

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології
**Моделювання фіброзу печінки на експериментальних
тваринах**

Допущена до захисту

«__»_____20 р.

Кваліфікаційна робота
студентки кафедри
молекулярної біології та біотехнології
Панкратової А.О.

Науковий керівник:
д-р. біол. наук, Божков А.І.

Завідувач кафедри _____

Оцінка «_____»

«__»_____20 р.

Харків 2023

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	3
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Анатомія печінки та характеристика її клітин.....	6
1.2. Захворювання печінки та їхні механізми	8
1.3. Тваринні моделі експериментального фіброзу печінки	13
1.3.1. Модель фіброзу печінки, індукованого хімічними сполуками....	14
1.3.2. Методи створення моделей фіброзу печінки, не пов'язаних з хімічними речовинами	23
1.3.3. Комбінування індукційних методів	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1. Стійкість молодих та старих тварин до хронічної дії алкоголю.....	32
3.2. Зміна відносної маси печінки та селезінки у молодих та старих тварин після довготривалого прийому алкоголю.....	34
3.3. Динаміка активності алкогольдегідрогенази в печінці молодих та старих щурів на тлі довготривалого прийому алкоголю	36
3.4. Вміст карбонільованих білків у мітохондріальній фракції печінки молодих та старих тварин при довготривалому прийомі алкоголю	38
ВИСНОВКИ.....	41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

2,4-ДНФГ – 2,4-динітрофенілгідразин

АДГ – алкогольдегідрогеназа

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АСТ – аспартатамінотрансфераза

АХП – алкогольні хвороби печінки

АФК – активні форми кисню

КБ – карбонільовані білки

КФ – капсульний фіброз

ФП – фіброз печінки

DEN – діетилнітрозамін

DMN – диметилнітрозамін

ECM – позаклітинний матрикс

HFD – дієта з високим вмістом жиру

HSC – зірчасті клітини печінки

LDC – дієта Лібера-ДеКарлі

TAA – тіоацетамід

ВСТУП

Печінка є одним з найголовніших органів в організмі людини, яка виконує безліч функцій, і через це вона однією з перших приймає на себе удар при захворюванням, перенавантаженні отруйними речовинами, стресі. Серед усіх хвороб, пов'язаних з печінкою, алкогольні хвороби печінки посідають перше місце за рівнем смертності. Надмірне вживання алкоголю є причиною широкого спектру захворювань печінки, починаючи від легкого стеатозу та завершуючи гепатоцелюлярною карциномою. Не останнє місце серед цих хвороб посідає фіброз печінки [16, 19].

Фіброз печінки є оборотним процесом, однак якщо вчасно не звернути на нього увагу та допустити хронічне ураження печінки, він прогресує до більш серйозних стадій, які важко піддаються лікуванню. У найважчих випадках єдиним доступним варіантом на даний момент лишається трансплантація печінки. Саме тому важливо вивчати механізми розвитку фіброзу печінки та ідентифікувати усі речовини та клітини, які приймають участь у його прогресуванні та деградації [17].

З цією метою вже кілька десятиліть створюються різноманітні експериментальні моделі *in vivo* на тваринах, серед яких однією з найпоширеніших є модель алкогольного ураження печінки. Створення відповідної тваринної моделі фіброзу печінки не тільки дозволить досконально вивчити усі задіяні у ньому механізми, а й ще оцінити ефективність препаратів, розроблених для лікування фіброзу [10, 23].

Метою цієї роботи є опис патологій печінки, спричинених алкоголем, а також аналіз існуючих моделей експериментального фіброзу печінки на тваринах та моделювання алкогольного фіброзу печінки у щурів.

Завданнями кваліфікаційної роботи є:

- розглянути основні механізми розвитку алкогольних захворювань печінки;

- оцінити існуючі методи індукції експериментального фіброзу печінки на тваринах;
- створити модель алкогольного ураження печінки на експериментальних тваринах.

Об'єктом дослідження є 3-х місячні та 20-ти місячні щури лінії *Wistar*. Предметом дослідження – печінка та ферменти, які характеризують її стан.

При виконанні роботи були використані такі теоретичні методи дослідження, як аналіз наукової літератури, передусім праць R. Bataller, S. Wu та S. Crespo Yanguas; моделювання, а також практичні методи: експеримент, спостереження та вимірювання.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Анатомія печінки та характеристика її клітин

Здорова печінка – це м'яка тканина, вкрита сполучною оболонкою, яка має назву капсула Гліссона. Сама печінка складається з паренхіми, яка є функціональною тканиною і поділяється на функціональні одиниці – часточки. Вони є багатокутними, кожна завбільшки 1-2 мм в діаметрі і складається з поєднаних між собою організованих пластинок гепатоцитів, розділених синусоїдами, вистеленими ендотелієм. Кожну часточку перетинає централобулярна вена. Пластинки гепатоцитів випромінюються від централобулярної вени до периметра часточки, тоді як портальна триада (ворітна вена, печінкова артерія та жовчна протока) і навколишня сполучна тканина найчастіше розташовуються під кутами багатокутника [12, 21].

Капсула Гліссона є сполучною тканиною, яка вкриває ворітну вену, печінкову артерію та жовчну протоку в портальній триаді, а також присутня під поверхнею печінки (рис 1.1). Вона відповідає за збереження тканини печінки в цілості. Товщина цієї капсули залежить від виду, вона може становити 30–90 мкм у людини, 5 мкм у щура та 93 у для печінки великої рогатої худоби. У здоровій печінці людини поверхня містить багат шарові капсульні фібробласти, а жовчні протоки присутні під мезотелієм. На відміну від людини, у гризунів жовчні протоки відсутні під поверхнею печінки, а сама поверхня складається лише з одного шару капсульних фібробластів [1, 21].

Товщина капсули Гліссона є нерівномірною, а під час прогресування захворювань печінки, фіброзу або цирозу, відбувається її потовщення (рис.1.1) [24].

