці та нирках був меншим відповідно на 23,2 та 24,7% ($p<0,01$), порівняно з нелікованими тваринами. За цих умов нормалізувався фракційний розподіл гідроксипроліну в сироватці крові: зменшувався вміст загального гідроксипроліну (на 24,5%, $p<0,05$), вільного гідроксипроліну (на 18,2%, $p<0,05$) та пептидозв'язаного гідроксипроліну (на 25,4%, $p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. Отримані нами результати не суперечать літературним щодо наявності у лізиноприлу антифіброгенної дії в печінці та нирках за різних патологій [28, 121, 188, 237].

Введення референс-препарату за хронічного токсичного гепатиту виявляло меншу здатність коригувати процеси розпаду колагену, порівняно з лізиноприлом. Виявилось, що у тварин групи «Хронічний токсичний гепатит + L-аргінін L-глутамат» за середнім показником вміст вільного гідроксипроліну в печінці та нирках був меншим відповідно на 13,3% ($p<0,01$) та 10,9% ($p<0,01$), ніж у нелікованих тварин. Поряд з цим досліджуваний показник був вірогідно вищим, порівняно з таким у тварин, лікованих лізиноприлом. За умов введення L-аргініну L-глутамату також відмічалось зменшення дисбалансу між окремими фракціями гідроксипроліну в сироватці крові, однак ефективність була меншою ніж у лізиноприлу: зменшувався вміст загального гідроксипроліну (на 19,1%, $p<0,05$), вільного гідроксипроліну (на

15,2%, p>0,05) та пептидозв'язаного гідроксипроліну (на 17,5%, p>0,05), порівняно з нелікованими тваринами.

Таким чином введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликало порушення метаболізму колагену та розвиток фіброзу в печінці та нирках щурів. За цих умов використання інгібітору АПФ лізиноприлу супроводжувалось вірогідним зменшенням пертурбацій обміну колагену та антифіброгенною дією в печінці та нирках. За вказаним ефектом лізиноприл значно випереджав препарат порівняння L-аргінін L-глутамат.

На другому етапі оцінено роль TGF-β та IGF-1 в механізмах пошкодження й регенерації тканин печінки й нирок за хронічного токсичного гепатиту і на тлі корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом (розділ 3.2).

Відомо, що TGF-β є профіброгенним медіатором, який активує зірчасті клітини та викликає їх трансформацію у міофібробласти. Останні інтенсивно синтезують позаклітинний матрикс, що веде до розвитку фіброзу печінки. Поряд з цим TGF-β індукує експресію прозапальних генів, знижує продукцію матриксних металопротеіназ та збільшує синтез їх тканинних інгібіторів, зменшує проліферацію гепатоцитів, активує їх апоптоз [32]. Відомо, що за багатьох медикаментозних токсичних уражень печінки (індукованих тіоцетамідом, рифампіцином, ізоніазидом), а також за тетрахлорметанового гепатиту сироваткові рівні TGF-β1 вірогідно зростають, порівняно з контролем [13, 146, 281]. Проте залишається невивченим зміни рівня TGF-β в сироватці крові за хронічного токсичного гепатиту, індукованого сумісним введенням тетрахлорметану та етанолу, а також на тлі корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом. Не досліджено також, наявність кореляцій між сироватковим вмістом TGF-β та продуктами деградації колагену в печінці та нирках щурів за вказаної патології.

Тому, спершу нами оцінено зміни сироваткового рівня TGF-β та їх зв'язок з показниками метаболізму колагену в печінці, нирках й сироватці

крові щурів за хронічного токсичного гепатиту та його корекції лізиноприлом і L-аргініном L-глутаматом (рис. 3.4-3.5, табл. 3.5).

Виявилось, що моделювання хронічного токсичного гепатиту супроводжувалось вірогідним зростанням середнього рівня TGF-β на 13,5% ($p<0,001$), відносно показників контрольної групи тварин. Застосована терапія з різною ефективністю коригувала сироватковий рівень досліджуваного цитокіну. За умов використання лізиноприлу середні показники вмісту TGF-β в сироватці крові були на 54,1% меншим ($p<0,01$), порівняно з групою нелікованих тварин. У той же час, L-аргінін L-глутамат значно поступався лізиноприлу за здатністю коригувати рівень TGF-β. У групі «Хронічний токсичний гепатит + L-аргінін L-глутамат» середній показник вмісту TGF-β та був на 36,8 % меншим ($p<0,01$), порівняно з групою нелікованих тварин.

Кореляційний аналіз показав, що за умов хронічного токсичного гепатиту найбільш тісні та достовірні асоціативні зв'язки існують між рівнем TGF-β в сироватці крові та вмістом вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Отримані дані засвідчують важливу роль TGF-β-опосередкованого сигнального шляху в механізмах індукції фіброгенезу в печінці й нирках за умов сумісного застосування токсикантів тетрахлорметану та етанолу. Поряд з цим сильний та достовірний кореляційний зв'язок між вказаними параметрами виявлявся у групі тварин з хронічним токсичним гепатитом, які отримували лікування лізиноприлом, що може свідчити про причетність сигнального шляху, опосередкованого цитокіном TGF-β, до механізмів антифіброгенної дії досліджуваного інгібітору АПФ.

В останні роки увага багатьох дослідників прикута до вивчення дії IGF-1, який відіграє важливу роль в механізмах ушкодження та регенерації тканин печінки. Це один із найбільш досліджуваних цитокінів у XXI столітті, його роль досліджена в патогенезі захворювань печінки, серцево-судинної системи, метаболічного синдрому, тощо [43, 51, 70, 289]. У печінці IGF-1 контролює тканинний ріст, диференціацію та проліферацію гепатоцитів, ліпідний метаболізм, чинить антиоксидантні і цитопротекторні ефекти, запобігає

мітохондріальній дисфункції [53, 114, 177]. Патогенна дія токсичних факторів призводить до порушення функції печінки, що може негативно впливати на рівень IGF-1 у крові, проте відомості про механізми впливу цього фактору на гепатоцити обмежені та суперечливі [138, 176, 232]. Відомо, що гепатоцити починають секретувати IGF-1 у відповідь на запалення, адже цей цитокін пригнічує запальну відповідь, шляхом зменшення макрофагальної інфільтрації, знижує оксидативний стрес, а також пригнічує апоптоз паренхіматозних клітин та ендотеліоцитів [25, 94, 112, 198, 312]. У літературі показано, що IGF-1 володіє протизапальними та гепатопротекторними властивостями [205, 208], а також сприяє прискоренню регенерації тканин при ушкодженні [117, 138]. Однак, існують протилежні дані - тривале і неконтрольоване збільшення рівня IGF-1 може мати значення в патогенезі цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми [109, 211]. Існують також суперечливі дані щодо змін сироваткового рівня IGF-1 при різних типах гепатитів. За результатами одних досліджень за токсичних уражень печінки реєструвалось збільшення концентрації IGF-1, що асоціювалось з розвитком фіброзу печінки [3, 78, 127, 220, 294]. У той же час інші автори документували, що при хронічному алкогольному ураженні печінки та неалкогольному ураженні печінки відмічали зменшення концентрації IGF-1 у сироватці крові [43, 70, 242, 273.]. Отже, динаміка зміни концентрації IGF-1 ймовірно залежить від етіології гепатиту та тривалості патологічного процесу.

Дотепер невідомо, як змінюється рівень IGF-1 в сироватці крові за дії токсикантів тетрахлорметану та етанолу, а також на тлі медикаментозної корекції лізиноприлом та L-аргініном L-глутаматом, що і стало предметом подальшого дослідження (рис. 3.6-3.7, табл. 3.6).

З’ясувалось, що токсичне ураження печінки тетрахлорметаном та етанолом супроводжувалось вірогідним зростанням середнього показника рівня IGF-1 в сироватці крові на 13,7% ($p<0,001$), відносно такого показника в контрольній групі тварин.

Застосована терапія приблизно з однаковою ефективністю коригувала сироваткові рівні IGF-1 за хронічного токсичного гепатиту. За умов використання лізиноприлу середні показники вмісту IGF-1 в сироватці крові були на 12,1% меншим ($p<0,01$), порівняно з групою нелікованих тварин. Референс-препарат L-аргінін L-глутамат за здатністю коригувати рівень IGF-1 співставлявся з лізиноприлом. У групі «Хронічний токсичний гепатит + L-аргінін L-глутамат» середній показник вмісту IGF-1 в сироватці крові був на 16,8% меншим ($p<0,01$), порівняно з групою нелікованих тварин.

Далі нами проведено кореляційний аналіз взаємозв'язків між рівнем IGF-1 та вмістом фракцій гідроксипроліну в сироватці крові, печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту і на тлі лікування лізиноприлом. Виявилось, що за умов хронічного токсичного гепатиту зростання сироваткового вмісту IGF-1 найбільш тісно та вірогідно асоціюється зі збільшенням рівня вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Вказані дані підтверджують важливу роль сигнального шляху, асоційованого з IGF-1, у механізмах розвитку фіброзу печінки та нирок за використання тетрахлорметану та етанолу.

На основі проведеного кореляційного аналізу також встановлено, що зменшення вмісту IGF-1 в сироватці крові у групі тварин, лікованих лізиноприлом, тісно асоціюється зі зниженням рівня вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові. Отримані дані можуть засвідчувати роль IGF-1-сигнального шляху в механізмах антифіброгенної дії лізиноприлу.

Результати проведених досліджень засвідчують, що введення тетрахлорметану та етанолу викликають порушення метаболізму колагену та розвиток фіброзу печінки й нирок. За цих умов важливу роль в механізмах ініціації фіброгенезу належить сигнальним шляхам, які опосередковуються через цитокіни TGF-β та IGF-1.

Використання інгібітору АПФ лізиноприлу за хронічного токсичного гепатиту виявляє потужний антифіброгенний потенціал в печінці та нирках, що асоціюється з його впливом на систему цитокінів TGF-β та IGF-1. У той же

час, антифіброгенна дія референс-препарату L-аргініну L-глутамату значно поступається лізиноприлу.

На третьому етапі досліджено показники клітинного циклу, фрагментації та плоїдності ядерної ДНК у печінці й нирках щурів за хронічного токсичного гепатиту та введенні лізиноприлу і L-аргініну L-глутамату (розділ 4).

Спершу нами досліджено плоїдність ДНК в ядрах клітин печінки (рис. 4.1). Так, в контрольній групі тварин переважає частка ядер клітин з диплоїдним набором: частка клітин з набором хромосом 2c коливається в межах 69,0-82,8% (P_5-P_{95}), медіана становить 77,7%. У той же час, частка ядер клітин з набором хромосом 4c перебуває в межах 12,3-25,3%, медіана дорівнює 17,2%. Найменша кількість ядер клітин містять число хромосом 8c та більше: показник медіани становить 5,91%. Такий розподіл клітин з різним набором хромосом є закономірним явищем, адже саме клітини з диплоїдним набором хромосом забезпечують виконання фізіологічних функцій, активно вступають в клітинний цикл і мають високу здатність до регенерації [59, 68, 210, 225].

Хронічний токсичний гепатит, індукований тетрахлорметаном та етанолом, викликає перерозподіл клітин з різним набором хромосом: вірогідно зменшується частка ядер клітин з диплоїдним набором на 12,3% ($p<0,001$) та зростає частка ядер з наборами хромосом 4c, ≥8c відповідно на 21,7 та 51,6% ($p<0,05$), порівняно з контрольною групою тварин. За цих умов зменшення числа ядер клітин з диплоїдним набором хромосом є наслідком цитотоксичної дії тетрахлорметану та етанолу, тоді як зростання числа ядер клітин з поліплоїдним набором хромосом ймовірно є компенсаторним процесом у відповідь на пошкодження і забезпечує до певної міри регенерацію ушкодженого органу [59, 68].

Проведений кореляційний аналіз показав, що у групі тварин з ХТГ зменшення частки ядер клітин з диплоїдним набором достовірно корелюють зі збільшенням рівнів TGF-β й IGF-1 в сироватці крові ($r=-(0,62-0,68)$, $p<0,05$).

Поряд з цим зростання числа ядер клітин з набором хромосом 4с вірогідно та прямо корелюють з сироватковим рівнем досліджуваних цитокінів (r=0,56-0,59), p<0,05). Отримані дані засвідчують причетність сигнальних шляхів, асоційованих з TGF-β й IGF-1, до розвитку поліплоїдії у клітинах печінки щурів за хронічного токсичного гепатиту.

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту викликала зменшення ступеня поліплоїдії, однак ефективність залежала від обраного препарату. Введення лізиноприлу мало найбільшу ефективність щодо зменшення ступеня поліплоїдії. У групі тварин «ХТГ + лізиноприл» частка ядер клітин з диплоїдним набором хромосом було на 18,0% більшим (p<0,001), ніж у нелікованих щурів. Поряд з цим частки ядер клітин з наборами хромосом 4с та ≥8с були відповідно на 37 та 29,1% меншими (p<0,01), порівняно з нелікованими тваринами, та вірогідно не відрізнялись від показників контрольної групи тварин.

На основі проведеного кореляційного аналізу з'ясовано, що зменшення сироваткового рівня TGF-β й IGF-1 достовірно корелюють зі зростанням числа диплоїдних клітин в печінці (r=-(0,57-0,60), p<0,05) та зменшенням частки поліплоїдних клітин (r=0,56-0,57, p<0,05), що засвідчує про роль вказаних сигнальних шляхів у механізмах цитопротекторної дії лізиноприлу.

Застосування референс-препарату L-аргініну L-глутамату поступалось лізиноприлу за ефективністю зменшувати ступінь поліплоїдії на тлі хронічного токсичного гепатиту. В групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» частка ядер клітин з диплоїдним набором хромосом було на 11,2% більшим (p<0,01), ніж у нелікованих щурів. В той же час частка ядер клітин з наборами хромосом 4с та ≥8с були відповідно на 19,6 та 19,8% меншими (p<0,01), порівняно з нелікованими тваринами. У тварин, лікованих L-аргініном L-глутаматом частка клітин з набором хромосом 2с була достовірно меншою, а частки клітин з наборами хромосом 4с та ≥8с були вірогідно меншими, порівняно з такими у групі щурів, які отримували лізиноприл, а також вірогідно не відрізнялись від показників контрольної групи тварин

Далі ми оцінили показники клітинного циклу в печінці та кірковій речовині нирок за хронічного токсичного гепатиту та на тлі корекції лізиноприлом та референс-препаратом (табл. 4.2; 4.5).

Введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликало протилежні зміни показників клітинного циклу в печінці та нирках щурів (табл. 4.2, рис. 4.2-4.4). За цих умов у печінці відмічалось вірогідне зменшення на 8,5% ($p<0,01$) відносної кількості клітин у фазі G0G1 порівняно з контролем, що ймовірно є наслідком альтерації високоспеціалізованих гепатоцитів на тлі дії токсикантів та мобілізації резервів з фази G0 для забезпечення регенерації. Поряд з цим реєструвалось статистично достовірне зростання на 72,2% ($p<0,01$) відносного числа клітин у фазі S та на 27,1% ($p<0,01$) частки клітин у фазі G2M, що є свідченням більш активної поліплоїдизації та проліферації клітин печінки. У той же час, у нирках відмічалось достовірне зростання на 10,2% ($p<0,01$) відносної кількості клітин у фазі G0G1 та зниження на 55,9% ($p<0,01$) відносного числа клітин у фазі S та на 52,4% ($p<0,01$) частки клітин у фазі G2M, порівняно з контролем. Отримані дані засвідчують, що за хронічного токсичного гепатиту реєструється зниження активності проліферації клітин нирок.

Застосовані лікарські препарати з різною ефективністю коригували індуковані хронічним токсичним гепатитом зміни показників клітинного циклу в печінці та нирках. У печінці найвищу ефективність показав лізиноприл, а препарат порівняння L-аргінін L-глутамат значно поступався йому. Так, у групі тварин «ХТГ + лізиноприл» реєструвалось вірогідне зростання частки клітин у фазі G0G1 на 17,3% ($p<0,01$) та достовірне зменшення частки клітин у фазах S та G2M відповідно на 40,7 та 43,7% ($p<0,01$), порівняно з показниками у нелікованих тварин. У той же час у групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» відмічалось вірогідне зростання частки клітин у фазі G0G1 на 6,63% ($p<0,01$) та достовірне зменшення частки клітин у фазах S та G2M відповідно на 34,3 та 15,8% ($p<0,01$), порівняно з показниками у нелікованих тварин. Поряд з цим у тварин, лікованих L-

аргініном L-глутаматом показник відносної кількості клітин у фазі G0G1 був вірогідно меншим, а у фазах S та G2M – достовірно більшим, порівняно з такими показниками у тварин, які отримували лізиноприл.