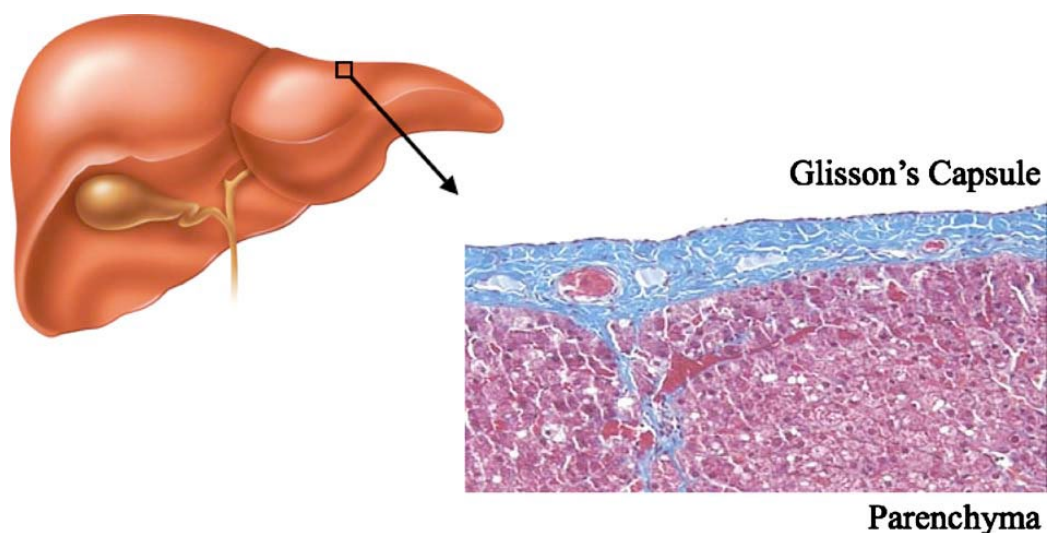


Рис. 1.1. Загальна анатомія печінки та капсула Гліссона на її поверхні [18]

Печінка складається з різноманітних печінкових фібро генних клітин: зірчастих клітин, порталних фібробластів, фібробластів капсули Гліссона, клітин гладких м'язів судин, а також клітин, розташованих навколо централобулярних вен [12].

Печінкові зірчасті клітини складаються близько 5-8% серед інших клітин у здоровій печінці і розташовані у просторі Діссе, де вони характеризуються перисинусоїдальним розподілом та довгими відростками, що тягнуться вздовж та навколо синусоїдів між пластинками гепатоцитів. Зв'язок між зірчастими клітинами та синусоїдальними трубками є однією з найголовніших особливостей цих клітин. Зазвичай вони слугують сховищем ліпідів вітаміну А та експресують десмін [1, 12].

Під час стресу або травми печінкові зірчасті клітини активуються та змінюють свій фенотип на міофібробластоподібний, втрачаючи ліпідні краплі вітаміну А. Активовані зірчасті клітини проліферують і скорочуються, сприяють відкладенню позаклітинного матриксу, що відслідковується при розвитку фіброзу та цирозу. Вони починають продукувати альфа-актин гладких м'язів та матриксні металопротеїнази разом з їх специфічними тканинними інгібіторами. Матриксні металопротеїнази відповідають за деградацію білків ЕСМ, а різні комбінації металопротеїназ та їх інгібіторів призводить до пізніх стадій

ураження печінки, коли вони починають руйнувати нормальний матрикс печінки і зупиняється деградація фібрилярних колагенів, накопичуваних при фіброзі [10, 12].

Мезотеліальні клітини утворюють мезотелій на поверхні печінки та демонструють проміжний фенотип між епітеліальними клітинами та мезенхімальними клітинами. Але після пошкодження печінки мезотеліальні клітини утворюють міофібробласти, особливо при фіброзі печінки. У нормальній печінці міофібробласти майже відсутні, на них перетворюються власні клітини печінки. Зокрема ними можуть стати капсульні фібробласти або зірчасті клітини печінки, і саме вони експресують позаклітинний матрикс [1, 4].

1.2. Захворювання печінки та їхні механізми

Тривале вживання алкоголю пошкоджує печінку та викликає різні форми ураження печінки, починаючи від алкогольного стеатозу до раку печінки. Зокрема, вживання алкоголю є причиною близько 50% випадків цирозу печінки у людей по всьому світу, а алкогольна хвороба печінки (АХП) є основною причиною захворювань та смертності, пов'язаних з печінкою, так як саме вона є головною мішенню алкоголю. Окрім алкоголю, причинами фіброзу печінки у розвинених країнах також є інфекції вірусного гепатиту В і С, ожиріння та діабет, у менш розвинених також вражають паразитарні інфекції, наприклад, шистосомоз [19, 22].

АХП є багатоступеневим процесом, який зазвичай проходить через наступні стадії: алкогольний стеатоз (запалення печінки), алкогольний гепатит, фіброз та цироз печінки, які врешті решт призводять до гепатоцелюлярної карциноми. Алкогольний гепатит при цьому є специфічним захворюванням, який швидко прогресує до цирозу печінки та печінкової недостатності. Важливим є те, що ці стадії не обов'язково йдуть окремо, а можуть бути присутніми одночасно в однієї людини (наприклад, алкогольний гепатит з фіброзом) [16, 19].

Деякі генетичні фактори можуть впливати на тяжкість стеатозу, фіброзу, а також на загальну схильність людини прогресувати до важких форм АХП. Наявність певних генних поліморфізмів, таких як пататин-подібний домен фосфоліпази, що містить білок 3 (ген PNPLA3)⁸ та індукція гена 11 β -HSD1 та експресія мРНК44, підвищує ризик і тяжкість АХП. Також великий вплив мають гени, що кодують ферменти, відповідальні за метаболізм алкоголю – алкогольдегідрогеназу, CYP2E1 та ацетальдегіддегідрогеназу [3, 14].

Фіброз печінки є реакцією загоєння ран при хронічних ураженнях печінки і є ключовим етапом, який впливає на прогноз хронічного захворювання. Він пов'язаний з надмірним накопиченням колагену та інших білків в позаклітинному матриксі печінки. Фіброз і регенерація гепатоцитів є прямими наслідками постійного запалення і деструкції гепатоцитів. Поки сам фіброз є оборотним, його ускладнення є серйознішими та не завжди піддаються лікуванню. Подальший розвиток може призвести до структурних порушень печінки, переродження гепатоцитів та формування цирозу [8, 24].

Фіброгенез печінки є динамічним процесом, який включає складні клітинні та молекулярні механізми, які призводять до хронічної активації механізмів відновлення тканин, які слідує за повторними пошкодженнями печінки. При некрозі клітин та пошкодженнях позаклітинного матриксу відбувається відновлення тканин, коли мертві клітини змінюються нормальною тканиною шляхом проліферації тих, що вижили, з утворенням грануляційної тканини та рубця. Регенеративні здатності печінки дозволяють їй майже повністю відновлюватися після гострих пошкоджень, але при хронічних хворобах вони не заживають ефективно [9, 12].

Одним з перших етапів відновлення тканин включає залучення запальних клітин для нейтралізації можливих інфекційних агентів і видалення некротичної тканини. Зірчасті клітини печінки рекрутуються в

місце пошкодження та активуються, що призводить до зміни фенотипу та підвищення рухливих, проліферативних та скоротливих властивостей. Виробництво позаклітинного матриксу активованими зірчастими клітинами вважається ключовою подією при фіброгенезі печінки, у чому також беруть участь інші клітини, такі як порталні фібробласти та міофібробласти кісткового мозку [9, 22].

Разом з зірчастими клітинами, тромбоцити одними з перших залучаються до місця пошкодження та приймають участь у загоєнні ран, обмежуючи крововтрату шляхом утворення агрегатів на кінцях пошкоджених судин. Вони також перетворюють фібрин на фібриноген. Тромбоцити також діють як хемоаттрактантом для фібробластів, запальних клітин і гладком'язових клітин судин [9].

У відповідь на пошкодження тканин виникає запалення, а після нього розвивається грануляційна тканина, яка сприяє заміщенню пошкодженої тканини. Ця тканина характеризується проліферацією фібробластів, ангиогенезом та відкладенням позаклітинного матриксу. Протягом процесу відновлення тканини фібробласти набувають властивостей гладкої мускулатури, характерних для міофібробластів. Вони оточені неправильною базальною мембраною та є основним типом клітин, який бере участь у відкладенні позаклітинного матриксу при відновленні тканин. Проте, одночасно, саме міофібробласти синтезують ферменти, відповідальні за деградацію матриксу, ремоделювання тканин та утворення рубців [12].

В організмі людини печінка є основним органом, відповідальним за метаболізм алкоголю. Фіброз, який розвивається при АХП, може бути спричинений різними механізмами, в тому числі накопиченням ацетальдегіду, активним форм кисню (АФК) і перевантаженням печінки ендогенним ліпополісахаридом. Хронічне зловживання алкоголем призводить до надмірного виробництва АФК та перешкоджає метаболізму ліпідів у печінці, що спричинює пошкодження гепатоцитів. Додатково, при

фіброзі, спричиненому зловживанням алкоголем, спостерігається сильна імунна відповідь зі збільшенням виробництва цитокінів, хемокінів, що і призводить до активації зірчастих клітин і згодом спричинює фіброз печінки. Загальні механізми фіброзу печінки включають загибель гепатоцитів, запалення та активацію клітин Купфера [3, 23].

Етанол зазвичай метаболізується гепатоцитами, внаслідок чого виникають окиснювальний стрес та утворюється ацетальдегід, які викликають пошкодження гепатоцитів та активують клітини Купфера, які індукують активацію зірчастих клітин печінки. Ацетальдегід та його побічні продукти, серед яких є малоновий діальдегід, націлюються на зірчасті клітини та посилюють експресію колагену в них. При хронічному вживанні алкоголю спостерігається надмірний ріст кишкових бактерій та дисбактеріоз, а оскільки печінка є центральним імунологічним органом, то відбувається підвищення рівня бактеріальних ендотоксинів в печінці, що ще більше сприяє фіброзу. Це доповнюється пригніченням функції природних клітин-кілерів внаслідок розвитку їхньої толерантності [3, 8].

Клітини Купфера є ключовими для розвитку алкогольного гепатиту. Їх активує постійне вживання алкоголю через кишкові ендотоксини, і вони стають джерелами вільних радикалів (зокрема високо реактивних сполук кисню), що сприяє запаленню печінки та активації зірчастих клітин печінки [1, 22].

Алкоголь метаболізується в гепатоцитах шляхом окислення до ацетальдегіду, а потім метаболізується до ацетату. У цьому приймає участь цитохром P450 2E1 (CYP2E1), який робить це в присутності кисню та NADPH, що є альтернативним шляхом окислення алкоголю при його хронічному споживанні. Це генерує надлишок відновних еквівалентів, здебільшого у формі NADH, що може пригнічувати окислення жирних кислот та цикл три карбонових кислот, що сприяє літогенезу. До того ж, активність цитохрому P-450 2E1 призводить до пошкодження мітохондрій, активації апоптозу та посилення синтезу ліпідів [17, 22].

Окислювальний метаболізм алкоголю генерує шкідливі сполуки, а саме ацетальдегід та АФК. Ацетальдегід є дуже токсичним та канцерогенним, він зв'язується з білками та викликає структурні та функціональні зміни мітохондрій та мікротрубочок, а також індукує утворення неоантигенів (власних антигенів, які через зміни починають викликати імунну відповідь). Посилення адаптивних імунних реакцій, індукованих неоантигенами, додатково сприяє запаленню. Зміни в мітохондріях призводять до порушень, таких як зниження генерації АТФ, вироблення активних форм кисню та зниження активності ацетальдегіддегідрогенази, ферменту, який відповідає за метаболізм ацетальдегіду до ацетату. АФК може додатково зв'язуватися з ДНК та пошкоджувати її, або призводити до перекисного окиснення ліпідів з утворенням 4-гідроксинонєналю (4-HNE) і малонового діальдегіду, які зв'язуються з основами ДНК та утворюють висококанцерогенні екзоциклічні адукти етено-ДНК [1, 22].

Алкоголь, ацетальдегід і АФК сприяють фіброгенезу печінки шляхом прямої активації зірчастих клітин печінки і призводять до їхньої морфологічної зміни в міофібробласти. Вони починають синтезувати прозапальні цитокіни і білки позаклітинного матриксу, що поглиблює розвиток фіброзу печінки. Окрім цього, інгібування алкоголем антифіброзних шляхів ще сильніше сприяє фіброзу печінки [1, 22].

Цироз є прогресуючою стадією фіброзу, при якому порушується архітектура печінки. Вона характеризується утворенням регенеративних вузликів паренхіми печінки, розділених фіброзними перегородками, а також великою кількістю фіброзної тканини в органі. Це порушує кровоток через звуження судин, може спостерігатися судинний тромбоз середніх і великих ворітних вен і печінкових вен. Прогресує відмирання паренхіми до повного цирозу – печінка втрачає безперервні шари гепатоцитів через їхню загибель. Цироз зазвичай є необоротним

захворюванням, на розвиток якого уходять місяці та роки, тому найкращою профілактикою є своєчасне лікування фіброзу [12, 22].