У нирках застосовані лікарські препарати мали практично однакову ефективність, однак спрямованість змін була протилежною до такої в печінці. У тварин, лікованих лізиноприлом, реєструвалось вірогідне зменшення частки клітин у фазі G0G1 на 9,6% ($p<0,01$) та достовірне збільшення частки клітин у фазах S (на 27,6%, $p<0,01$) та G2M (у 2,5 рази, $p<0,01$), порівняно з показниками у нелікованих тварин. У групі тварин «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» відмічалось вірогідне зниження частки клітин у фазі G0G1 на 10,8% ($p<0,01$) та достовірне збільшення частки клітин у фазах S (на 16,5%, $p<0,01$) та G2M (у 2,7 рази, $p<0,01$), порівняно з показниками у нелікованих тварин.

З'ясувалось, що введення токсикантів тетрахлорметану та етанолу викликали протилежні зміни проліферативної активності клітин печінки та нирок, про що доказово свідчили зміни показника індексу проліферації (рис. 4.5, 4.10; табл. 4.3, 4.6).

Моделювання хронічного токсичного гепатиту супроводжувалось індукцією проліферації клітин печінки: індекс проліферації був вірогідно більшим на 31,3% ($p<0,001$), відносно середнього показника контрольної групи. Кореляційний аналіз засвідчив, що важливу роль в посиленні проліферації клітин печінки відіграють TGF-β та IGF-1 (між індексом проліферації та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - $r=0,60$-$0,68$, $p<0,05$). У той же час, у нирках відмічались протилежно спрямовані зміни. За хронічного токсичного гепатиту реєструвалось пригнічення проліферації клітин кіркової речовини нирок: індекс проліферації був вірогідно меншим на 53,1% ($p<0,001$), відносно показника контрольної групи. За результатами кореляційного аналізу показано, що пригнічення процесів проліферації клітин нирок асоціюється зі збільшенням сироваткового рівня TGF-β та IGF-1 (між індексом проліферації

та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні обернені кореляції - r=-(0,56-0,59), p<0,05).

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту мала різновекторний вплив на процеси проліферації в печінці та нирках. В печінці лізиноприл та препарат порівняння виявляли антипроліферативний ефект, причому у лізиноприлу він був більш виразним. У групі «ХТГ + лізиноприл» індекс проліферації був на 25,6% меншим (p<0,001), ніж у нелікованих тварин. Антипроліферативна дія лізиноприлу асоціювалась з впливом на сигнальні системи цитокінів TGF-β та IGF-1, про що доказово свідчать результати кореляційного аналізу (між рівнем цитокінів та індексом проліферації виникають достовірні кореляції - r=0,57-0,67, p<0,05).

У групі «ХТГ + L-аргінін L-глутамат» індекс проліферації був на 18,1% меншим (p<0,001), ніж у нелікованих тварин, але статистично вірогідно перевищував такий показник у тварин, лікованих лізиноприлом та достовірно не відрізнявся від показника в групі контролю.

У нирках лізиноприл та препарат порівняння стимулювали проліферацію, причому їх ефективність була співставною. У тварин, яким вводили лізиноприл, індекс проліферації був у 2,26 рази більшим (p<0,001), ніж у нелікованих тварин. Здатність лізиноприлу посилювати проліферацію клітин кіркової речовини нирок тісно супряжено з впливом на сигнальні системи цитокінів TGF-β та IGF-1, про що доказово свідчать результати кореляційного аналізу (між рівнем цитокінів та індексом проліферації виникають достовірні обернені кореляції - r=-(0,55-0,60), p<0,05).

Застосування L-аргініну L-глутамату для лікування хронічного токсичного гепатиту асоціювалось зі зростанням індексу проліферації у 2,42 рази (p<0,001), порівняно з нелікованими тваринами. За цих умов індекс проліферації вірогідно не відрізнявся від такого у тварин, лікованих лізиноприлом.

У подальшому нами досліджені зміни апоптотичної активності клітин печінки та нирок за хронічного токсичного гепатиту та на тлі корекції

лізиноприлом та референс-препаратом (рис. 4.6, 4.11, табл. 4.4, 4.7). Активність апоптозу оцінювали за відсотком ядер із субдиплоїдним набором ДНК, тобто числом ядер клітин, які знаходяться у фазі SUB-G0G1 [50, 58].

У тварин з моделлю хронічного токсичного гепатиту реєструвалось посилення апоптозу гепатоцитів: частка клітин в фазі SUB-G0G1 була вірогідно більшою на 76,4% ($p<0,001$), відносно середнього показника контрольної групи. Поряд з цим відмічалась індукція апоптозу клітин кіркової речовини нирок: частка клітин в фазі SUB-G0G1 була вірогідно більшою на 36,5% ($p<0,001$), відносно середнього показника контрольної групи. Кореляційний аналіз надав докази причетності цитокінів TGF-β та IGF-1 в індукції апоптозу гепатоцитів та клітин нирок: між рівнем цитокінів у сироватці крові та часткою клітин з фрагментованою ДНК в печінці та нирках виникали достовірні прямі кореляції - $r=0,70-0,78$, $p<0,01$)

Застосована терапія мала різний вплив на активність апоптозу гепатоцитів за хронічного токсичного гепатиту, що залежало від обраного препарату. Використання лізиноприлу виявляло потужну антиапоптотичну дію в печінці та нирках: середній показник частки клітин у фазі SUB-G0G1 був вірогідно меншим відповідно на 33,1 та 14,5% ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами. Антиапоптотична дія лізиноприлу асоціюється з впливом на системи цитокінів TGF-β та IGF-1 (між часткою клітин з фрагментованою ДНК в печінці й нирках та рівнем цитокінів у сироватці крові виникали достовірні прямі кореляції - $r=0,61-0,73$, $p<0,01$).

Застосування L-аргініну L-глутамату не впливало на активність апоптозу гепатоцитів та клітин кіркової речовини нирок: середній показник частки клітин з фрагментованою ДНК вірогідно не відрізнявся від такого у нелікованих тварин та був вірогідно вищим по відношенню до показника контрольної групи.

Проведені дослідження засвідчують, що за умов хронічного токсичного гепатиту реєструється збільшення плоїдності ДНК ядер клітин печінки, індукція апоптозу гепатоцитів та клітин кіркової речовини нирок,

зростання індексу проліферації клітин печінки та його зменшення в клітинах нирок, що асоціюється зі зростанням рівнів TGF-β та IGF-1 у сироватці крові. Використання лізиноприлу за цих умов виявляє потужну антиапоптотичну дію, зменшує ступінь поліплоїдії клітин печінки, виявляє антипроліферативну активність у печінці і навпаки посилює проліферацію клітин нирок, що супряжено зі зниженням сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1. Препарат порівняння L-аргінін L-глутамат вірогідно не впливає на процеси апоптозу гепатоцитів та клітин нирок, співставляється з лізиноприлом за здатністю стимулювати проліферацію клітин нирок, а також поступається лізиноприлу за антипроліферативною дією в печінці та здатністю зменшувати ступінь поліплоїдії клітин печінки.

На четвертому етапі вивчено морфологічні зміни тканин печінки й нирок щурів за хронічного токсичного гепатиту та при введенні лізиноприлу і L-аргініну L-глутамату (розділ 5).

Встановлено, що за умов експериментального хронічного токсичного гепатиту в тканині печінки та нирок щурів при гістологічному дослідженні спостерігали розвиток компенсаторно-адаптаційних та деструктивних змін. Характерним було порушення часточкової будови печінки, балкового впорядкування гепатоцитів, розвиток їх вакуольної дистрофії, наявність фокальних некрозів. Крім того, ядра клітин органу володіли подекуди ознаками каріолізису та каріопікнозу. Виявляли апоптотичні тільця Каунсільмена та скупчення алкогольного гіаліну всередині клітин і екстрацелюлярно. При даному змодельованому патологічному процесі в печінці відмічали гістіо-лейкоцитарну інфільтрацію та перипортальний фіброз. Слід зазначити, що фіксували ураження стінок кровоносних судин, зокрема, синусоїдних капілярів і центральних вен. Морфологічні зміни тканин печінки за експериментального токсичного гепатиту не протирічать даним літератури [4, 89, 147].

У нирках експериментальних щурів виявлені зміни як гломерулярного, так і канальцевого апаратів органу. Так, ниркові тільця були

гіпертрофованими, капіляри судинних клубочків мали ознаки пошкодження їх ендотеліального вистилення і базальних мембран, а зовнішній та внутрішній листки капсули Боумена зазнавали деструкції. У нирках також спостерігали розвиток запального процесу, що морфологічно проявлявся у вигляді вираженої гістіо-лейкоцитарної інфільтрації, особливо в ділянках навколо зовнішньої стінки капсули клубочка. Важливими знахідками були гломерулосклероз та фрагментація ниркових тілець. Значні зміни виявлено і в канальцях нефронів. Епітеліоцити їх мали прояви дистрофії, часто з десквамацією в просвіт трубочок нефронів. На окремих гістологічних препаратах відмічали явища тубулорексису і тубулонекрозу, геморагічного просочування стінок канальців, іноді їх руйнування. Просвіти канальців нефронів при цьому були заповнені клітинним детритом, фібрином, циліндрами або форменими елементами крові. Виявлені структурні зміни в нирках за даної патології знаходять підтвердження у літературі [66, 105].

Медикаментозна корекція хронічного токсичного гепатиту лізиноприлом асоціювалась з позитивними морфологічними змінами структури як печінки, так і нирок. Зокрема, в печінці спостерігали відновлення радіального розміщення печінкових балок, зменшення проявів вакуольної дистрофії гепатоцитів, зростання чисельності двоядерних клітин та гепатоцитів з високим ядерно-цитоплазматичним індексом, що носить сприятливий прогностичний характер відносно регенерації. У кірковій речовині нирок дослідних тварин за корекції лізиноприлом встановлено відсутність ознак деструкції стінок капсули клубочка та ендотеліального шару і базальних мембран капілярів судинних клубочків. Ниркові тільця зменшувались в розмірах, сечові простори їх були не розширені. Рідше зустрічались епітеліоцити канальців нефронів з явищами їх дистрофії. Вони також, як і гепатоцити, володіли високим ядерно-цитоплазматичним індексом і значним потенціалом до відновлення.

Застосування в якості медикаментозної корекції L-аргініну L-глутамату у тварин з хронічним токсичним гепатитом не призводило до появи

яскраво виражених покращень структурної організації тканини печінки та нирок. Необхідно відмітити, що при введені даного препарату виявлено лише часткове відновлення радіальної структури печінкових балок в перипортальних зонах. В кірковій речовині нирок при морфологічному дослідженні спостерігали незначне зменшення проявів деструкції листків капсули Боумена, дистрофічних змін мезангіоцитів і подоцитів. Характерною була проліферація елементів сполучної тканини і розростання строми органу, що можливо є наслідком початку відновних процесів у відповідь на дію пошкоджуючого фактору.

За результатами власних досліджень та даних літератури складено схему (рис. 6.1) на якій показані деякі молекулярні механізми, через які опосередковується пошкоджуючий вплив тетрахлорметану та етанолу на печінку й нирки, а також мішені гепато- та нефропротекторної дії лізиноприлу.

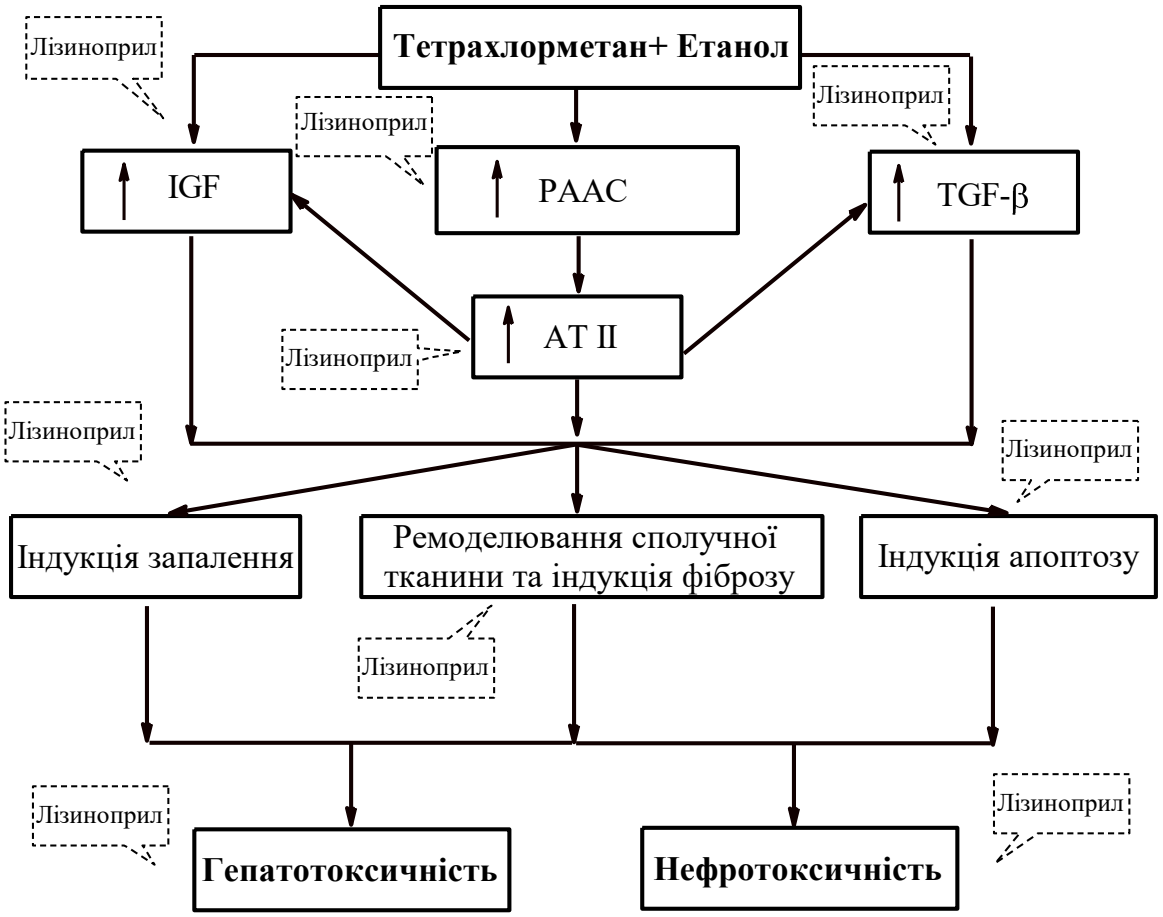

Рис. 6.1 Деякі молекулярні механізми ураження печінки та нирок за введення тетрахлорметану й етанолу. Мішені терапевтичної дії лізиноприлу.

Таким чином, проведені дослідження розширюють існуючі уявлення щодо механізмів ушкодження та регенерації тканин печінки та нирок за дії токсикантів тетрахлорметану та етанолу, а саме показано роль сигнальних систем, асоційованих з цитокінами TGF-β та IGF-1. Поряд з цим у роботі патогенетично обґрунтовано та морфологічно доведено доцільність використання лізиноприлу з метою корекції пошкоджень печінки та нирок за умов хронічного отруєння тетрахлорметаном та етанолом.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і вирішення актуального наукового завдання, яке полягало у встановленні механізмів пошкодження та регенерації тканин печінки й нирок щурів за хронічного токсичного ураження тетрахлорметаном й етанолом та обґрунтуванні доцільності використання лізиноприлу з метою гепато- та нефропротекції.

1. Введення тетрахлорметану й етанолу викликає порушення обміну колагену та розвиток фіброзу печінки й нирок, про що доказово свідчить вірогідне зростання вмісту вільного гідроксипроліну (на 23,3-52,7% в печінці, нирках та сироватці крові, $p<0,05$), пептидозв'язаного гідроксипроліну (на 17,4% в сироватці крові, $p<0,05$) та загального гідроксипроліну (на 23,8% сироватці крові, $p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи тварин. За цих умов застосування інгібітору ангіотензинперетворюючого ферменту лізиноприлу виявляє антифіброгенну дію в печінці та нирках (вміст вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові на 18,2-24,7% менший, порівняно з нелікованими тваринами, $p<0,05$), яка перевищує таку в L-аргініну L-глутамату.