1.3. Тваринні моделі експериментального фіброзу печінки

Для створення експериментальних моделей ураження печінки нерідко використовуються тварини. Це дозволяє зрозуміти основні механізми пошкодження та охарактеризувати клітини, які беруть у ньому участь. Серед тварин зазвичай надають перевагу кроликам, щурам, мишам, свиням Оссабо, макакам та рибкам даніо, в залежності від потреб та можливостей [4, 23].



Рис. 1.2. Класифікація моделей фіброзу: серед існуючих на початок 2023 року статей (51%) були хімічно індукованими моделями, 26% були дієтичними моделями, 10% були хірургічними моделями, 3% були трансгенно-індукованими моделями, 5% були імуноіндукованими моделями, а 5% були комбінованими моделями на тваринах.

Моделі фіброзу печінки класифікують за шістьма категоріями на основі способу ураження: хімічні, дієтичні, хірургічні, трансгенні, імунні та комбіновані (рис.1.2). Ці моделі мають різну ефективність, різні

наслідки та механізми пошкодження, тому для кожного дослідження обирають найбільш зручний та відповідний вимогам метод.

1.3.1. Модель фіброзу печінки, індукованого хімічними сполуками

Деякі хімічні речовини є гепатотоксичними та здатні індукувати фіброз печінки, тому їх використовують при створенні експериментальних тваринних моделей для вивчення механізмів ураження. Після надходження у гепатоцити ці речовини виробляють токсичні метаболіти, що пошкоджують клітини печінки. Це може призвести до відновлення цих клітин та аномального росту сполучної тканини [10, 23].

Зазвичай для введення хімічних речовин використовують внутрішньоочеревинну ін'єкцію, що викликає фіброз печінки за відносно короткий час. Цей метод простий у виконанні та призводить до стабільного розвитку фіброзу, що вигідно для клінічних досліджень фіброзу. Пероральне або інгаляційне введення хімічних речовин вимагають більше часу для розвитку, однак вони мають високу відтворюваність, прості у використанні, а механізм ураження більш подібний до фіброзу людини [2, 10].

На даний момент серед найпопулярнішими хімічними речовинами, що використовуються для створення моделей фіброзу печінки, є етанол, чотирихлористий вуглець (CCl_4), тіоацетамід (ТАА), диметилнітрозамін (DMN), діетилнітрозамін (DEN) та інші гепатотоксини.

Тривале вживання алкоголю призводить до хронічних захворювань печінки людини, тому модель годування алкоголем є однією з найпоширеніших та найперших створених тваринних моделей для дослідження алкогольних хвороб печінки. Вживання алкоголю щурами або мишами може викликати важкий стеатоз, який прогресує до фіброзу або цирозу [11].

Гризуни мають сильну природну огиду до алкоголю. Щоб подолати цю перешкоду, доктор Чарльз Лібер зі своїм помічницею Леонорою

ДеКарлі розробили методику годування етанолом, додаючи його до повністю рідкої дієти. За таких умов гризуни не мали вибору, окрім вживати розчинений етанол, тому щоденне споживання спирту було на рівні 12-18 г/кг, що приблизно відповідає вживанню 1,2–1,43 л віскі людиною вагою 75 кг. Подібної дози було достатньо для впливу на печінку і викликало стеатоз, проте лише легкий фіброз. Внутрішньошлункове вливання етанолової дієти, модель, розроблена докторами Цукамото та Френч, показала більш виражений стеатоз і фіброз [3, 11].

Щоденне вживання алкоголю щурами на протязі 16 тижнів продемонструвало підвищену частоту стеатозу, некрозу, фіброзу та запалення печінки. При цьому вміст етанолу в рідкій дієті збільшують від 1% до кінцевої концентрації 5,07% мас./об. Протягом перших 7 днів. Після цього доза залишається однаковою до кінця експерименту. Різні дослідження використовують різні терміни годування алкоголем від 8 до 16 тижнів для розвитку різних стадій пошкоджень печінки. Загалом для підтримки збалансованого харчування дієта Лібера-ДеКарлі містить 15% білків та 36% жиру [2, 11].

Важливо звертати увагу на природу жиру, оскільки саме жири накопичуються в печінці і мають великий вплив на розвиток стеатозу печінки. Для дослідження патологій, спрямованих виключно на вплив етанолу за відсутності ожиріння печінки, вміст жиру має складати 5-12% від загальної енергії. Дієта з високим вмістом жиру, особливо ненасичених, сприяє розвитку алкогольних хвороб і, зокрема, фіброзу [11, 12].

Дієта Лібера-ДеКарлі (LDC) індукує активацію CYP2E1, генерацію окисного стресу, підвищення трансаміназ у сироватці крові, стеатоз печінки та пошкодження гепатоцитів. При цьому також відбувається зниження рівня мітохондріального глутатіону майже вдвічі, що є проявом порушення мітохондріального поглинання. Це робить гепатоцити сприятливими до впливу екзогенного пероксиду. При подальшому

годуванні алкоголем на 16 тижні ефект поглиблюється до посиленого перекисного окислення ліпідів у мітохондріях, а гістологічно спостерігається некроз та фіброз печінки. Також підвищується рівень АЛТ та АСТ, малонового діальдегіду. Печінка характеризується помітною жировою дистрофією печінки [11, 12].

У печінці етанол здебільшого метаболізується алкогольдегідрогеназою та ферментами CYP450. Окрім виснаження глутатіону, спостерігається підвищене виробництво АФК та посилення синтезу колагену, що у підсумку викликає апоптоз гепатоцитів, запалення та активацію зірчастих клітин [10].

Миші більш схильні до алкогольного ураження печінки, ніж щури, причому найсприятливими є самки мишей. З часом для моделювання були розроблені штами НАР-2 і С57BL/6, які мають меншу огиду до вживання алкоголю. Але навіть так не існує моделі гризунів, яка б стовідсотково відповідала алкогольним хворобам печінки [10].

Модель фіброзу, індукованого вживанням етанолу, є дуже корисною для дослідження алкогольних хвороб печінки та інших органів, які пошкоджуються алкоголем. Вона проста, є доступною та ефективною, не вимагає додаткового обладнання або навичок дослідників і вирізняється дуже низькою смертністю тварин. Однак ця модель потребує щоденного догляду за тваринами, не є природною через існуючу огиду до алкоголю у щурів, та не дає змогу досліджувати важкі стадії алкогольних хвороб, окрім стеатозу та фіброзу [11, 23].

Використання чотирьохлористого вуглецю (CCl_4) є найпоширенішою експериментальною моделлю фіброзу печінки. Зазвичай він використовується для ураження печінки мишей і щурів. Він є токсичною речовиною з найбільш вираженим впливом на печінку з сильним гепатотоксичним циротичним та канцерогенним ефектом.