2. Хронічний токсичний гепатит супроводжується вірогідним зростанням вмісту TGF-β та IGF-1 в сироватці крові (в середньому на 13-14%, $p<0,05$), порівняно з показниками контрольної групи. Рівні TGF-β та IGF-1 в сироватці крові достовірно та прямо корелюють з маркерами фіброзу - вмістом вільного гідроксипроліну в печінці, нирках та сироватці крові ($r=0,55-0,82$, $p<0,05$). Введення лізиноприлу за хронічного токсичного гепатиту викликає достовірне зниження сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1 ($p<0,05$), порівняно з нелікованими тваринами, що асоціюється зі зменшенням виразності фіброзу в печінці та нирках ($r=0,58-0,78$, $p<0,05$). Референс-препарат L-аргінін L-

глутамат поступається лізиноприлу за здатністю коригувати рівень TGF-β в сироватці крові щурів за хронічного токсичного гепатиту.

3. За умов хронічного токсичного гепатиту реєструється збільшення плоїдності ДНК ядер клітин печінки (вірогідно зменшується на 12,3% частка клітин з набором хромосом 2c та зростає на 21,7-51,6% з наборами хромосом 4c та ≥8c), індукція апоптозу гепатоцитів та клітин кіркової речовини нирок (зростає частка клітин в фазі SUB-G0G1 відповідно на 76,4 та 36,5%, $p<0,001$), зростання індексу проліферації клітин печінки (на 31,3%, $p<0,001$) та його зменшення в клітинах нирок (на 53,1%, $p<0,001$), що асоціюється зі зростанням рівнів TGF-β та IGF-1 в сироватці крові ($|r|=0,56-0,78$, $p<0,05$). Використання лізиноприлу за цих умов виявляє потужну антиапоптотичну дію, зменшує ступінь поліплоїдії клітин печінки, виявляє антипроліферативну активність в печінці і навпаки посилює проліферацію клітин нирок, що супряжено зі зниженням сироваткових рівнів TGF-β та IGF-1 ($|r|=0,55-0,73$, $p<0,05$). Референс-препарат L-аргінін L-глутамат вірогідно не впливає на процеси апоптозу гепатоцитів та клітин нирок, співставляється з лізиноприлом за здатністю стимулювати проліферацію клітин нирок, а також поступається лізиноприлу за антипроліферативною дією в печінці та здатністю зменшувати ступінь поліплоїдії клітин печінки.

4. Тривале введення токсикантів тетрахлорметану й етанолу викликає виразні структурні зміни в тканинках печінки та нирок: у печінці реєструються ознаки запалення, перипортальний фіброз, вакуольна дистрофія, апоптоз та некроз гепатоцитів, ураження стінок кровоносних судин; в нирках відмічається пошкодження ендотелію та базальної мембрани капілярів клубочків, розвиток гломерулосклерозу та запалення. За цих умов застосування лізиноприлу супроводжується значним зменшенням запального процесу в печінці та нирках, збільшенням плоїдності гепатоцитів, менш виразним перипортальним фіброзом та гломерулосклерозом, а також чинить ендотеліопротекторну дію. Референс-препарат L-аргінін L-глутамат значно поступався лізиноприлу за гепато- та нефропротекторною дією.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Анацкая, О. В., & Виноградов, А. Е. (2008). Полиплоидия в серце: защита и слабость. *Химия и жизнь, 9,* 34-37.

2. Бабак, О. Я., & Кравченко, Н. А. (2005). Роль ренинангиотензиновой системы в ремоделировании сердца и сосудов. *Український терапевтичний журнал, 2,* 89-97.

3. Бабак, О. Я., Колесникова, Е. В., & Кравченко, Н. А. (2009). Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения. *Сучасна гастроентерологія, 2,* 5-17.

4. Байгильдин, С. С., Каримов, Д. О., Хуснутдинова, Н. Ю., Смолянкин, Д. А., & Репина, Э. Ф. (2018). Морфология печени крыс через 72 часа после воздействия тетрахлорметана. *Медицина труда и екологии человека, 4,* 143-149.

5. Белобородова, Е. В., Белобородова, Э. И., & Акбашева, О. Е. (2010а). 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, 30*(2), 94-100.

6. Белобородова, Е. В., Белобородова, Э. И., & Акбашева, О. Е. (2010б). Показатели системы протеолиза и метаболизма коллагена при хроническом течении заболеваний печени вирусной и токсической этиологии. *Терапевтический архив, 2,* 29.

7. Береговенко, Ю. М., & Рикало, Н. А. (2014). Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки. *Вісник Вінницького національного медичного університету, 18*(2), 632-635.

8. Березенко, В. С. (2007). *Клініко-патогенетичні особливості фіброгенезу печінки при хронічних гепатитах у дітей та шляхи його медикаментозної*

корекції. (Дис. докт. мед. наук). Ін-т педіатрії, акушерства і гінекології АМН України, Київ.

9. Березовський, В. Я., Янко, Р. В., & Літовка, І. Г. (2008). Физиологическая регенерация паренхими печени крыс молодого возраста при ограниченном питании и последующем восстановлении пищевого рациона. *Український морфологічний альманах, 6*(4), 7-10.

10. Вірстюк, Н. Г., & Черкашина, О. Ю. (2015). Вплив глутаргіну на функціональний стан печінки у хворих на хронічну серцеву недостатність. *Галицький медичний журнал, 22*(4), 68-71.

11. Гаврилюк, А. О., Харченко, Н. В., & Ліщишина, О. М. (2016). Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) третинної (високоспеціалізованної) медичної допомоги «Цироз печінки та його ускладнення» (проєкт), 2016 р.

12. Горелова, И. С., Скляр, Л. Ф., & Маркелова, Е. В. (2014). Сывороточные показатели семейства трансформирующего фактора роста-β у пациентов с фиброзом печени при HCV-инфекции. *Фундаментальные исследования, 7/4,* 671-4.

13. Гумінська, О. Ю. (2014). Морфологічні зміни тимуса статевонезрілих щурів з хронічним медикаментозним гепатитом, їх звязок з рівнем трансформуючого фактору росту b-1, корекція антралем та квертином. *Вісник морфології, 20*(2), 309-314.

14. Дворщенко, К. О., Берник, О. О., Драницина, А. С., Сенін, С. А., & Остапченко, Л. І. (2013). Вплив окисного стресу на рівень експресії генів TGFB1 і HGF у печінці щурів в умовах тривалої шлункової гіпохлоргідрії та за введення мультипробіотика Симбітер. *Український біохімічний журнал, 85*(5), 114-23.

15. Дзяк, Г. В., Ханюков, А. А., Писаревская, О. В., & Люлька, Ю. П. (2009). Актуальные вопросы антигипертензивной терапии. Рациональный выбор препаратов: ингибиторы АПФ, диуретики, комбинированные препараты. *Укр. мед. часопис, 1*(69), 17-25.

16. Діденко, В. І., Кленіна, І. А., Татарчук, О. М., Коненко, І. С., & Петішко, О. П. (2020). Діагностичні маркери прогресування фіброзних змін печінки у пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки алкогольного генезу. *Вісник медичних і біологічних досліджень, 3*(5), 47-52. DOI: 10.11603/bmbr.2706-6290.2020.3.11295

17. Добреля, Н. В., Бойцова, Л. В., & Данова, І. В. (2015). Правова база для проведення етичної експертизи доклінічних досліджень лікарських засобів з використанням лабораторних тварин. *Фармакологія та лікарська токсикологія, 2,* 95-100.

18. Довженко, М. М., Базилевич, А. Я., Волошенюк, І. О. Конопляник, Л. А., & Лимар, В. Ю. (2011). Констиляція ішемічної хвороби серця і неалкогольної жирової хвороби печінки: питання патогенезу. *Новости медицины и фармации. Кардиология, 368.* http://www.mif-ua.com/archive/article/17732

19. Драпкина, О. М., & Тутнов, Д. А. (2008). Особенности лечения артериальной гипертензии у больных с заболеваниями печени. *Рос. мед. вести, 3*(XIII), 43-48.

20. Ефремова, Н. А., Горячева, Л. Г., Рогозина, О. Н., Алексеева, Бессонова, Т. В., & Коти, М. Я. (2011). Особенности течения и исходы неонатальных гепатитов различной этиологии. *Журнал инфектологии, 3*(4), 73-75.

21. Журавльова, Л. В., & Огнєва, О. В. (2012). Вплив інсуліноподібного фактору росту-1 на функціональний стан печінки у хворих з коморбідною патологією. (с. 83). В *Мультидисциплінарний підхід – ключ до успішної терапевтичної науки та практики,* Матеріали науково-практичної конференції. Харків: ДУ "Інститут терапії імені Л. Т. Малої НАМН України", Харківський національний медичний університет.

22. Задорожня, І. В., Дрегваль, І. В., & Руденко, А. І. (2016). Вплив інгібіторів NO-синтетази на кровонаповнення печінки в умовах алкогольної інтоксикації. *Молодий вчений, 1*(28(3)), 26-29.

23. Залесский, В. Н., & Великая, Н. В. (2002). Механизмы апоптоза при заболеваниях печени (обзор). *Сучасні проблеми токсикології, 4,* 27-32.

24. Зінчук, О. М., Ворожбит, О. Б., Герасун, О. Б., Задорожний, А. М., & Прикуда, Н. М. (2018). Актуальні аспекти діагностики гепаторенального синдрому у хворих на цироз печінки. *Гепатологія, 41*(3), 13-21.

25. Ивкова, А. Н., Ильченко, Л. Ю., Кушлинский, Н. Е., Петренко, Н. В., & Сторожаков, Г. И. (2008). Факторы роста в оценке фиброза печени у больных хроническим гепатитом С. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 5,* 42-47.

26. Іпатов, А. В., Гондуленко, Н. О., Паніна, С. С., Саніна, Н. А., & Ігумнова, Т. С. (2016). Динаміка первинної інвалідності дорослого населення та населення працездатного віку внаслідок цирозу печінки упродовж 2013-2015 років в Україні. *Український вісник медико-соціальної експертизи*, *4*(22), 4-10. http://nbuv.gov.ua/UJRN/ujmse_2016_4_4

27. Каркищенко, Н. Н., & Грачев, С. В. (2010). *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях.* М.: Профиль.

28. Квасницька, О. Б. (2017). Досвід використання інгібітора ангіотензинперетворюючого ферменту в корекції ренальної дисфункції у хворих на хронічний гепатит. *Актуальні проблеми траспортної медицини, 3*(49), 63-68.

29. Квасницька, О. Б., & Гоженко, А. І. (2015). Стан функціонального ниркового резерву, як ранній критерій гепаторенального синдрому у хворих на цироз печінки. *Актуальні проблеми транспортної медицини, 3*(2/41-II), 70-73. http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/136672

30. Квасницька, О. Б., & Гоженко, А. І. (2016). Можливості фармакологічної корекції ренальної дисфункції у хворих на декомпенсований цироз печінки. *Актуальні проблеми транспортної медицини, 2*(44), 109-113.

31. Коваленко, В. М., Лутай, М. І., & Сіренко, Ю. М. (2007). *Серцево-судинні захворювання. Класифікація, стандарти діагностики та лікування.* Київ: Бізнес Поліграф.

32. Колеснікова, О. В. (2019). Погляд на фіброз печінки у світлі розуміння сучасних механізмів його розвитку. *Гастроентерологія, 53*(2), 67-76.

33. Косых, А. А. (2007). Гидроксипролиновый показатель крови как критерий активности хронических заболиваний печени у детей. *Успехи современного естествознания, 6,* 67-69.

34. Крилова, О. О. (2016). Зміни показників системи імунітету, медіаторів запалення, фіброзування та каменеутворення в динаміці лікування хворих на хронічний панкреатит. *Вестник Клуба панкреотологов, 4,* 43-49.

35. Лимар, Л. Є. (2015). Морфофункціональний стан печінки у статевонезрілих самок білих щурів за умов експериментального токсичного гепатиту. *Медична та клінічна хімія, 17*(2), 73-76.

36. Магомедов, С., Фіщенко, Я. В., & Поліщук, Л. В. (2010). Порушення обміну сполучної тканини у хворих на синдром Марфана. *Вісник ортопедії, травматології та протезування, 4,* 39-41.

37. Манжалій, А. Г., & Никула, Т. Д. (2017). Гепаторенальний синдром у хвороби з цирозом: питання діагностики та лікування. *Актуальні проблеми нефрології, 4,* 35-45.

38. Мансуров, Х.Х., Мироутов, Г. К., & Ладная, М. М. (1981). Метаболизм коллагена в печени при хронических дифузных ее поражениях. *Успехи гепатологии, сборник научных статей, 9,* 25-38.

39. Мармоза, А. Т. (2013). *Теорія статистики: підручник.* К.: Центр учбової літератури.

40. Мехтиев, С. Н., Степаненко, В. В., Зиновьева, Е. Н., & Мехтиева, О. А. (2014). Современные представления о фиброзе печени и методах его коррекции. *Фарматека, 6*(279), 80-7.

41. Мороз, В. М. & Рикало, Н. А. (2010). Поліплоїдія гепатоцитів у статевонезрілих щурів при хронічному токсичному гепатиті, медикаментозна корекція. *Загальна патологія та патологічна фізіологія, 1,* 61-72.

42. Нагимуллин, Р. Р., Устимов, Д. Ю., Давыдова, В. Р., & Шипулин, Ф. А. (2017). Диагностические критерии гепаторенального синдрома и современные

методы терапии. Раны и раневые инфекции. *Журнал имени проф. Б.М. Костючёнка, 4*(2), 6-11. https://doi.org/10.17650/2408-9613-2017-4-2-6-11

43. Некрут, Д. О., Заічко, Н. В., & Струтинська, О. Б. (2017). Рівень інсуліноподібного фактору росту-1 та гідрогенсульфіду у щурів із неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою із гіпергомоцистеїнемією. *Медична та клінічна хімія, 1,* 40-46. https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i1.7501

44. Никифорук, А. Я., Фіра, Л. С., & Лихацький, П. Г. (2018). Дослідження антиоксидантних властивостей екстракту зі шпинату городнього листя на моделі тетрахлорметанового ураження печінки. *Медична та клінічна хімія, 20*(4), 36-43. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2018.v0.i4.9787

45. Олещук, О. М. (2013). Експериментальне обгрунтування застосування попередників синтезу оксиду азоту при ішемії-реперфузії печінки. *Шпитальна хірургія. Журнал імені Л. Я. Ковальчука, 4,* 42-47.

46. Очилов, А. К. (2020). Важность цитохромов Р450 для гастроэнтерологии. *Тиббиетда янги кун, 2*(30/2), 57-59.

47. Паніна, С. С. (2007). Використання лізиноприлу в лікуванні хронічних обструктивних захворювань легенів із супутньою артеріальною гіпертензією. *Журнал «Внутренняя медицина», 4*(4).

48. Пентюк, Н. О. (2009). Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування CCl4-індукованого фіброзу печінки у щурів. *Сучасна гастроентерол., 5,* 33-37.

49. Переверзев, А. П., & Остроумова, О. Д. (2022). Изменения фармакокинетики лекарственных средств у пациентов с ожирением. *Клиническая фармакология и терапия*, *31*(1), 83-90.

50. Півторак, К. В. (2017). Особливості клітинного циклу гепатоцитів при експериментальній неалкогольній жировій хворобі печінки та її корекції. *Вісник проблем біології і медицини, 1*(135), 170-174.

51. Полінкевич, С. Г. (2014). Динаміка вмісту інсуліноподібного фактора росту–1 у щурів різних вікових груп на тлі хронічного токсичного гепатиту. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 2,* 143-146.

52. Присяжнюк, В. П. (2017). Результати комплексного лікування хворих на хронічний гепатит невірусного походження з використанням L-карнітину. *Буковинський медичний вісник, 21*(2/1), 61-66. http://nbuv.gov.ua/UJRN/bumv_2017_21_2%281%29__16

53. Пронин, В. С., Колода, Д. Е., & Чаплыгина, Е. В. (2008). Инсулиноподобные ростовые факторы в клинической практике: биологическая роль и перспективы использования. *Клиницист, 1*(1), 18-26.

54. Райхельсон, К. Л., Карев, В. Е., Марченко, Н. В., Семенов, Н. В., Пальгова, Л. К., & Барановский, А. Ю. (2014). Роль трансформирующего-фактора роста в развитии некоторых заболеваний печени. *Терапевтический архив, 86*(2), 44-8.