Перевага у дослідженнях віддається мишам через вищу швидкість метаболізму CCl_4 у порівнянні з щурами. Також на сприйнятливість до

фіброзу впливає штам тварин. Інбредні миші BALB/c найбільш чутливі до індукції фіброзу [10].

Найчастіше CCl_4 вводять внутрішньоочеревинно 2–3 рази на тиждень протягом 4–6 тижнів у діапазоні доз 300–1000 мкл/кг, розведеного у кукурузній олії. Також його можна вводити перорально, підшкірно або шляхом інгаляції [10, 23].

CCl_4 метаболізується гепатоцитами за участю цитохрому P450 2E1 (CYP2E1) з утворенням токсичного реактивного метаболіту трихлорметилового радикалу (CCl_3). CCl_4 перетворюється на $\cdot\text{CCl}_3$ для зв'язування з білками, дезоксирибонуклеїною кислотою (ДНК) і ліпідами, що може спричинити пошкодження мітохондрій та окислювальний стрес, а зрештою призводить до масивного центрілобулярного некрозу печінки. $\cdot\text{CCl}_3$ також може реагувати з O_2 з утворенням трихлорметилпероксирадикала ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$), тим самим ініціюючи ланцюгову реакцію перекисного окислення ліпідів і руйнуючи клітинну мембрану [15, 23].

Гепатотоксичність CCl_4 проявляється у пошкодженні клітин печінки, змінюючи проникність лізосом і мітохондріальних мембран. Це підвищує утворення АФК, що, в свою чергу, викликає окислення критичних тіолових груп і пошкодження мітохондрій, які починають виробляти токсичні кількості АФК і ще більше ушкоджують клітини [2, 20].

Введення CCl_4 підвищувало рівні аспартатамінотрансферази та аланінамінотрансферази в сироватці крові, викликало окислювальний та нітративний стрес печінки та викликало глибоку експресію прозапальних цитокінів у тканині печінки. Гістологічні аномалії супроводжувалися підвищеним вмістом у печінці колагену та тіобарбітурової кислоти [20, 23].

Введення CCl_4 індукує некроз гепатоцитів навколо централобулярних вен і накопичення запальних клітин. При цьому активуються зірчасті клітини печінки, які відповідають за накопичення

позаклітинного матриксу, також вони можуть мігрувати до зони ураження та брати участь у процесах відновлення. Після одноразового гострого введення відбувається відновлення тканин із появою помірної кількості гладком'язових міофібробластичних клітин, що експресують актин. Ці клітини сприяють відкладенню великої кількості позаклітинного матриксу [4, 12].

Тривале введення CCl_4 є загальновизнаною моделлю експериментального фіброзу та цирозу печінки, а окислювальний стрес є основним молекулярним процесом, відповідальним за токсичність цієї речовини. Ця модель не вимагає великих витрат, досить проста у створенні та призводить до стійкого фіброзу печінки, тому її часто використовують для вивчення патогенезу відповідних захворювань печінки людини. Однак існують відмінності між розвитком фіброзу та цирозу у тварин та у людини, тому не всі механізми є однаковими та відповідають дійсності.

Нещодавно було розроблено модель індукції фіброзу за участі іншого відомого токсину сульфату міді. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ є сильним гепатотоксином, який викликає сильний окисний стрес та запальну реакцію [7].

Фіброз, спричинений впливом CuSO_4 , індукують трьома послідовними внутрішньочеревними ін'єкціями з рорахунку 1 мг/100 г маси тіла з інтервалом у 48 годин [5,6]. Це становить 33% від летальної дози, що викликає гостру реакцію та індукує фіброз печінки. Для більш стійкого ефекту схему з трьома послідовними введеннями повторюють через 8 днів [7].

Багаторазове послідовне введення міді сульфату тваринам призводило змін функціональних та морфологічних показників, що є результатом накопичення в печінці 60-70% іонів міді, що потрапили до організму. У клітинах печінки мідні іони зв'язуються зі специфічними Cu-зв'язуючими білками в мітохондріях і ендоплазматичному ретикулумі та спричиняють окислювальний стрес. Це, в свою чергу, збільшує вміст

колагену в печінці, що супроводжується злиттям часточок печінки в єдину структуру. Це також змінює організацію печінкової капсули у тварин [5, 7].

Розвиток фіброзу, індукованого сульфатом міді, пригнічує ріст, знижує масу та ректальну температуру у щурів. Після ін'єкцій також була знижена фізична працездатність тварин, що може бути результатом інгібування мітохондріальних ферментів, таких як аконітаза. Зниження активності мітохондріальної аконітази при Cu-індукованому фіброзі печінки індукує апоптоз та підвищує концентрацію цитрату в клітинах, що, в свою чергу, пригнічує активність фосфофруктокінази і змінює метаболізм глюкози [5,6].

Cu-індукований фіброз печінки змінює цитокіновий профіль, прооксидантно-антиоксидантну систему та показники окисно-відновної системи. Накопичення іонів міді в печінці призводить до окислювального стресу, що викликає швидку перебудову окисно-відновної системи всього організму, включаючи кістки і мозок. Зміна мікрооточення кісткового мозку супроводжується зміною швидкості проліферації та диференціювання клітин, що сприяє відновленню пригнічених функцій печінки [5, 6].

На відміну від більшості гепатотоксинів, сульфат міді не викликає змін активності АЛТ та АСТ. Однак активність γ -глутамілтрансферази, що є маркером токсичних ефектів у печінці, була підвищена, так само як і вміст гідро пероксидів ліпідів [6, 7].

Індукція фіброзу печінки супроводжувалася пригніченням клітинного імунітету, зокрема фагоцитарної та ферментативної активності нейтрофілів. Зниження поглинальної та літичної здатності нейтрофілів у щурів говорить про наявність хронічного запального процесу, що характерно для гепатитів та цирозу печінки [6,7].

Тіоацетамід (ТАА) – це органічна сполука з молекулярною формулою CH_3CSNH_2 , яка має вигляд безбарвних або білих кристалів.

ТАА є класичним гепатотоксином, а також потужним канцерогеном і мутагеном, який може викликати гостру печінкову недостатність, окислювальний стрес та запалення, що, при контролі дози та тривалості введення, призводить до паренхіматозного фіброзу. Через це ТАА має широке використання як експериментальна модель фіброзу [2, 24].