55. Рапопорт, С. И., Кветной, И. М., Ильницкий, А. Н., Прощаев, К. И., Жернакова, Н. И., Пожарскис, А., … & Перелыгин, К. В. (2012). Нейро иммуноэндокринные эффекты этанола в развитии патологии внутренних органов. *Клиническая медицина, 3,* 8-12.

56. Реброва, О. Ю. (2014). Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. - М., Медисфера, 2006. - 312 с. - 3-е издание. *Dental science and practice, 1,* 43-47. http://nbuv.gov.ua/UJRN/dscpr_2014_1_10

57. Рикало, Н. А. (2009). Експериментальна модель хронічного тетрахлорметанового гепатиту та цирозу печінки у нестатевозрілих щурів. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії, 9*(2 (26)), 116-118.

58. Рикало, Н. А. (2011). *Патогенез хронічних вірусних гепатитів В і С у дітей: вікові особливості, патогенетична терапія (експериментально-клінічне дослідження).* (Дис. докт. мед. наук). Терноп. держ. мед. ун-т ім. І.Я. Горбачевського, Тернопіль.

59. Рикало, Н. А. (2014). Сучасні погляди на механізми репаративної регенерації тканини печінки при гострому та хронічному ушкодженні. *Клінічна та експериментальна патологія, 13*(4), 162-168.

60. Рикало, Н. А. (2015). Прогностичне значення вмісту вільного та пептидозв'язаного сироваткового гідроксипроліну при хронічній патології печінки. *Biomedical and biosocial anthropology, 24,* 136-138.

61. Рикало, Н. А., & Андрощук, О. В. (2012). Сучасні погляди на механізми репаративної регенерації печінки та нирок. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 2,* 110-3.

62. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2014а). Патент України 94073. Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки. Київ: Державне патентне відомство України.

63. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2014б). Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки. *Вісник Вінницького національного медичного університету, 18*(2), 632-5.

64. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2016). Структурні зміни тканини печінки щурів при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом, *Матеріали VII нац. конгресу патофізіологів України з міжнар. участю, 5-7 жовтня* 2016 *р., м. Харків*. *Експериментальна та клінічна медицина, 71*(2), 151-155.

65. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017а). Визначення сироваткових фракцій гідроксипроліну при хронічному токсичному гепатиті у щурів на тлі корекції лізиноприлом та глутаргіном. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 78*(2), 61-65.

66. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017б). Структурні зміни епітеліального та клубочкового компонентів нирок щурів при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. *Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія, 2,* 104-109.

67. Рикало, Н. А., Незгода, І. І., & Рауцкіс, В. А. (2009). Патент України 43704, МПК (2009) G09B 23/00. Спосіб моделювання хронічного токсичного гепатиту та цирозу печінки у нестатевозрілих щурів. Київ: Державне патентне відомство України.

68. Рикало, Н. А., & Полінкевич, С. Г. (2012). Особливості плоїдності ядерної ДНК клітин печінки при хронічному токсичному гепатиті у щурів. *Здобутки експериментальної та клінічної медицини, 2,* 205.

69. Рикало, Н. А., & Рауцкіс, В. А. (2012). Маркери деструкції сполучної тканини у сироватці крові дітей різних вікових груп, хворих на хронічні вірусні гепатити В і С. *Таврический медико-біологіческий весник, 15*(3), 2(59), 212-215.

70. Рикало, Н. А., & Яровенко, Л. О. (2015а). Інсуліноподібний фактор росту-1 у патогенезі хронічного алкогольного ушкодження печінки щурів різних вікових груп. *Мир медицины и биологии, 11*(4-1), 129-135.

71. Рикало, Н. А., & Яровенко, Л. О. (2015б). Патоморфологічні зміни печінки щурів різного віку за умов хронічної алкогольної інтоксикації та при корекціїї кверцетином та L-аргініном L-глутаматом. *Вісник морфології, 21*(2), 308-312.

72. Рикало, Н. А., & Яровенко, Л. О. (2017). Механізми регенерації тканини печінки у щурів на тлі її хронічного алкогольного ушкодження та медикаментозній корекції. *Вісник морської медицини, 2*(75), 94-98.

73. Рикало, Н. А., & Олійник, Ю. М. (2022). Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на біохімічні маркери фіброзу в організмі щурів за хронічного токсичного гепатиту. *Фармакологія та лікарська токсикологія, 16*(3), 187-194. https://doi.org/10.33250/16.03.187

74. Романова, С. В, Жукова, Е. А., Видманова, Т. А., & Коркотасевич, Л. В. (2012). Механизмы формирования фиброза при хронических заболеваниях печени у детей. *Педиатрия, 91*(4), 32-34.

75. Русин, В. І., Сірчак, Є. С., & Курчак, Н. Ю. (2013). Динаміка резервів амінокислот сирватки крові у хворих на хронічний панкреатит на фоні комплексної терапії із застосуванням L-аргініну L-глутамат. *Вісник проблем біології і медицини, 3*(1), 184-187.

76. Рыболовлев, Ю. Р., & Рыболовлев, Р. С. (1979). Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. *Докл. АН СССР, 247*(6), 1513-1516.

77. Рыкало, Н. А. (2015). Пато- и морфогенез нарушений микроциркуляции при токсическом гепатите у неполовозрелых крыс. *Морфологія*, *9*(3), 67-73.

78. Рыкало, Н. А., & Андрощук, О. В. (2013). Влияние инсулиноподобного фактора-1 на репаративную регенерацию печени при хроническом медикаментозном гепатите у неполовозрелых крыс. *Современная медицина: актуальные вопросы, 26,* 1-12.

79. Сакута, Г. А., & Кудрявцев, Б. Н. (2005). Клеточные механизмы регенерации циррозной печени крыс. II. Влияние частичной гепатэктомии на пролиферацию, полиплоидизацию и гипертрофию гепатоцитов. *Цитология, 47*(5), 379-387.

80. Самогальська, О. Є., & Любанець, Н. В. (2010). Вплив лізиноприлу на прояви портальної гіпертензії при алкогольних цирозах печінки. *Світ медицини та біології, 2,* 151-153.

81. Сапожников, А. Г., & Доросевич, А. Е. (2000). *Гистологическая и микроскопическая техника: руководство.* Смоленск: САУ.

82. Сиволап, В. В., & Герасько, М. П. (2013). Прямые ингибиторы ренина – новый подход в лечении больных артериальной гипертензией в сочетании с ожирением, сахарным диабетом, поражением почек и менопаузой. *Запоріжський медичний журнал, 2*, 70-75.

83. Скрипник, І. М. (2007). Алкогольна хвороба печінки: сучасний погляд на проблему. *Новини медицини та фармації, 3*(3), 65-75.

84. Скрипник, І. М., & Маслова, Г. С. (2015). Алкогольна хвороба печінки: шляхи підвищення детоксикаційної функції печінки. *Семейная медицина, 62*(6), 7-15.

85. Скуратов, А. Г. (2012). Тетрахлорметановая модель гепатита и цирроза печени у крыс. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 9,* 38-40.

86. Сова, В. А. (2021). Алкогольна хвороба печінки: фокус на L-орнітин-L-аспартат. *Терапевтика*, *2*(2), 30-34.

87. Солошенко, О. С., & Сергиенко, О. М. (2011). Выбор препарата группы ингибиторов АПФ: эффективность, безопасность и доступность для пациента. *Український медичний часопис, 1,* 60-64.

88. Сорочинников, А. П., & Доросевич, А. Е. (2000). *Гистологическая и микроскопическая техника: руководство.* Смоленск: «САУ».

89. Степанов, Ю. М., Діденко, В. І., Кленіна, І. А., Руденко, А. І., Макарчук, В. А., Ошмянська, Н. Ю., & Галінський, О. О. (2014). Морфофункціональні зміни печінки щурів з експериментальним гепатитом в умовах дисбалансу оксиду азоту. *Гастроентерологія*, *54*(4), 48-54.

90. Стефанов, О. В. (2001). *Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації).* К.: МОЗ України, Державний фармакологічний центр.

91. Татаріна, О. В. (2019а). Корекція амарантовим маслом змінених функцій печінки та нирок у щурів з несмертельним навантаженням тетрахлорид вуглецем. *Міжнародний мультидисциплінарний науковий журнал «Логоз. Мистецтво наукової думки», 8,* 81-85.

92. Татаріна, О. В. (2019б). Роль порушень метаболізму в формуванні порушення функції печінки та нирок при тетрахлоридвуглецевій інтоксикації. *Вісник Вінницького національного медичного університету, 23*(3), 377-382.

93. Фадеенко, Г. Д., Кравченко, Н. А., & Ярмыш, Н. В. (2007). Факторы прогрессирования фиброза печени. *Сучасна гастроентерологія, 1*(33), 74-79.

94. Філіппова, О. Ю. (2017). Зміни прямих маркерів фіброзу печінки у хворих зі стеатогепатитами неалкогольного та алкогольного генезу на тлі ожиріння та патології біліарного тракту. *Запорожский медицинский журнал, 19*(2), 168-71.

95. Фролов, В. М., & Скалыга, И. М. (2003). Эффективность глутаргина при гепатитах сочетанного вирусного и алкогольного генеза. В *Глутаргин:*

применение нового украинского препарата в клинической практике. (с. 113-119). Киев; Харьков; Луганск.

96. Холодкова, О. Л., Перепелюк, М. М., Горгач, Д. М., & Ромак, О. І. (2017). Морфо-функціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. *Вісник проблем біології та медицини, 4/2*(140), 156-159.

97. Черняшова, В. В. (2018). Особливості перебігу метаболічних процесів у печінці при гострому експериментальному перитоніті та застосуванні l-аргініну та l-аргініну-l-глутамату. *Вісник наукових досліджень, 3,* 119-120. https://doi.org/10.11603/2415-8798.2015.3.5212

98. Шараев, П. Н., Стрелков, Н. С., & Афсарн, Ж. В. (1997). Диагностическое значение показателей обмела коллагена. *Клиническая лабораторная діагностика, 6,* 48-52.

99. Шараев, П. Н., Сахабутдинова, Е. П., Лекомцева, О. И., & Кошикова, С. В. (2009). Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови. *Клиническая и лабораторная диагностика, 1,* 7-9.

100. Шацький, В. В., Гудима, А. А., & Федонюк, Л. Я. (2019). Динаміка антиоксидантно-прооксидантного балансу киркового і мозкового шарів нирки після гострої крові, ускладненої ішемії-реперфузії кінцівки, та його корекція карбацетамом його корекція карбацетамом. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини, 4,* 144-153.

101. Шевченко, О. П. (2015). Патоморфологічні зміни у щурів при експериментальній моделі хронічного вірусного гепатиту. *Морфологія, 9*(3), 111-116.

102. Шевченко, О. П., Суременко, М. С., & Біла-Попович, Г. С. (2009). Ефективність застосування глутаргіну у комплексному лікуванні пацієнтів на цирозі печінки. *Науковий вісник Ужгородського університету. Сер.: Медицина, 36,* 35-37.

103. Шипулін, В. П. (2006). Біохімічні дослідження в оцінці ефективності лікування хворих на хронічний гепатит. *Лабораторна діагностика, 4,* 17-21.

104. Шипулин, В. П., & Чернявский, В. В. (2012). Патогенез и лечение стеатогепатита алкогольного и неалкогольного генеза. *Новости медицины и фармации, 1,* 42-44.

105. Яворська, С. І., Лісничук, Н. Є, Ярошенко, Т. Я., Ремінецький, Б. Я., & Яворська-Скрабут, І. М. (2020). Динаміка змін біохімічних показників крові та структур кіркової речовини нирок білих щурів за умов токсичного ураження печінки. *Медична та клінічна хімія, 22*(2), 66-71.

106. Яровенко, Л. О. (2016). Особливості фрагментації ядерної ДНК клітин печінки у щурів на тлі хронічної алкогольної інтоксикації та за умов застосування кверцетину і L-аргініну L-глутамату. *Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, 1*(58), 1-11.

107. Abdelhamid, A. M., Selim, A., & Zaafan, M. A. (2021). The Hepatoprotective Effect of Piperine Against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Mice: The Involvement of miR-17 and TGF-β/Smads Pathways. *Front Mol Biosci., 8,* 754098. doi: 10.3389/fmolb.2021.754098

108. Abdel-Sattar, A. R., Abo-Saif, A. A., & Aboyoussef, A. M. (2020). Nicorandil and atorvastatin attenuate carbon tetrachloride - induced liver fibrosis in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol., 42*(6), 582-593. doi: 10.1080/08923973.2020.1830104

109. Abdel-Wahab, R., Hassan, M. M., George, B., Pestana, R. C., Xiao, L., Lacin, S., ... & Kaseb, A. O. (2020). Impact of Integrating IGF-1 Levels Into MELD Score for Survival Prediction in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Oncology, 98*(12), 836-846. doi: 10.1159/000502482

110. Adachi, T., Togashi, H., Suzuki, A., Kasai, S., Ito, J., Sugahara, K., & Kawata, S. (2005). NAD (P) H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology, 41*(6), 1272-1281. doi: 10.1002/hep.20719

111. Adachi, Y., Nojima, M., Mori, M., Himori, R., Kubo, T., Akutsu, N., … & Tamakoshi, A. (2021). Insulin-Like Growth Factor 2 and Incidence of Liver Cancer

in a Nested Case-Control Study; Japan Collaborative Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 30*(11), 2130-2135. doi: 10.1158/1055-9965

112. Adam, T. C., Hasson, R. E., Ventura, E. E., Toledo-Corral, C., Le, K. A., Mahurkar, S., ... & Goran, M. I. (2010). Cortisol is negatively associated with insulin sensitivity in overweight Latino youth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 95*(10), 4729-4735. doi: 10.1210/jc.2010-0322

113. Afdhal, N. H., & Nunes, D. (2004). Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Official journal of the American College of Gastroenterology ACG, 99*(6), 1160-1174. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.30110.x

114. Aguirre, G. A., De Ita, J. R., De La Garza, R. G., & Castilla-Cortazar, I. (2016). Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *Journal of translational medicine, 14*(1), 1-23. doi: 10.1186/s12967-015-0762-z

115. Al Amin, A. S. M., & Menezes, R. G. (2021). *Carbon Tetrachloride Toxicity.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. PMID: 32965851

116. Alaaeddine, N. A., Sidaoui, J., Hilal, G., Serhal, R., Abedelrahman, A., & Khoury, S. (2012).TNF-α messenger ribonucleic acid (m RNA) in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Eur Cytokine Netw, 23*(3), 107-11. doi: 10.1684/ecn.2012.0313

117. Alderete, T. L., Byrd-Williams, C. E., Toledo-Corral, C. M., Conti, D. V., Weigensberg, M. J., & Goran, M. I. (2011). Relationships between IGF-1 and IGFBP-1 and adiposity in obese African-American and Latino adolescents. *Obesity (Silver Spring), 19*(5), 933-8. doi: 10.1038/oby.2010.211

118. AlQudah, M., Hale, T. M., & Czubryt, M. P. (2020). Targeting the renin-angiotensin-aldosterone system in fibrosis. *Matrix Biology*, *91*, 92-108. doi: 10.1016/j.matbio.2020.04.005

119. Al-Rifaie, A., Khan, M. A., Ali, A., Dube, A. K., Gleeson, D., & Hoeroldt, B. (2020). Lisinopril-induced liver injury: an unusual presentation and literature review. *EJCRIM, 7*(7), doi:10.12890/2020_001600

120. Ambade, A., Lowe, P., Kodys, K., Catalano, D., Gyongyosi, B., Cho, Y., … & Szabo, G. (2019). Pharmacological Inhibition of CCR2/5 Signaling Prevents and

Reverses Alcohol-Induced Liver Damage, Steatosis, and Inflammation in Mice. *Hepatology, 69*(3), 1105-1121. doi: 10.1002/hep.30249

121. Ambreen, A., Jahan, S., & Malik, S. (2016). Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, Lisinopril on Morphological and Biochemical Aspects of Fibrotic Liver Regeneration. *Saudi J Gastroenterol., 22*(6), 428-434. doi: 10.4103/1319-3767.195559

122. Ao, Y., Sun, Z., Hu, S., Zuo, N., Li, B., Yang, S., … & Wang, H. (2015). Low functional programming of renal AT(2)R mediates the developmental origin of glomerulosclerosis in adult offspring induced by prenatal caffeine exposure. *Toxicology and applied pharmacology, 287*(2), 128-138. doi: 10.1016/j.taap.2015.05.007

123. Apte, U., Limaye, P. B., & Michalopoulos, G. K. (2015). Extracellular signals involved in liver regeneration. (Chapter 5). (p. 65-75). In *Liver Regeneration: Basic Mechanisms, Relevant Models and Clinical Applications.* Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420128-6.00005-1

124. Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *J. Clin. Invest., 115*(2), 209-218. doi: 10.1172/JCI24282

125. Bataller, R., Ginès, P., Nicolás, J. M., Görbig, M. N., Garcia-Ramallo, E., Gasull, X., … & Rodés, J. (2000). Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology, 118*(6), 1149-56. doi:10.1016/s0016-5085(00)70368-4

126. Bataller, R., Sancho-Bru, P., Ginès, P., Lora, J. M., Al-Garawi, A., Solé, M., … & Rodés, J. (2003). Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology, 25*(1), 117-25. doi: 10.1016/s0016-5085(03)00695-4

127. Bonefeld, K., & Møller, S. (2011). Insulin-like growth factor-I and the liver. *Liver International, 31*(7), 911-9. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02428.x

128. Boursier, J., Baca, Y., Halfon, P., Halfon, P., Leroy, V., de Ledinghen, V., … & Calès, P. (2009). Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis

and cirrhosis in chronic hepatitis *C. Eur J Gastroenterol. Hepatol., 21*(1), 28-38. doi: 10.1097/MEG.0b013e32830cebd7

129. Brattin, W. J., Glende, E. A., & Recknagel, R. O. (1985). Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine, 1*(1), 27-38. doi: 10.1016/0748-5514(85)90026-1

130. Brenner, D. A. (2013). Reversibility of liver fibrosis. *Gastroenterology & hepatology, 9*(11), 737-739.

131. Caballería, L., Pera, G., Arteaga, I., Rodríguez, L., Alumà, A., Morillas, R. M., & Ginès, P. (2018). High prevalence of liver fibrosis among European adults with unknown liver disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol., 16*(7), 1138-45. DOI: 10.1016/j.cgh.2017.12.048

132. Calamita, G., & Portincasa, P. (2007). Present and future therapeutic strategies in non-alcoholic fatty liver disease. *Expert opinion on therapeutic targets, 11*(9), 1231-1249. DOI:10.1517/14728222.11.9.1231

133. Campbell, D. J., Karam, H., Ménard, J., Bruneval, P., & Mullins, J. J. (2009). Prorenin Contributes to Angiotensin Peptide Formation in Transgenic Rats With Rat Prorenin Expression Targeted to the Liver. *Hypertension, 54,* 1248-1253. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138495

134. Casillas-Ramirez, A., Amine-Zaouali, M., Massip-Salcedo, M., Padrissa-Altés, S., Bintanel-Morcillo, M., Ramalho, F., … & Peralta, C. (2008). Inhibition of angiotensin II action protects rat steatotic livers against ischemia-reperfusion injury. *Crit. Care Med., 36*(4), 1256-1266. doi: 10.1097/CCM.0b013e31816a023c

135. Chamberlain, N. D., Vila, O. M., Volin, M. V., Volkov, S., Pope, R. M., Swedler, W., … & Shahrara, S. (2012). TLR 5, a novel and unidentified inflammatory mediator in rheumatoid arthritis that correlates with disease activity score and joint TGF-α levels. *J Immunol., 189*(1), 475-483. doi: 10.4049/jimmunol.1102977

136. Chen, Y. J. L., Chou, P. C., Hsu, C. L., Hung, J. F., Wu, Y. C., & Lin, J. G. (2018). Fermented Citrus lemon reduces liver injury induced by carbon tetrachloride

in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018,* 6546808. doi: 10.1155/2018/6546808

137. Cho, S. S., Lee, J. H., Kim, K. M., Park, E. Y., Ku, S. K., Cho, I. J., … & Ki, S. H. (2021). REDD1 attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis via inhibiting of TGF-β/Smad signaling pathway. *Free Radic Biol Med., 176,* 246-256. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.002

138. Choi, J. E., Lee, S. S., Sunde, D. A., Huizar, I., Haugk, K. L., Thannickal, V. J., … & Schnapp, L. M. (2009). Insulin-like growth factor-I receptor blockade improves outcome in mouse model of lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine, 179*(3), 212-9. doi: 10.1164/rccm.200802-228OC

139. Cleland, S. J., Petrie, J. R., Ueda S., Elliott, H. L., & Connell, J. M. (1998). Insulin as a vascular hormone: implications for the pathophysiology of cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol., 25*(3-4), 175-184. doi: 10.1111/j.1440-1681.1998.t01-15-.x

140. Colak, Y., Senates, E., Ozturk, O., Yilmaz, Y., Zemheri, E., Enc, F. Y., ... & Tuncer, I. (2012). Serum concentrations of human insulin-like growth factor-1 and levels of insulin-like growth factor-binding protein-5 in patients with nonalcoholic fatty liver disease: association with liver histology. *European journal of gastroenterology & hepatology, 24*(3), 255-261. DOI:10.1097/MEG.0b013e32834e8041

141. Cui, W., Jin, H. B., & Li, Z. W. (2010). Mechanism of the transforming growth factor-β induction of fibronectin expression in hepatic stem-like cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 43*(1), 36-42. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009007500017

142. Danser, A. J. (2007). Novel drugs targeting hypertension: renin inhibitors. *Journal of cardiovascular pharmacology, 50*(2), 105-111. doi: 10.1097/FJC.0b013e318070d1d3

143. de Kloet, A. D., Krauseb, E. G., & Woods, S. C. (2010). The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & Behavior, 100*(5), 525-534. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.03.018

144. de Macêdo, S. M., Guimarães, T. A., Feltenberger, J. D., & Sousa Santos, S. H. (2014). The role of renin-angiotensin system modulation on treatment and prevention of liver diseases. *Peptides, 62,* 189-196. doi: 10.1016/j.peptides.2014.10.005

145. Dropmann, A., Dooley, S., Dewidar, B., Hammad, S., Dediulia, T., Werle, J., … & Meindl-Beinker, N. M. (2020). TGF-β2 silencing to target biliary-derived liver diseases. *Gut., 69*(9), 1677-1690. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319091

146. El-Baz, F. K., Salama, A., & Salama, R. A. (2019). Therapeutic effect of Dunaliella salina microalgae on thioacetamide-(TAA-) induced hepatic liver fibrosis in rats: role of TGF-β and MMP9. *BioMed research international*, *2019*. 7028314. https://doi.org/10.1155/2019/7028314

147. Elmore, S. A., Dixon, D., Hailey, J. R., Harada, T., Herbert, R. A., Maronpot, R. R., … & Creasy, D. M. (2016). Recommendations from the INHAND apoptosis/necrosis working group. *Toxicologic pathology, 44*(2), 173-188. doi: 10.1177/0192623315625859

148. Fang, Q. Q., Wang, X. F., Zhao, W. Y., Ding, S. L., Shi, B. H., Xia, Y., … & Tan, W. Q. (2018). Angiotensin-converting enzyme inhibitor reduces scar formation by inhibiting both canonical and noncanonical TGF-β1 pathways. *Sci Rep., 8*(1), 3332. doi: 10.1038/s41598-018-21600-w

149. Fernandez-Varo, G., & Simenez, W. (2011). Non-invasive Markers of Liver Fibrosis. *European Gastroenterology and Hepatology Review, 7*(2), 93-96.

150. Ferrario, C. M., & Varagic, J. (2010). The ANG-(1–7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *American Journal of Physiology, 298*(6), 1297-1305. doi: 10.1152/ajprenal.00110.2010

151. Fischler, B., & Lamireau, T. (2014). Cholestasis in the newborn and infant. *Clin Res Hepatol Gastroenterol., 38*(3), 263-7. doi: 10.1016/j.clinre.2014.03.010

152. Frey, J. (1965). Étude d'une méthode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du serum. A method for the detection and determination of the normal value of serum hydroxyproline. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 111*(2), 440-446.

153. Gao, B., & Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology, 141*(5), 1572-1585. doi: 10.1053/j.gastro.2011.09.002

154. García-Galiano, D., Sánchez-Garrido, M. A., Espejo, I., Montero, J. L., Costán, G., Marchal, T., ... & Muntané, J. (2007). IL-6 and IGF-1 are independent prognostic factors of liver steatosis and non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. *Obesity surgery, 17*(4), 493-503. doi: 10.1007/s11695-007-9087-1

155. Ghaleb, H. A., & Salah, S. (2011). A novel hypothesis for pathophysiology of hepatitis fibrosis in hepatitis C viral infection. *Hypothesis, 9*(1), 1-5.

156. Giacchetti, G., Sechi, L. A., Rilli, S., & Carey, R. M. (2005). The reninangiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab., 16*(3), 120-6. doi: 10.1016/j.tem.2005.02.003

157. Gietka, J. A. (2011). Role of simple noninvasive markers of liver fibrosis in qualification to treatment in patients with chronic hepatitis C. *Przegl. Epidemiol., 65*(1), 27-34.

158. Gines, P., & Schrier, R. W. (2009). Renal failure in cirrhosis. *N. Engl. J. Med., 361*(13), 1279-1290. doi: 10.1056/NEJMra0809139

159. Gokcimen, A., Kocak, A., Kilbas, S., Bayram, D., Kilbas, A., Cim, A., … & Kutluhan, S. (2007). Effect of lisinopril on rat liver tissues in L-NAME induced hypertension model. *Mol Cell Biochem., 296*(1-2), 159-164. doi: 10.1007/s11010-006-9310-8

160. Gonzalez-Sanchez, E., Vaquero, J., Férnandez-Barrena, M. G., Lasarte, J. J., Avila, M. A., Sarobe, P., … & Fabregat, I. (2021). The TGF-β Pathway: A Pharmacological Target in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel), 13*(13), 3248. doi: 10.3390/cancers13133248

161. Goto, M., Hoxha, N., Osman, R., Wen, J., Wells, R. G., & MacRae Dell, K. (2010). Renin-angiotensin system activation in congenital hepatic fibrosis in the PCK rat model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Jornal of pediatric gastroenterology and nutrition, 50*(6), 639-644. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181cc80e4

162. Gough, N. R., Xiang, X., & Mishra, L. (2021). TGF-β Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. *Gastroenterology, 161*(2), 434-452.e15. doi: 10.1053/j.gastro.2021.04.064

163. Grace, J. A., Klein, S., Herath, C. B., Granzow, M., Schierwagen, R., Masing, N., … & Trebicka, J. (2013). Activation of the MAS receptor by angiotensin-(1-7) in the renin-angiotensin system mediates mesenteric vasodilatation in cirrhosis. *Gastroenterology, 145*(4), 874-884.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2013.06.036

164. Granzow, M., Schierwagen, R., Klein, S., Kowallick, B., Huss, S., Linhart, M., … & Trebicka, J. (2014). Angiotensin-II type 1 receptor-mediated Janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology, 60*(1), 334-348. doi: 10.1002/hep.27117

165. Guo, Y., Zhu, J., Xu, X., Shen, B., Shen, Z., Li, B., … & Lu, L. (2022). TGF-β/YB-1/Atg7 axis promotes the proliferation of hepatic progenitor cells and liver fibrogenesis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis., 1868*(1), 166290. doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166290

166. Hellerbrand, C., Stefanovic, B., Giordano, F., Burchardt, E. R., & Brenner, D. A. (1999). The role of TGFβ1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol., 30*(1), 77-87. doi: 10.1016/s0168-8278(99)80010-5

167. Henrotin, Y., Deberg, M., Mathy-Hartert, M., & Deby-Dupont, G. (2009). Biochemical biomarkers of oxidative collagen damage. *Advances in clinical chemistry, 49,* 31-55. doi: 10.1016/s0065-2423(09)49002-4

168. Herranz-Itúrbide, M., Peñuelas-Haro, I., Espinosa-Sotelo, R., Bertran, E., & Fabregat, I. (2021). The TGF-β/NADPH Oxidases Axis in the Regulation of Liver Cell Biology in Health and Disease. *Cells, 10*(9), 2312. doi: 10.3390/cells10092312

169. Higashi, T., Friedman, S. L., & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev., 1*(121), 27-42. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007

170. Hillebrandt, S., Wasmuth, H. E., Weiskirchen, R., Hellerbrand, C., Keppeler, H., Werth, A., … & Lammert, F. (2005). Complement factor 5 is a quantitative trait

gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat. Genet., 37*(8), 835-843. doi: 10.1038/ng1599

171. Hsu, W. F., Yu, S. H., Lin, J. T., Wu, J. C., Hou, M. C., Huang, Y. H., ... & Peng, C. Y. (2019). Renal Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers in Patients with Liver Cirrhosis: A Nationwide Cohort Study. *Gastroenterology research and practice*, *2019*, 1743290. doi: 10.1155/2019/1743290

172. Hua, Y. Q., Zeng, Y., Xu, J., & Xu, X. L. (2021). Naringenin alleviates nonalcoholic steatohepatitis in middle-aged Apoe-/-mice: role of SIRT1. *Phytomedicine, 81,* 153412. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153412

173. Huang, M. L., Li, X., Meng, Y., Xiao, B., Ma, Q., Ying, S. S., & Zhen-shu Zhang (2010). Upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in hepatic fibrosis by ACE inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol., 37*(1), e1-6. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05302.x

174. Huang, Q., Xie, Q., Shi, C. C., Xiang, X. G., Lin, L. Y., Gong, B. D., … & Jia, N. N. (2009). Expression of angiotensin-converting enzyme 2 in CCL4-induced rat liver fibrosis. *Int J Mol Med., 23*(6), 717-723. doi: 10.3892/ijmm_00000185

175. Huang, Z., Ding, M., Dong, Y., Ma, M., Song, X., Liu, Y., … & Liu, H. (2021). Targeted truncated TGF-β receptor type II delivery to fibrotic liver by PDGFβ receptor-binding peptide modification for improving the anti-fibrotic activity against hepatic fibrosis in vitro and in vivo. *Int J Biol Macromol., 188,* 941-949. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.055

176. Hung, C. F., Rohani, M. G., Lee, S. S., Chen, P., & Schnapp, L. M. (2013). Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation. *Respiratory research*, *14*(1), 1-12.

177. Inzaghi, E., Cianfarani, S., & Nobili, V. (2014). Insulin-like growth factors (IGF-I and-II): new actors in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism, 9*(3), 193-195. DOI:10.1586/17446651.2014.900438

178. Iosyk, I., Andreychyn, M., Ivakhiv, O., & Vyshnevska, N. (2019). Virological and Morphological Efficiency of Different Anti-Virus Therapeutic Regimens for Patients With Chronic Hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research, 8*(5), 2972-2974.

179. Iwai, M., & Horiuch, M. (2009). Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertension Research, 32*(7), 533-6. doi: 10.1038/hr.2009.74

180. Jiang, L., Huang, J., Wang, Y., & Tang, H. (2012). Metabonomic analysis reveals the CCl4-induced systems alterations for multiple rat organs. *Journal of proteome research, 11*(7), 3848-3859. doi: 10.1021/pr3003529

181. Jonsson, J. R., Clouston, A. D., Ando, Y., Kelemen, L. I., Horn, M. J., Adamson, M. D., … & Powell, E. E. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the progression of rat hepatic fibrosis. *Gastroenterology, 121*(1), 148-155. doi: 10.1053/gast.2001.25480

182. Kamoun, Z., Kamoun, A. S., Bougatef, A., Kharrat, R. M., Youssfi, H., Boudawara, T., … & Zeghal, N. (2017). Hepatoprotective and nephroprotective effects of sardinella (Sardinella aurita) protein hydrolysate against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res Int., 24*(2), 1432-1441. doi: 10.1007/s11356-016-7424-4

183. Karsdal, M. A., Daniels, S. J., Holm Nielsen, S., Bager, C., Rasmussen, D. G., Loomba, R., ... & Schuppan, D. (2020). Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver International*, *40*(4), 736-750. doi: 10.1111/liv.14390

184. Khan, H. A., Ahmad, M. Z., Khan, J. A., & Arshad, M. I. (2017). Crosstalk of liver immune cells and cell death mechanisms in different murine models of liver injury and its clinical relevance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int., 16*(3), 245-56. doi: 10.1016/s1499-3872(17)60014-6

185. Khurana, A., Sayed, N., Allawadhi, P., & Weiskirchen, R. (2021). It's all about the spaces between cells: role of extracellular matrix in liver fibrosis. *Annals of Translational Medicine*, *9*(8), 728. doi: 10.21037/atm-20-2948

186. Kim, G., Kim, J., Lim, Y. L., Kim, M. Y., & Baik, S. K. (2016). Renin-angiotensin system inhibitors and fibrosis in chronic liver disease: a systematic review. *Hepatol Int., 10*(5), 819-828. doi: 10.1007/s12072-016-9705-x

187. Koh, S. L., Ager, E., Malcontenti-Wilson, C., Muralidharan, V., & Christophi, C. (2013). Blockade of the renin-angiotensin system improves the early stages of liver regeneration and liver function. *J Surg Res., 179*(1), 66-71. doi: 10.1016/j.jss.2012.09.007

188. Krekhovska-Lepiavko, O. M., Lokay, B. A., Hudyma, A. A., Yastremska, S. O., Yurchyshyn, O. M., & Mazur, L. P. (2020). The effects of L-ornitine and L-arginine on the processes of lipid peroxidation in the functional layers of kidneys on the background of acute toxic hepatitis. *Wiadomosci lekarskie, 73*(11), 2498-2502.