ТАА, який потрапляє до печінки, не є токсичним відразу, однак після його біоактивації процесами окислення утворюються його S-оксид та високореактивний S,S-діоксид, який відповідає за загальну токсичність цієї речовини. За цей процес відповідають печінковий ізофермент цитохрому P450. S,S-діоксид зв'язується з білками та ліпідами, а метаболіти цих реакцій активують HSC та призводять до окисного пошкодження. При цьому також виробляються фібриноген і фактори росту, які сприяють гострому пошкодженню печінки та хронічному фіброзу [10, 15].

Щури є основним видом, на якому моделюють фіброз печінки, викликаним ТАА, але його також використовують на мишах. Зазвичай тіоацетамід вводять внутрішньоочеревинно у дозах віж 100 до 200 мг/кг маси тіла три рази на тиждень протягом 8-14 тижнів у щурів або перорально при додаванні 200-300 мг/л ТАА до питної води на протязі 2-4 місяців. Це призводить до збільшення печінки з центрілобулярним некрозом і запаленням, підвищення аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази в сироватці крові. При цьому внутрішньоочеревинна ін'єкція дає більш стійкі результати. Низка досліджень зверталася до щурів Спраг-Дуулі (SD) для індукції фіброзу печінки шляхом внутрішньочеревної ін'єкції ТАА в дозі 200 мг/кг двічі на тиждень протягом 12–13 тижнів [10, 15, 23].

Модель фіброзу печінки, індукованого ТАА, підходить для дослідження метаболізму сполучної тканини, загального механізму фіброзу та оцінки впливу терапевтичних препаратів. Це пов'язано з тим, що фіброз печінки, індукований ТАА, подібний до фіброзу печінки людини по морфологічному та біохімічному метаболізму, а також має

характеристики, схожі з гепатитом В і С людини. ТАА впливає на ферменти, відповідальні за синтез ДНК, РНК і білки в клітинах печінки, що є його відмінною рисою. Також за модель залишається стабільною протягом кількох тижнів після зупинки введення ТАА. Однак ТАА є канцерогеном, який одночасно є токсичним і летючим, тому тварини можуть розвивати ускладнення, що будуть впливати на кінцевий результат [2, 23, 24].

Нітрозаміни є токсичними та канцерогенними сполуками, які спричиняють серйозне ураження печінки, тому часто використовуються як експериментальна модель фіброзу у тварин. Серед них найчастіше звертаються до диметилнітрозамін (DMN) і діетилнітрозамін (DEN), які індукують стабільні пошкодження печінки, включаючи нейтрофільну інфільтрацію, центральні глобулярні крововиливи, некроз, фіброз [2, 10].

При активації та детоксикації DMN у великій кількості виробляється АФК, які, в свою чергу, реагують з нуклеїновими кислотами, білками та ліпідами, що є причиною пошкодження клітин, запалення та розвитку центрілобулярного некрозу. Ці процеси активують зірчасті клітин печінки та посилення синтезу колагенів, які призводять до фіброзу печінки. Повторний вплив низьких доз DMN може призвести до цирозу печінки [10, 23].

DMN вводять внутрішньочеревно мишам або щурам по 10 мкг/г 2-3 рази на тиждень протягом 3-4 тижнів для індукції фіброзу печінки. При введенні та спостереженні на протязі 3 тижнів, на 7-й день спостерігаються важкі застійні явища в центральній частці, крововилив і некроз. На 14-й день був виражений центральний лобулярний некроз і значна інфільтрація нейтрофілів. Відкладення колагенових волокон спостерігалось на 21-й день разом із важким центральним лобулярним некрозом, вогнищевими жировими змінами, гіперплазією жовчної протоки та мостиковим некрозом і фіброзом навколо центральної вени. Також спостерігається активація

зірчастих клітин печінки, клітин Купфера та експресія про фіброзних цитокінів [2, 15].

Ураження печінки, викликане DMN у щурів, подібне до фіброзу та раннього цирозу печінки людини, тому є моделлю, яка використовується для вивчення цих захворювань, а також для оцінки різноманітних методів терапії фіброзу. Час моделювання цього методу є коротким, його розвиток простий, спостерігається низька смертність, а фіброз є стабільним. Однак DMN є сильним мутагеном та канцерогеном, тому дослідники мають забезпечити належні заходи безпеки [2, 23].

DEN є одним з гепатотоксинів, який призводить до фіброзу печінки в експериментальних тварин. Він викликає серйозне ураження печінки шляхом пошкодження ДНК та активації виробництва АФК. Окрім цього, введення DEN може призвести до надмірного відкладення колагену у печінці [23].

Фіброз індукують шляхом введення DEN перорально мишам та щурам у дозі 100 мкл/кг маси тіла протягом 8-12 тижнів. Також його можна давати разом з питною водою протягом 15 тижнів для розвитку фіброзу та цирозу. При внутрішньочеревному введенні застосовують дози від 40 до 100 мг/кг один раз на тиждень протягом 2-6 тижнів [10, 23].

При введенні DEN на протязі 20 тижнів у щурів спостерігається гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК), яка подібна до ГЦК людини, що використовується у дослідженнях цього процесу та його механізмів [23].

Інші гепатотоксини, такі як миш'як (As), ацетамінофен (APAP) і d-галактозамін (D-GalN), також можуть викликати фіброз печінки.

Миш'як є канцерогеном для людини, а печінка – основний орган-мішень при його отруєнні. As та його метаболіти є токсичними для гепатоцитів, спричиняючи пошкодження ДНК та утворення вільних радикалів. Згодом це призводить до індукції перекисного окислення ліпідів, що викликає пошкодження клітин. Повторне пошкодження та відновлення гепатоцитів призводить до фіброзу печінки, який посилюється

при збільшенні дози та часу. Введення миш'яку викликає активацію HSC і відкладення позаклітинного матриксу, а тривалий вплив приводить до пошкодження печінки, запалення та фіброзу у мишей або щурів [23].

Передозування ацетамінофену – основна причина гострої медикаментозної печінкової недостатності в багатьох розвинених країнах. Невелика частина АРАР, що потрапляє до організму, метаболізується печінковими ферментами цитохрому Р450 до високореактивного проміжного N-ацетил-р-бензохінону (NAPQI), який детоксикується за допомогою глутатіону. Однак це виснажує запаси глутатіону і додає сульфгідрильні адукти до клітинних білків. Мітохондріальний окислювальний стрес вважається основною подією АРАР-індукованого ураження печінки, паралельно з виснаженням АТФ, що призводить до некрозу гепатоцитів. Тривале введення АРАР індукує фіброз печінки у мишей. Була створена модель цирозу печінки, при якому щурам щодня вводили АРАР 500 мг/добу протягом 3 тижнів [2, 23].