189. Kumar, S., Duan, Q., Wu, R., Harris, E. N., & Su, Q. (2021). Pathophysiological communication between hepatocytes and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev., 176,* 113869. doi: 10.1016/j.addr.2021.113869

190. Kurikawa, N., Suga, M., Kuroda, S., Yamada, K., & Ishikawa, H. (2003). An angiotensin II type 1 receptor antagonist, olmesartan medoxomil, improves experimental liver fibrosis by suppression of proliferation and collagen synthesis in activated hepatic stellate Cells. *British Journal of Pharmacology. 139*(6), 1085-1094. doi: 10.1038/sj.bjp.0705339

191. Kwiecinski, M., Noetel, A., Elfimova, N., Trebicka, J., Schievenbusch, S., Strack, I., … & Odenthal, M. (2011). Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA – 29 induction. *Plos One, 6*(9), e24568. doi: 10.1371/journal.pone.0024568

192. Lee, H. H., Seo, Y. S., Um, S. H., Won, N. H., Yoo, H., Jung, E. S., … & Ryu, H. S. (2010). Usefulness of non-invasive markers for predieting significant fibrosis in patients with chronic liver desease. *J Korean Med Sei., 25*(1), 67-74. doi: 10.3346/jkms.2010.25.1.67

193. Li, S., Zhao, W., Zhao, Z., Cheng, B., Li, S. & Liu, C. (2020). Levistilide A reverses rat hepatic fibrosis by suppressing angiotensin II-induced hepatic stellate

cells activation. *Molecular Medicine Reports, 22*(3), 2191-2198. doi: 10.3892/mmr.2020.11326

194. Li, X., Ding, Z., Wu, Z., Xu, Y., Yao, H., & Lin, K. (2021). Targeting the TGF-β signaling pathway for fibrosis therapy: a patent review (2015-2020). *Expert Opin Ther Pat., 31*(8), 723-743. doi: 10.1080/13543776.2021.1896705

195. Li, Y., Chen, M., Zhou, Y., Tang, C., Zhang, W., Zhong, Y., … & Sheng, L. (2020). NIC links inflammation to hepatic steatosis by suppressing PPARα in alcoholic liver disease. *Theranostics, 10*(8), 3579-3593. doi: 10.7150/thno.40149

196. Lindquist, D. M., Fugate, E. M., Wang, J., Sharma, A., Gandhi, C. R., & Dillman, J. R. (2021). MRI Measures of Murine Liver Fibrosis. *J Magn Reson Imaging, 54*(3), 739-749. doi: 10.1002/jmri.27601

197. Liu, C., Tao, Q., Sun, M., Wu, J. Z., Yang, W., Jian, P., … & Liu, P. (2010). Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab. Invest., 90,* 1805-1816. https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.123

198. Liu, L. X., Huang, S., Zhang, Q.Q., Liu, Y., Zhang, D. M., Guo, X. H., & Han, D. W. (2009). Insulin-like growth factor binding protein-7 induces activation and transdifferentiation of hepatic stellate cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology: WJG, 15*(26), 3246-3253. doi: 10.3748/wjg.15.3246

199. Liu, Y., Song, J., Yang, J., Zheng, J., Yang, L., Gao, J., … & Tang, Y. D. (2021). Tumor Necrosis Factor α-Induced Protein 8-Like 2 Alleviates Nonalcoholic Fatty Liver Disease Through Suppressing Transforming Growth Factor Beta-Activated Kinase 1 Activation. *Hepatology, 74*(3), 1300-1318. doi: 10.1002/hep.31832

200. Lu, M., Qin, Q., Yao, J., Sun, L., & Qin, X. (2019). Induction of LOX by TGF-β1/Smad/AP-1 signaling aggravates rat myocardial fibrosis and heart failure. *IUBMB Life, 71*(11), 1729-1739. doi: 10.1002/iub.2112

201. Lubel, J. S., Herath, C. B., Burrell, L. M., & Angus, P. W. (2008). Liver disease and the renin-angiotensin system: recent discoveries and clinical

implications. *J. Gastroenterol. Hepatol., 23*(9), 1327-1338. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05461.x

202. Ma, J., Qiu, Y., Wang, M., Zhang, M., Zhao, X., & Jiang, H. (2019). Locostatin Alleviates Liver Fibrosis Induced by Carbon Tetrachloride in Mice. *Dig Dis Sci., 64*(9), 2570-2580. doi: 10.1007/s10620-019-05588-5

203. Mahmoud, A. A., Bakir, A. S., & Shabana, S. S. (2012). Serum TGF-β, Serum MMP-1, and HOMA-IR as non-invasive predictors of fibrosis in Egyptian patients with NAFLD. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association, 18*(5), 327. doi: 10.4103/1319-3767.101132

204. Malhi, H., & Gores, G. J. (2008). Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology, 134*(6), 1641-1654. doi: 10.1159/000502482

205. Mannaa, F. A., & Abdel-Wahhab, K. G. (2016). Physiological potential of cytokines and liver damages. *Hepatoma Res., 2,* 131-43. DOI: 10.20517/2394-5079.2015.58

206. Manno, M., Rezzadore, M., Grossi, M., & Sbrana, C. (1996). Potentiation of occupational carbon tetrachloride toxicity by ethanol abuse. *Hum Exp Toxicol., 15*(4), 294-300. DOI: 10.1177/096032719601500404

207. Maqoud, F., Zizzo, N., Mele, A., Denora, N., Passantino, G., Scala, R., ... & Tricarico, D. (2020). The hydroxypropyl-β-cyclodextrin-minoxidil inclusion complex improves the cardiovascular and proliferative adverse effects of minoxidil in male rats: Implications in the treatment of alopecia. *Pharmacology Research & Perspectives*, *8*(3), e00585. doi: 10.1002/prp2.585

208. Marin-Serrano, C. E., Rodriguez-Ramos, C., Diaz-Garsia, F., Martín-Herrera, L., Fernández-Gutiérrez-Del-Alamo, C., & Girón-González, J. A. (2010). Hepatocyte growth factor and chronic hepatitis. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid), 102*(6), 365-371. doi: 10.4321/s1130-01082010000600004

209. Matyash, V. I. (2003). Evaluation of the effectiveness glutargin in Integrated viral therapy hepatitis. (p. 44-50). In *Application of the new Ukrainian Glutargin drug in clinical practice:* A guide for practitioners. Kharkiv, Lugansk.

210. Melnik, A. V., Zaichko, N. V., Chereshnyuk, I. L., Khodakvskyi, O. A., & Haiduk, O. A. (2017). Influence of sex hormones on DNA content and cystathionine-Y-Iyase expression in rat myocardium. *Zaporozhye medical journal, 6,* 737-742.

211. Michot, C., Mamoune, A., Vamecq, J., Viou, M. T., Hsieh, L-S., Testet, E., … & de Lonlay, P. (2013). Combination of lipid metabolism alterations and their sensitivity to inflammatory cytokines in human lipid Ac1-deficient myoblasts. *Biochim Biophys Accta, 1832*(32), 2103- 14. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.07.021

212. Minnis-Lyons, S. E., Ferreira-González, S., Aleksieva, N., Man, T. Y., Gadd, V. L., Williams, M. J., … & Forbes, S. J. (2021). Notch-IGF1 signaling during liver regeneration drives biliary epithelial cell expansion and inhibits hepatocyte differentiation. *Sci Signal., 14*(688), eaay9185. doi: 10.1126/scisignal.aay9185

213. Moon, H. D. (1950). The pathology of fatal carbon tetrachloride poisoning with special reference to the histogenesis of the hepatic and renal lesions. *Am J Pathol., 26*(6), 1041-57. PMC1942894

214. Moroz, L., Soni, S., Dudnyk, V., & Zaichko, N. (2019). Predictive value of serum IL-17A and IP-10 for evaluation of liver fibrosis progression in patients with HBV/HIV co-infection. *Georgian medical news, 290,* 73-77.

215. Mu, M., Zuo, S., Wu, R. M., Deng, K. S., Lu, S., Zhu, J. J., … & Zhao, X. K. (2018). Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF-β/Smad signaling pathway. *Drug Des Devel Ther., 12,* 4107-4115. doi: 10.2147/DDDT.S186726

216. Munakarmi, S., Chand, L., Shin, H. B., Jang, K. Y., & Jeong, Y. J. (2020). Indole-3-carbinol derivative DIM mitigates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice by inhibiting inflammatory response, apoptosis and regulating oxidative stress. *Int J Mol Sci., 21*(6), 2048. doi: 10.3390/ijms21062048

217. Nakamura, I., Asumda, F. Z., Moser, C. D., Kang, Y. N. N., Lai, J. P., & Roberts, L. R. (2021). Sulfatase-2 Regulates Liver Fibrosis through the TGF-β Signaling Pathway. *Cancers (Basel), 13*(21), 5279. doi: 10.3390/cancers13215279

218. Niederreiter, L., & Til, H. (2018). Cytokines and fatty liver diseases. *Liver Research, 2*(1), 14-20. DOI: 10.1016/j.livres.2018.03.003

219. Nieto, N. (2006). Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of rodent Kupffer cells in stellate cells. *Hepatology, 44*(6), 1487-14501. doi: 10.1002/hep.21427

220. Nishizawa, H., Iguchi, G., Fukuoka, H., Takahashi, M., Suda, K., Bando, H., … & Takahashi, Y. (2016). IGF-I induces senescenceof hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. *Sci Rep., 6,* 34605. doi: 10.1038/srep34605

221. Nobili, V., Parkes, J., Bottazzo, G., Marcellini, M., Cross, R., Newman, D., …& Rosenberg, W. M. (2009). Performance of ELF Serum Markers in Predicting Fibrosis Stage in Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology, 136*(1), 160-167. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.013

222. Nosalski, R., Siedlinski, M., Denby, L., McGinnigle, E., Nowak, M., Cat, A. N. D., … & Guzik, T. J. (2020). T-Cell-Derived miRNA-214 Mediates Perivascular Fibrosis in Hypertension. *Circ Res., 126*(8), 988-1003. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315428

223. Novo, E., di Bonzo, L. V., Cannito, S., Colombatto, S., & Parola, M. (2009). Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41*(11), 2089-2093. doi: 10.1016/j.biocel.2009.03.010

224. Novychenko, S., Zub, L., Kovalenko, S., Zamorskii, I., Roborchuk, S., & Scrynchuk, O. (2021). Nephroprotective therapy and renal circulation in patients with diabetic nephropathy. *Pharmacologyonline, 2,* 366-377.

225. Palamarchuk, I., Zaichko, N., Melnyk, A., Nechiporuk, V., & Yurchenko, P. (2020). Cardiomyocyte DNA content and its link to CSE/ H2S system in the heart of experimental diabetic rats. *Georgian medical news, 301,* 147-152.

226. Park, S. H., Kim, B. I., Yun, J. W., Kim, J. W., Park, D. I., Cho, Y. K., … & Kim, S. W. (2004). Insulin resistance and C-reactive protein as independent risk

factors for non-alcoholic fatty liver disease in non-obese Asian men. *J. Gastroenterol Hepatol., 19*(6), 694-698. doi: 10.1111/j.1440-1746.2004.03362.x

227. Parrilli, G., Manguso, F., Orsini, L., Coccoli, P., Vecchione, R., Terracciano, L., … & Marchesini, G. (2007). Essential hypertension and chronic viral hepatitis. *Dig Liver Dis., 39*(5), 466-472. doi: 10.1016/j.dld.2007.01.009

228. Passos-Silva, D. G., Verano-Braga, T., & Santos, R. A. (2013). Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clinical science*, *124*(7), 443-456. doi: 10.1042/CS20120461

229. Paul, M., & Mehr, A. P. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev., 86*(3), 747-803. doi: 10.1152/physrev.00036.2005

230. Paulis, L., Foulquier, S., Namsolleck, P., Recarti, C., Steckelings, U. M., & Unger, T. (2016). Combined angiotensin receptor modulation in the management of cardio-metabolic disorders. *Drugs, 76*(1), 1-12. doi: 10.1007/s40265-015-0509-4

231. Pawlotsky, J. M., Negro, F., Aghemo, A., Berenguer, M., Dalgard, O., Dusheiko, G., ... & Wedemeyer, H. (2018). EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J Hepatol., 69*(2), 461-511. doi: 10.1016/j.jhep.2018.03.026

232. Petishko, O. P., Didenko, V. I., Klenina, I. A., Tatarchuk, O. M., & Konenko, I. S. (2020). Diagnostic markers of progression of fibrous changes of the liver in patients with chroni c diffuse diseases of alcoholic origin. *Bulletin of medical and biological research, 2020*(3), 47-52. doi: 10.11603/bmbr. 2706-6290.2020. 3.11295

233. Pinzani, M., Rombouts, K., & Colagrande, S. (2005). Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *Journal of Hepatology, 42*(1), 22-36. doi: 10.1016/j.jhep.2004.12.008

234. Piotrowska-Kempisty, H., Nowicki, M., Jodynis-Liebert, J., Kurpik, M., Ewertowska, M., Adamska, T., … & Kujawska, M. (2020). Assessment of hepatoprotective effect of Chokeberry juice in rats treated chronically with carbon tetrachloride. *Molecules, 25*(6), 1268. doi: 10.3390/molecules25061268

235. Poovorawan, K., Tangkijvanich, P., Chirathaworn, C., Wisedopas, N., Treeprasertsuk, S., Komolmit, P., & Poovorawan, Y. (2013). Circulating Cytokines

and Histological Liver Damage in Chronic Hepatitis B infection. *Hepatitis Research and Treatment, 2013,* 757246. doi: 10.1155/2013/757246

236. Povero, D., Busletta, C., Novo, E., di Bonzo, L. V., Cannito, S., Paternostro, C., & Parola, M. (2010). Liver fibrosis: adynamicand potentially reversible process. *Histol. Histopathol., 25*(8), 1075-1091. doi: 10.14670/HH-25.1075

237. Ramalho, F. S., Ramalho, L. N. Z., Castro-e-Silva Júnior, O., Zucoloto, S., & Corrêa, F. M. A. (2001). Angiotensin-converting enzyme inhibition by lisinopril enhances liver regeneration in rats. Braz J Med Biol Res., 34(1), 125-7. https://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000100016

238. Ramalho, F. S., Ramalho, L. N., Castro-e-Silva, O., Zucoloto, S., & Corrêa, F. M. A. (2002). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepatogastroenterology, 49*(47), 1347-1351. PMID: 12239940

239. Raucy, J. L., Kraner, J. C., & Lasker, J. M. (1993). Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Crit Rev Toxicol., 23*(1), 1-20. doi: 10.3109/10408449309104072

240. Rhyu, J., & Yu, R. (2021). Newly discovered endocrine functions of the liver. *World J Hepatol., 13*(11), 1611-1628. doi: 10.4254/wjh.v13.i11.1611

241. Rikalo, N. A., & Beregovenko, Y. M. (2016). Research of cell cycle phases and nuclear dnk ploidy in immature liver cella of rats with chronic toxic hepatitis and lisinopril correction. *Jornal of Education, Heals and Sport, 6*(1), 219-228.

242. Rikalo, N. A., & Yarovenko, L. A. (2015). Role of insulin-like growth factor-1 in pathogenesis of chronic alcoholic liver disease in rats of different age groups. *World of medicine and biology, 53*(4), 129-136.

243. Roberts, R. E., Cavalcante-Silva, J., Kineman, R. D., & Koh, T. J. (2021). Liver is a primary source of insulin-like growth factor-1 in skin wound healing. *J Endocrinol., 252*(1), 59-70. doi: 10.1530/JOE-21-0298

244. Rockey, D. C. (2005). Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol., 3*(2), 95-107. doi: 10.1016/s1542-3565(04)00445-8

245. Romak, O. I., Sadovska, Yu., & Goriuk, I. (2017). Liver morpho-fumctional changes and proinflammatory cytokines in experimental animals in case of cirrhosis. *Journal of Education, Health and Sport, 7*(3), 690-699.

246. Rudemiller, N. P., Pater, M. B., , Jian-Dong Zhang, Jeffs, A. D., Karlovich, N. S., Griffiths, R., … & Crowley, S. D. (2016). C-C Motif Chemokine 5 Attenuates Angiotensin II-Dependent kidney injury by limiting renal macrophage infiltration. *American journal of pathology, 186*(11), 2846-2856. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.07.015

247. Ruilope, L. M. (2005). Renin/angiotensin/aldosterone system blockade and renal protection: angiotensin/converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers? *Acta Diabetol., 42*(1), 33-41. doi: 10.1007/s00592-005-0179-x

248. Rykalo, N. A., & Berehovenko, Yu. M. (2018). The Relationship between Serum IGF-1 and Hydroxyproline Levels in the Rats with Chronic Toxic Hepatitis. *Journal Advanced biobank research and pathophysiology, 1*(1), 36-38.

249. Rykalo, N. A., Berehovenko, Yu. M., & Androshchuk, O. V. (2019). Morphological changes in kidney glomeruli of rats with chronic toxic hepatitis and its correction with lisinopril, L-arginine-L-glutamate and their combination. *Jornal of Education, Heals and Sport, 9*(5), 632-639.

250. Rykalo, N. A., Semenchuk, S. A., Ivanytsa, A. O., & Oliinyk, Y. M. (2020). Concentration of IGF-1 and TGF-β in the blood plasma of rats with chronic toxic hepatitis and its correction with lisinopril. *Azerbaijan Medical Journal, 5,* 89-95.

251. Saber, S., Godab, R., El-Tanboulya, G. S., & Ezzat, D. (2018). Lisinopril inhibits nuclear transcription factor kappa B and augments sensitivity to silymarin in experimental liver fibrosis. *International Immunopharmacology, 64,* 340-349. doi: 10.1016/j.intimp.2018.09.021

252. Saez, J. C., Bennett, M. V., & Spray, D. C. (1987). Carbon tetrachloride at hepatotoxic levels blocks reversibly gap junctions between rat hepatocytes. *Science, 236*(4804), 967-9. DOI: 10.1126/science.3576214

253. Safhi, M. M. (2018). Nephroprotective effect of Zingerone against CCl4-induced renal toxicity in Swiss albino mice: molecular mechanism. *Oxidative*

medicine and cellular longevity, *2018*, Article ID 2474831. https://doi.org/10.1155/2018/2474831

254. Sansoè, G., Aragno, M., & & Wong, F. (2020). Florence Wong. Pathways of hepatic and renal damage through non-classical activation of the renin-angiotensin system in chronic liver disease. *Liver International, 40*(1), 18-31. doi: 10.1111/liv.14272

255. Santos, R. A., & Ferreira, A. J. (2007). Angiotensin-(1-7) and the reninangiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens, 16*(2), 122-8. doi: 10.1097/MNH.0b013e328031f362

256. Santos, R. A., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T., & Bader, M. (2013). Angiotensinconverting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol., 216*(2), 1-17. doi: 10.1530/JOE-12-0341

257. Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C. H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D. A., & Schwabe, R. F. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med., 13*(11), 1324-32. doi: 10.1038/nm1663

258. Semenchuk, S. A. (2017). Effect of l-arginine l-glutamate on the morphofunctional state on the heart and liver in patients with postinfarction cardiosclerosis. *Вісник наукових досліджень, 3,* 35-38.

259. Serpaggi, J., Carnot, F., Nalpas, B., Canioni, D., Guéchot, J., Lebray, P., ... & Pol, S. (2006). Direct and indirect evidence for the reversibility of cirrhosis. *Human pathology*, *37*(12), 1519-1526. doi: 10.1016/j.humpath.2006.07.007

260. Serrano, G., Devriendt, N., Paepe, D., & de Rooster, H. (2021). Serum insulin-like growth factor-1 as a marker of improved liver function and surgical outcome in dogs with congenital extrahepatic portosystemic shunts. *Vet J., 274,* 105716. doi: 10.1016/j.tvjl.2021.105716

261. Shah, G. H., & Patel, B. G. (2017). Development of carbon tetrachloride-induced chronic hepatotoxicity model in rats and its application in evaluation of hepatoprotective activity of silymarin. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 10*(8), 274. DOI:10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18701

262. Shah, N., Silva, R. G., Kowalski, A., Desai, C., & Lerma, E. (2016). Hepatorenal syndrome. *Dis Mon., 62*(10), 364-375. https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2016.05.009

263. Shchudrova, T., Zamorskii, I., Kopchuk, T., Drachuk, V., Korotun, O., Dykal, M., … & Lomakina, Y. (2019). Renoprotective efficacy of pineal peptide and melatonin in drug-induced kidney injury. *Pharmacologyonline, 3,* 236-243.

264. Shim, K. Y., Eom, Y. W., Kim, M. Y., Kang, S. H., & Baik, S. K. (2018). Role of the renin-angiotensin system in hepatic fibrosis and portal hypertension. *Korean J Intern Med., 33*(3), 453-461. doi: 10.3904/kjim.2017.317

265. Siddiqi, N. J., & Alhomida, A. S. (2003). Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues. *J. Biochem. Mol. Biol., 36*(2), 154-158. doi: 10.5483/bmbrep.2003.36.2.154

266. Sikora, J. P., Chebna-Sokol, D., Andrzejewska, E., Chrul, S., Polakowska, E., Wysocka, A., & Sikora, A. (2008). Clinical evaluation of proinflammatory cytokine inhibitors (s TNFR I, s TFR II, IL -1), anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) and activation of neutrophils after burn-induced inflammation. *Scand. J. Immunol., 68*(2), 145-152. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02126.x

267. Silva, A. C. S. E., Miranda, A. S., Rocha, N. P., & Teixeira, A. L. (2017). Renin angiotensin system in liver diseases: Friend or foe? *World journal of gastroenterology, 23*(19), 3396-3406. doi: 10.3748/wjg.v23.i19.3396

268. Slater, T. F., Cheeseman, K. H., & Ingold, K. U. (1985). Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 311*(1152), 633-45. doi: 10.1098/rstb.1985.0169

269. Smuckler, E. A. (1976). Structural and functional changes in acute liver injury. *Environ Health Perspect, 15,* 13-25. doi: 10.1289/ehp.761513

270. Song, J. C., & White, C. M. (2002). Clinical pharmacokinetics and selective pharmacodynamics of new angiotensin converting enzyme inhibitors: an update. *ClinPharmacokinet., 41*(3), 207-224. doi: 10.2165/00003088-200241030-00005

271. Sowa, J. P., Atmaca, Ö., Kahraman, A., Schlattjan, M., Lindner, M., Sydor, S., … & Arteel, G. E. (2014). Non-invasive separation of alcoholic and non-alcoholic liver disease with predictive modeling. *PLoS One, 9*(7), e101444. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101444

272. Sowers, J. R., Sowers, P. S., & Peuler, J. D. (1993). Role of insulin resistance and hyperinsulinemia in development of hypertension and atherosclerosis. *J. Lab Clin Med., 123*(5), 647-652. PMID: 8195670

273. Stefano, J. T., Correa-Giannella, M. L., Ribeiro, C. M., Alves, V.A., Massarollo, P. C., Machado, M. C., … & & Giannella-Neto, D. (2006). Increased hepatic expression of insulin-like growth factor-I receptor in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol., 12*(24). 3821-3828. doi: 10.3748/wjg.v12.i24.3821

274. Stepanov, Yu. M., Didenko, V. I., Konenko, I. S., Klenina, I. A., Yagmur, V. B., & Petishko, O. P. (2019). Role of biochemical and hemodynamic indicators in assessing the progression of liver fibrosis of various origins. *Modern gastroenterology, 5,* 5-13. DOI:10.30978/MG-2019-5-5

275. Stoyanovsky, D. A., & Cederbaum, A. I. (1999). Metabolism of carbon tetrachloride to trichloromethyl radical: An ESR and HPLC-EC study. *Chem Res Toxicol., 12*(8), 730-6. doi: 10.1021/tx9900371

276. Sugimoto, H., Yang, C., LeBleu, V. S., Soubasakos, M. A., Giraldo, M., & Zeisberg, M. (2007.) BMP-7 functions as a novel hormone to facilitate liver regeneration. *FASEB J., 21*(1), 256-264. DOI:10.1096/fj.06-6837com

277. Sun, J. (2010). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases are essential for the inflammatory response in cancer cells. *Jurnal of Signal Transduction, 2010,* 985132. doi: 10.1155/2010/985132

278. Sun, L., Chow, P. K. H., Fook-Chong, S. M. C., Chew, M., Aw, S. E., & Soo, K. C. (1999). Liver regeneration after partial hepatectomy is non-uniform: flow cytometric bromodeoxyuridine incorporation and cell cycle studies in a porcine model. *Research in Experimental Medicine, 198,* 229-236. https://doi.org/10.1007/s004330050106

279. Sun, T., Huang, Z., Liang, W. C., Yin, J., Lin, W. Y., Wu, J., … & Arron, J. R. (2021). TGFβ2 and TGFβ3 isoforms drive fibrotic disease pathogenesis. *Sci Transl Med., 13*(605), eabe0407. doi: 10.1126/scitranslmed.abe0407

280. Sutherland, J. P., McKinley, B., & Eckel, R. H. (2004). The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord., 2*(2), 82-104. doi: 10.1089/met.2004.2.82

281. Tahashi, Y., Matsuzaki, K., Date, M., Yoshida, K., Furukawa, F., Sugano, Y., … & Inoue, K. (2002). Differential regulation of TGF-β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology, 35*(1), 49-61. doi: 10.1053/jhep.2002.30083

282. Tamura, K., Tanaka, Y., Tsurumi, Y., Azuma, K., Shigenaga, A., Wakui, H., … & Matsuda, M. (2007). The role of angiotensin AT1 receptor-associated protein in renin-angiotensin system regulation and function. *Curr Hypertens Rep., 9*(2), 121-7. doi: 10.1007/s11906-007-0022-6

283. Tandon, P., Abraldes, J. G., Berzigotti, A., Garcia-Pagan, J. C., & Bosch, J. (2010). Renin-angiotensin-aldosterone inhibitors in the reduction of portal pressure: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol., 53*(2), 273-282. doi: 10.1016/j.jhep.2010.03.013

284. Teschke, R. (2018). Liver Injury by Carbon Tetrachloride Intoxication in 16 Patients Treated with Forced Ventilation to Accelerate Toxin Removal via the Lungs: A Clinical Report. *Toxics, 6*(2), 25. doi: 10.3390/toxics6020025

285. Thangapandi, V. R., Knittelfelder, O., Brosch, M., Patsenker, E., Vvedenskaya, O, Buch, S., … & Subramanian, P. (2021). Loss of hepatic Mboat7 leads to liver fibrosis. *Gut, 70*(5), 940-950. doi: 10.1136/gutjnl-2020-320853

286. Tigerstedt, R., & Bergman, P. Q. (1898). Niere und Kreislauf 1. *Skandinavisches Archiv für Physiologie, 8*(1), 223-271. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1898.tb00272.x

287. Toblli, J. E., Munoz, M. C., Cao, G., Mella, J., Pereyra, L., & Mastai, R. (2008). ACE inhibition and AT1-receptor blockade prevent fatty liver and fibrosis

in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring), 16*(4), 770-776. doi: 10.1038/oby.2007.114

288. Tong, Z. W., Gul, H., Awais, M., Saddick, S., Khan, F. S., Gulfraz, M., ... & Khan, M. I. (2021). Determination of in vivo biological activities of Dodonaea viscosa flowers against CCL4 toxicity in albino mice with bioactive compound detection. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-15. doi: 10.1038/s41598-021-92638-6

289. Tsai, C. L., Wang, C. H., Pan, C. Y., & Chen, F. C. (2015). The effects of long-term resistance exercise on the relationship between neurocognitive performance and GH, IGF-1, and homocysteine levels in the elderly. *Frontiers in behavioral neuroscience, 9,* 23. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00023

290. Türkay, C., Yönem, O., Arici, S., Koyuncu, A., & Kanbay, M. (2008). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on experimental hepatic fibrogenesis. *Dig Dis Sci., 53*(3), 789-93. doi: 10.1007/s10620-007-9941-y

291. Varga, Z. V., Matyas, C., Paloczi, J., & Pacher, P. (2017). Alcohol misuse and kidney injury: epidemiological evidence and potential mechanisms. *Alcohol Res., 38*(2), 283-288.

292. Veenman, L., & Gavish, M. (2006). The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacology & therapeutics, 110*(3), 503-524. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.09.007

293. Wahl, S. M., Wen, J., & Moutsopoulos, N. (2006). TGF-β: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunological reviews, 213*(1), 213-27. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00437.x

294. Wallek, G., Friedrich, N., Ittermann, T., Mayerle, J., Völzke, H., Nauck, M., & Spielhagen, C. (2013). IGF-1 and IGFBP-3 in patients with liver disease/IGF-1 und IGFBP-3 bei Patienten mit Lebererkrankungen. *Laboratoriumsmedizin, 37*(1), 13-20. DOI: 10.1515/labmed-2012-0032

295. Wang, H., Che, J., Cui, K., Zhuang, W., Li, H., Sun, J., … & Wang, C. (2021). Schisantherin A ameliorates liver fibrosis through TGF-β1mediated activation of

TAK1/MAPK and NF-κB pathways in vitro and in vivo. *Phytomedicine, 88,* 153609. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153609

296. Weber, L. W., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol., 33*(2), 105-36. DOI: 10.1080/713611034

297. Wei Y, Tanaka M, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, … & Shindo T. (2021). Adrenomedullin Ameliorates Pulmonary Fibrosis by Regulating TGF-ß-Smads Signaling and Myofibroblast Differentiation. *Endocrinology, 162*(8), bqab090. doi: 10.1210/endocr/bqab090

298. Wei, G., An, P., Vaid, K. A., Nasser, I., Huang, P., Tan, L., … & Popov, Y. V. (2020). Comparison of murine steatohepatitis models identifies a dietary intervention with robust fibrosis, ductular reaction, and rapid progression to cirrhosis and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol., 318*(1), 174-188. doi: 10.1152/ajpgi.00041.2019

299. Wieckowska, A., Papouchado, B. G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N. N., & Feldstein, A. E. (2008). Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J. Gastroenterol., 103*(6), 1372-1379. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x

300. Wu, D., Zhang, L., Ma, S., Zhao, Y., Chen, R., Zhang, F., … & Xie, Z. (2021). Low Growth Hormone Levels Predict Poor Outcome of Hepatitis B Virus-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. *Front Med (Lausanne), 8,* 655863. doi: 10.3389/fmed.2021.655863

301. Wu, L. X., & Wu, X. (2021). Effects of interleukin-11 antagonist on pulmonary fibrosis in mice. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi., 37*(3), 308-312. doi: 10.12047/j.cjap.6047.2021.015

302. Xiao, Z., Ji, Q., Fu, Y. D., Gao, S. Q., Hu, Y. H., Liu, W., … & Liu, P. (2021). Amygdalin Ameliorates Liver Fibrosis through Inhibiting Activation of TGF-β/Smad Signaling. *Chin J Integr Med., 2021.* doi: 10.1007/s11655-021-3304-y

303. Yang, A., Yan, X., Xu, H., Fan, X., Zhang, M., Huang, T., … & You, H. (2021). Selective depletion of hepatic stellate cells-specific LOXL1 alleviates liver fibrosis. *FASEB J., 35*(10), e21918. doi: 10.1096/fj.202100374R

304. Yang, S. Q., Lin, H. Z., Yin, M., Albrecht, J. H., & Diehl, A. M. (1998). Effects of chronic ethanol consumption on cytokine regeneration. *Gastrointestinal and liver physiology, 275*(4), 696-704. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.4.G696

305. Yang, X., Shu, B., Zhou, Y., Li, Z., & He, C. (2021). Ppic modulates CCl4-induced liver fibrosis and TGF-β-caused mouse hepatic stellate cell activation and regulated by miR-137-3p. *Toxicol Lett., 350,* 52-61. doi: 10.1016/j.toxlet.2021.06.021