Також були спроби створення експериментальної моделі з використанням метилціаноакрилату (мономер Eastman 910), який відомий своїм ефектом нерозу та рубцювання, на кролях. На 15 день у дослідних тварин виник некроз із фіброзом, на 3 тиждень – гостра запальна реакція та утворення некротичних клітин печінки. На 30 день реакція тканини була більш фіброзною. Однак реакція була тяжкою та нерівномірною, тому ця модель не зазнала широкого розповсюдження [18].

1.3.2. Методи створення моделей фіброзу печінки, не пов'язаних з хімічними речовинами

Низка спеціальних дієт може використовуватися для моделювання неалкогольних захворювань печінки людини. Щоденне відповідне харчування буде тісніше пов'язане з клінічними проявами захворювання людини, такими як неалкогольний стеатогепатит та фіброз. Найчастіше

використовується дієта з високим вмістом жиру (HFD), західна дієта (WD), дієта з дефіцитом метіоніну холіну.

На ефективність дієти сильно впливає штам піддослідних тварин. Наприклад, миші штаму C57BL/6 найбільш сприйнятливі до розвитку фіброзу, індукованого дієтою. Однак навіть за таких умов міжвидова різниця між людиною та мишею не дає у повній мірі імітувати характеристики людського захворювання [10].

Хірургічне перев'язування жовчних проток (BDL) – одна з найпоширеніших експериментальних моделей холестатичного пошкодження печінки у щурів та мишей. Холестаз є порушенням утворення та виведення жовчі, що призводить до хронічного запалення і, як наслідок, пошкодження клітин жовчних протоків і печінки.

Вперше модель BDL було розроблено для щурів шляхом подвійного перев'язування жовчних протоків. Як правило, операція проходить під час глибокої анестезії тварин. Через 3-4 тижні у тварин розвивається жовтяниця та сильна фіброзна реакція. Це відбувається у наслідок активація міофібробластів та надмірного відкладення позаклітинного матриксу. Фіброз при BDL є перипортальним міліарним фіброзом [2, 15].

Генетично модифіковані моделі тварин за останній час стало загально доступним та потужним матеріалом для досліджень. Вони використовуються при вивченні сигнальних шляхів при розвитку фіброзу печінки та участі специфічних білків у цьому процесі, але здебільшого для підтвердження результатів, які були отримані з використанням інших моделей, що дає змогу віднайти нові мішені для лікарських препаратів. Однак такі моделі все одно потребують другого стимулу для індукції захворювання, тому що генотип є лише однією зі складових, необхідних для розвитку фіброзу. На даний момент вони використовуються значно рідше, ніж інші, через тривалий час розробки та високу ціну моделі.

Фіброз печінки може виникати внаслідок імунного ураження печінки. Він може бути спричинений аутоімунним гепатитом або вірусною

інфекцією. Аутоімунний гепатит змушує власні імунні клітини атакувати свої гепатоцити, що призводить до запального некрозу печінки, розвитку фіброзу та цирозу. Для цього використовують моделі, уражені шистосомою, свинячою сироваткою, конканаваліном А та різноманітними вірусами [23].

Ця тваринна модель допомогла у з'ясуванні механізмів імунної відповіді під час фіброзу печінки та важливість імунних реакцій у розвитку захворювання. Однак тварини не мають стадії тривалої реплікації людської вірусної інфекції та процесу стійкого пошкодження імунітету печінки людини. Можуть бути використані генетично модифіковані гризуни, які здатні експресувати кодуючу область оболонки вірусу гепатиту під конститутивним транскрипційним контролем промотора мишачого альбуміну [2, 10].

Основні види шистосомозу, які заражають людей, включають *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* і *Schistosoma japonicum*. Інфекція *Schistosoma mansoni* легко вражає мишей та слугує чудовою моделлю для дослідження фіброзу печінки, викликаного цим захворюванням, через високу схожість з людською та високу відтворюваність. Шистосомоз є паразитарною інфекцією, а фіброз при цьому виникає на фоні розвитку гепатологічних уражень, включаючи імунне запалення та загальні пошкодження печінки. Коли ці паразити відкладають яйця у печінці господаря, навколо них утворюються гранульоми, що є причиною виробництва позаклітинного матриксу та активації зірчастих клітин печінки, які перетворюються на міофібробласти і провокують фіброз печінки [10, 23].

Конканавалін А (ConA) є лектином, очищеним із бразильської квасолі. Він широко використовується в експериментальній моделі імунітопосередкованого гепатиту у мишей. Серед інших моделей пошкодження печінки ConA-індуковане вирізняється ураженням, спричиненим активацією та залученням Т-клітин до печінки. Після

повторних ін'єкцій спостерігається розвиток фіброзу печінки у мишей. Для індукції цієї моделі ін'єкції конканаваліну А вводяться у концентрації 0,3 мг/тіло один раз на тиждень впродовж 4 тижнів [2].

Внутрішньоочеревинна ін'єкцією свинячої сироватки щурам також здатна викликати фіброз печінки. Сироватка є антигеном, який стимулює імунну відповідь у піддослідних тварин та стимулює вивільнення цитокінів для активації зірчастих клітин, які, в свою чергу, викликають надмірне відкладання позаклітинного матриксу, що призводить до фіброзу. Спостерігаються виразні фіброзні перегородки, які поширюються радіально від центральних вен і портальних зон. Для індукції фіброзу щурам роблять внутрішньоочеревинні ін'єкції 0,5 мл сироватки двічі на тиждень протягом 16-24 тижнів для утворення стійкого фіброзу печінки. Така модель є досить подібною до людської, однак потребує багато часу, а в експериментальних тварин може розвиватися алергічна реакція, яка не рідко стає причиною їхньої загибелі [4, 12, 23].

1.3.3. Комбінування індукційних методів

Для створення ідеальної моделі дослідники нерідко звертаються до комбінацій існуючих методів. Це прискорює процес та дає більш виражені результати, проте такі моделі не дають змоги дослідити механізми утворення, так як все відбувається комплексно. Найчастіше поєднують два хімічні методи, хімічний та дієтичний, а також транс генний з дієтичним.