306. Yang, Y., Sun, M., Li, W., Liu, C., Jiang, Z., Gu, P., … & Wang, H. (2021). Rebalancing TGF-β/Smad7 signaling via Compound kushen injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. *Clin Transl Med., 11*(7), e410. doi: 10.1002/ctm2.410

307. Yao, J., Lin, C., Jiang, J., Zhang, X., Li, F., Liu, T., & Diao, H. (2021). lncRNA-HEIM Facilitated Liver Fibrosis by Up-Regulating TGF-β Expression in Long-Term Outcome of Chronic Hepatitis B. *Front Immunol., 12,* 666370. doi: 10.3389/fimmu.2021.666370

308. Yayama, K., Sugiyama, K., Miyagi, R., & Okamoto, H. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitor enhances liver regeneration following partial hepatectomy: involvement of bradykinin B2 and angiotensin AT1 receptors. *Biol Pharm Bull., 30*(3), 591-594. doi: 10.1248/bpb.30.591

309. Yim, H. E., Yoo, K. H., Bae, I. S., & Hong, Y. S. (2017). Early Treatment with enalapril and leter renal injury in programmed obese adult rats. *Journal of cellular physiology, 232*(2), 447-455. doi: 10.1002/jcp.25444

310. Yue, H., Cai, W., Li, Y., Feng, X., Dong, P., Xue, C., & Wang, J. J. (2021). A Novel Sialoglycopeptide from Gadus morhua Eggs Prevents Liver Fibrosis Induced by CCl4 via Downregulating FXR/FGF15 and TLR4/TGF-β/Smad Pathways. *Agric Food Chem., 69*(44), 13093-13101. doi: 10.1021/acs.jafc.1c05411

311. Yufan Zheng, Baiping Cui, Wenrui Sun, Sining Wang, Xu Huang, Han Gao, … & Ning Sun (2020). Potential Crosstalk between Liver and Extra-liver Organs in Mouse Models of Acute Liver Injury. *International Journal of Biological Sciences, 16*(7), 1166-1179. doi: 10.7150/ijbs.41293

312. Zhan, S. S., Jiang, J. X., Wu, J., Wu, J., Halsted, C., Friedman, S. L., … & Torok, N. J. (2006). Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology, 43*(3), 435-443. doi: 10.1002/hep.21093

313. Zhang, X., Mo, F., Wang, W., Li, F., La, Y., Liu, T., … & Li, C. (2022). Effects of starter feeding and early weaning on developmental expressions of IGF-I gene in liver and IGF-IR gene in rumen of lambs from birth to eighty-four days of age. *Anim Biotechnol., 4,* 1-8. doi: 10.1080/10495398.2022.2047993

314. Zhang, X., Wong, G. L. H., Yip, T. C. F., Tse, Y. K., Liang, L. Y., Hui, V. W. K., ... & Wong, V. W. S. (2021). ACE inhibitors prevent liver-related events in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology, 2021,* doi: 10.1002/hep.32294

315. Zhang, Y., Miao, H., Guan, H., Wang, C., Wang, Z., & Ji, L. (2019). Long-term diosbulbin B treatment induced liver fibrosis in mice. *Chemico-Biological Interactions*, *298*, 15-23. doi: 10.1016/j.cbi.2018.10.015

316. Zhao, T., Zhu, Y., Yao, L., Liu, L., & Li, N. (2021). IGF-1 alleviates CCL4-induced hepatic cirrhosis and dysfunction of intestinal barrier through inhibition TLR4/NF-κB signaling mediated by down-regulation HMGB1. *Ann Hepatol., 26,* 100560. doi: 10.1016/j.aohep.2021.100560

317. Zhu, Q., Li, N., Li, F., Zhou, Z., Han, Q., Lv, Y., Sang, J., & Liu, Z. (2016). Therapeutic effect of renin angiotensin system inhibitors on liver fibrosis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst., 17*(1), 1470320316628717. doi: 10.1177/1470320316628717

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Рикало, Н. А., & Олійник, Ю. М. (2022). Вплив лізиноприлу та L-аргініну L-глутамату на біохімічні маркери фіброзу в організмі щурів за хронічного токсичного гепатиту. Фармакологія та лікарська токсикологія, 16(3), 187-194. https://doi.org/10.33250/16.03.187
2. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017). Визначення сироваткових фракцій гідроксипроліну при хронічному токсичному гепатиті у щурів на тлі корекції лізиноприлом та глутаргіном. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія, 78*(2), 61-65. http://ecpb.org.ua/pdf/78/2/78.02.061.pdf
3. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017). Структурні зміни епітеліального та клубочкового компонентів нирок щурів при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. *Актуальні проблеми транспортної медицини, 48*(2), 104-109. http://nbuv.gov.ua/UJRN/aptm_2017_2_21
4. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2016). Структурні зміни тканини печінки щурів при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом/ *Експериментальна та клінічна медицина, 71*(2), 151-155. https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/3354

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

5. Береговенко, Ю. М., & Рикало, Н. А. (2014). Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки. *Вісник Вінницького*

національного медичного університету, 18(2), 632-635. http://nbuv.gov.ua/UJRN/vvnmu_2014_18_2_78

6. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2014а). Патент України 94073. Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки. Київ: Державне патентне відомство України. https://dspace.vnmu.edu.ua/123456789/1372.
7. Rykalo N. A., Berehovenko, Yu. M., & Androshchuk, O. V. (2019). Morphological changes in kidney glomeruli of rats with chronic toxic hepatitis and its correction with lisinopril, L-arginine-L-glutamate and their combination. *Jornal of Education, Heals and Sport, 9*(5), 632-639. DOI http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3254959
8. Rykalo N. A., & Berehovenko, Yu. M. (2018). The Relationship between Serum IGF-1 and Hydroxyproline Levels in the Rats with Chronic Toxic Hepatitis. *Journal Advanced biobank research and pathophysiology, 1*(1), 36-38. https://dspace.vnmu.edu.ua/handle/123456789/5647
9. Rikalo, N. A., & Beregovenko, Y. M. (2016). Research of cell cycle phases and nuclear dnk ploidy in immature liver cella of rats with chronic toxic hepatitis and lisinopril correction. *Jornal of Education, Heals and Sport, 6*(1), 219-228. **DOI http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.45343**

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

10. Береговенко, Ю. М. (2014). Вплив інгібіторів ангіотензин перетворюючого ферменту (і-АПФ) при фіброзі печінки. *Перший крок в науку 2014, Матеріали V міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених* (с. 9-10). Вінниця: ВНМУ.
11. Береговенко, Ю. М. (2015). Перспективи патогенетичного лікування хронічних хвороб печінки. *Перший крок в науку 2015, Матеріали VI міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених* (с. 37). Вінниця: ВНМУ.
12. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2015). Плоїдність ядерної ДНК

клітин печінки статевонезрілих щурів при хронічному токсичному гепатиті та патогенетичній корекції лізиноприлом. *Досягнення клінічної фармакології а фармакотерапії, Матеріали VIII Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю* (с. 213-215). Вінниця: ВНМУ.

13. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2015). Молекулярні механізми проліферації клітин печінки щурів при хронічному токсичному гепатиті та патогенетичній корекції лізиноприлом. *Молекулярні механізми патологічних станів, Матеріали наук.-практ. конф., 16 жовтня 2015 р. м. Харків*. *Український біофармацевтичний журнал, 40*(5), 56.
14. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2015). Визначення проліферативного потенціалу гепатоцитів при хронічному токсичному гепатиті та патогенетичній корекції лізиноприлом. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм, Матеріали VIII наук.-практ. конф.* (с. 77-78). Тернопіль: ТДМУ.
15. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2017). Фрагментація ядерної ДНК кіркової речовини нирок в умовах хронічного токсичного гепатиту та при медикаментозній корекції. *Прикладні аспекти морфології, Матеріали наук.-практ. конф., присвяченої пам'яті професорів морфологів Терентьєва Г. В., Роменського О. Ю., Когана Б. Й., Шапаренка П. П., Жученка С. П.* (с. 139-141). Вінниця: ВНМУ.
16. Береговенко, Ю. М. (2017). Вплив лізиноприлу на вміст сироваткового TGF-β1 при хронічному токсичному гепатиті у щурів. *Перший крок в науку 2017, Матеріали XIV міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених* (с. 11-12). Вінниця: ВНМУ.
17. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2018). Морфологічні аспекти стану канальцевого компоненту нирок при моделюванні хронічного токсичного гепатиту та корекції лізиноприлом. *Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу, Матеріали наук.-практ. конф. з*

міжнар. участю (с. 62-64). Одеса.

18. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2018). Динаміка вмісту у сироватці крові протизапального цитокіну IGF-1 при хронічному токсичному гепатиті у щурів та його корекції лізиноприлом. *Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики, Матеріали VII пленуму укр. наук. товариства патофізіологів та наук.-практ. конф., прясвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка* (с. 7-8). Полтава.
19. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2018). Структурні зміни канальцевого компоненту нирок щурів при хронічному токсичному гепатиті та його медикаментозній корекції. *Advances of science, Proceedings of articles the international scientific conference* (p. 83-87). Czech Republic, Karlovy Vary – Ukraine, Kyiv: MCNIP.
20. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2019). Порушення структури та фаз клітинного циклу гепатоцитів та клітин нирок щурів при хронічному токсичному гепатиті. *Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря, Матеріали XVI міжнар. наук.-практ. конф.* (с. 97-98). ВНМУ.
21. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2019). Порушення структури епітеліального компоненту нирок щурів при хронічному токсичному гепатиті. *Перший крок в науку 2019, Матеріали XIV міжнар. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених* (с. 426). Вінниця: ВНМУ.
22. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2020). Пептидно-зв'язаний гідроксипролін як маркер фібротичних змін тканини печінки. *Від експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації, Матеріали II наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнародною участю,* (с. 176-178). Харків: НФаУ.
23. Рикало, Н. А., & Береговенко, Ю. М. (2020). Фази клітинного циклу ядерної ДНК клітин кіркової речовини нирок щурів з

експериментальним хронічним токсичним гепатитом. *Охорона та захист здоров'я людини в умовах сьогодення, Матеріали міжнар. наук.-практ. конф.* (с. 45-49). Київ: Київський медичний науковий центр.

24. Rykalo, N., & Oliinyk, Y. (2020). Disorder of the kidneys' glomeruli at chronic toxic ccl4-induced hepatitis in rats and with pathogenetical treatment. *Science and practice of today, Materials IX International Scientific and Practical Conference* (p. 362-365). Ankara, Turkey.

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

- V міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених, м. Вінниця, 2014 (усна доповідь);
- VI міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених, м. Вінниця, 2015 (усна доповідь);
- XIV міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку 2017», м. Вінниця, 2017 (усна доповідь);
- науково-практичної конференції «Патофізіологія нирок та водно-сольового гомеостазу», м. Одеса, 2018 (усна доповідь);
- VII пленумі українського науковго товариства патофізіологів та науково-практичної конференції, прясвячених 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», м. Полтава, 2018 (стендова доповідь);
- XIV міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Перший крок в науку 2019», м. Вінниця, 2019 (усна доповідь).

ДОДАТОК Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕНЬ

Затверджую

Проректор з науково- педагогічної роботи

ВНМУ імені М.І. Пирогова

Проф. Гумінський Ю.Й.

«29» червня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи Олійник Юлії Михайлівни

в науково-педагогічний процес

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** «Зменшення патогенно-індукованого апоптозу при хронічних хворобах печінки, шляхом інгібування ангіотензинперетворюючого ферменту».
2. **Ким запропоновано:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова , кафедра патологічної фізіології, 21018, м. Вінниця, вул. М.І. Пирогова, 56, Олійник Ю.М., Рикало Н.А.
3. **Джерело інформації:**
   1. Пат. № 94073 України, МПК (2015) G09B 23/28. Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки / Н. А. Рикало, Ю. М. Береговенко; власник Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова. – № u 2014 05605 опубл. 27.10.2014, Бюл. № 20.
   2. Береговенко Ю.М. Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки / Береговенко Ю.М., Рикало Н.А.// Вісник Вінницького національного медичного університету – 2014. – №2. (Т. 18) – С. 632-635.
4. **Де впроваджено:** на кафедрі клінічної фармації та клінічної фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова
5. **Термін впровадження:** 2020-2021 н.р.
6. **Форма впровадження:** у науково-дослідному та навчальному процесі в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темою: «Клінічна фармакологія хвороб печінки»
7. **Результати впровадження:** використання результатів наукових досліджень Олійник Ю.М. у науковому та педагогічному процесі дає змогу розширити уявлення про антиапоптичні властивості інгібіторів ангіотензинперетворючого ферменту при хронічних токсичних гепатитах.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри клінічноїфармації

та клінічної фармакології ВНМУ ім. М.І. Пирогова

доктор медичних наук

професор Яковлева Ольга Олександрівна

протокол № 23

від 29.06.2021 р.

ДОДАТОК Б (продовження)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Проректор з науково-педагогічної роботи
Буковинського державного медичного університету
доц. І. В. Геруш
«18» червня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів дисертаційної роботи Олійник Юлії Михайлівни
в науково-педагогічний процес

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** «Зменшення патогенно-індукованого апоптозу при хронічних хворобах печінки, шляхом інгібування ангіотензинперетворюючого ферменту».
2. **Ким запропоновано:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова , кафедра патологічної фізіології, 21018, м. Вінниця, вул. М.І. Пирогова, 56, Олійник Ю.М., Рикало Н.А.
3. **Джерело інформації:**
   1. Пат. № 94073 України, МПК (2015) G09B 23/28. Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки / Н. А. Рикало, Ю. М. Береговенко; власник Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова. – № u 2014 05605 опубл. 27.10.2014, Бюл. № 20.
   2. Береговенко Ю.М. Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки / Береговенко Ю.М., Рикало Н.А.// Вісник Вінницького національного медичного університету – 2014. – №2. (Т. 18) – С. 632-635.
4. **Де впроваджено:** на кафедрі фармакології Буковинського державного медичного університету.
5. **Термін впровадження:** 2020-2021 н.р.
6. **Форма впровадження:** у науково-дослідному та навчальному процесі в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темами: «Гепатопротектори», «Антигіпертензивні засоби».
7. **Результати впровадження:** використання результатів наукових досліджень Олійник Ю.М. у науковому та педагогічному процесі дає змогу розширити уявлення про антиапоптичні властивості інгібіторів ангіотензинперетворючого ферменту при хронічних токсичних гепатитах.
8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

протокол № 21 від 18.06.2021 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фармакології
Буковинського державного медичного університету
доктор медичних наук, професор
Заморський Ігор Іванович

ДОДАТОК Б (продовження)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського
МОЗ України
_____проф. А. Г. Шульгай
керівник закладу, в якому проведено впровадження
«23» червня 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів дисертаційної роботи Олійник Юлії Михайлівни
в науково-педагогічний процес

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** «Зменшення патогенно-індукованого апоптозу при хронічних хворобах печінки, шляхом інгібування ангіотензинперетворюючого ферменту».

2. **Ким запропоновано:** Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова , кафедра патологічної фізіології, 21018, м. Вінниця, вул. М.І. Пирогова, 56, Олійник Ю.М., Рикало Н.А.

3. **Джерело інформації:**

1. Пат. № 94073 України, МПК (2015) G09B 23/28. Спосіб моделювання патогенетичного лікування апоптозу гепатоцитів при хронічних хворобах печінки / Н. А. Рикало, Ю. М. Береговенко; власник Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова. – № u 2014 05605 опубл. 27.10.2014, Бюл. № 20.

2. Береговенко Ю.М. Роль ренін-ангіотензин-альдостеронової системи у патології печінки / Береговенко Ю.М., Рикало Н.А.// Вісник Вінницького національного медичного університету – 2014. – №2. (Т. 18) – С. 632-635.

4. **Де впроваджено:** на кафедрі медицини катастроф та військової медицини Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського

5. **Термін впровадження:** 2020-2021 н.р.

6. **Форма впровадження:** у науково-дослідному та навчальному процесі в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темою: «Екстрена допомога при захворюваннях внутрішніх органів».

7. **Результати впровадження:** використання результатів наукових досліджень Олійник Ю.М. у науковому та педагогічному процесі дає змогу розширити уявлення про антиапоптичні властивості інгібіторів ангіотензинперетворючого ферменту при хронічних токсичних гепатитах.

8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

протокол № 18 від 23 червня 2021 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри медицини катастроф
та військової медицини ТНМУ
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
доктор медичних наук,
професор _____ Гудима Арсен Арсенович