Модель годування алкоголем довгий час використовується як самостійна для досліджень легкій стадій алкогольного пошкодження печінки, однак її дуже часто поєднують з іншими речовинами. Зазвичай ними виступають індуктори CYP450, такі як CCl_4 , гормони, ліганди Toll-подібних рецепторів та інші стресові фактори. Це також пов'язано з довгим часом індукції фіброзу та занадто високим рівнем алкоголю, який необхідно дотримувати, що не завжди вдається та може зіпсувати експеримент.

Основна модель представляє поєднання дієти LDC та введення CCl_4 . Годування етанолом підсилює метаболізм CCl_4 шляхом індукції експресії цитохрому P450 2E1, а також підсилює загальне пошкодження печінки. Високореактивні та токсичні метаболіти CCl_4 у цій моделі відповідають за початок перекисного окислення ліпідів, руйнування мембранної структури, порушення енергетичних процесів клітини та синтезу білка [3, 11].

Для індукції загальною схемою є спільне введення етанолу (до 16%) та CCl_4 протягом 5-8 тижнів. Така модель демонструє високі показники фіброзної алкогольної жирової хвороби печінки, включаючи виражений стеатоз, запалення та некроз, відкладення колагену та явний фіброз печінки. Структура фіброзу при цьому подібна до людської, що підходить для її використання як моделі для випробовування ліків [2, 23].

Група доктора Нагі створила модель, яка поєднує годування алкоголем з внутрішньоочеревинними ін'єкціями CCl_4 . Помірне годування етанолом за дієтою LDC на протязі 2-8 тижнів разом з ін'єкціями CCl_4 1-2 мл/кг двічі на тиждень дозволило отримати швидкий розвиток глибокого алкогольного фіброзу печінки. Обидві речовини викликають пошкодження гепатоцитів, запальну інфільтрацію, активацію зірчастих клітин, генерацію окислювального стресу, це призводить до загострення фіброзу печінки за короткий термін [3, 11].

Ефективною є модель, яка поєднує дієту з високим вмістом жиру (HFD) та надмірне вживання етанолу, яка є імітацією ожиріння та запоїв у людини. Така модель викликала стеатогепатит та фіброз печінки. Вона характеризується нейтрофільною інфільтрацією печінки, яка спричинює активацію зірчастих клітин печінки і фіброгенез. Її використовують здебільшого на мишах та щурах для вивчення механізмів фіброзу при хронічному вживанні алкоголю. Обмежує цю модель її технічна складність через необхідність вводити внутрішньошлунковий зонд для годування гризунів, що вимагає досвіду та відповідного обладнання [3, 23].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експерименти проводилися на щурах лінії Wistar, самцях двох вікових груп – молодих (3 міс.) та старих (20 міс.). Експерименти на лабораторних тваринах проводилися згідно з біотичним комітетом Харківського національного університету ім.В.Н.Каразіна (протокол біоетичної комісії Харківського університету № 3 від 28.05.2021 р.), який керується положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 18.03.1986). Тварини утримувалися у стандартних умовах віварію НДІ біології Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна.

Молоді та старі тварини були поділені на дві підгрупи: контрольні, які містилися у стандартних умовах та піддослідні, які містилися у тих самих умовах, але замість води вони щоденно отримували 15%-ий водний розчин етилового спирту (рис. 2.1). Оскільки тварини мали вільний доступ до водного розчину спирту, то в процесі експерименту щодня контролювали обсяг випитого спирту.

Забій тварин здійснювали під ефірним наркозом, після чого кров збиралася у стерильні пробірки, печінка була видалена та перфузована фізіологічним розчином. Нирки, селезінка та печінка були витягнуті та зважені, визначалася їхня відносна маса по відношенню до маси тіла. Аліквоти тканин використовували визначення ступеня оводненості. Для цього визначали швидкість втрати води зразків при витримуванні при послідовному підвищенні температури від 25 до 50°C, тобто до виходу на постійну масу фрагментів тканин. Їхні маси визначалися на аналітичних вагах.

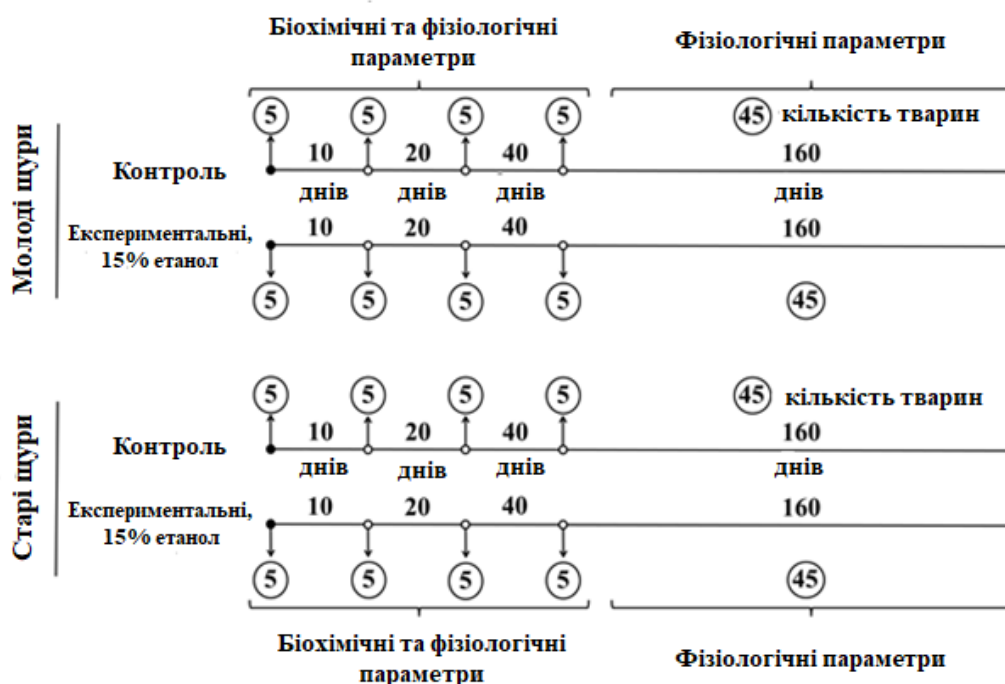


Рис. 2.1. Схема проведених маніпуляцій з тваринами обох вікових груп. Від початку експерименту та через 10, 20 та 40 днів щоденного прийому етанолу піддослідними тваринами з кожної групи відбирали по 5 тварин для визначення динаміки біохімічних показників; від початку та до 160 дня прийому етанолу у тварин реєстрували фізіологічні показники (масу тіла та смертність). Кожна група містила 45 особин

Решту печінки гомогенізували в 0,25 М сахарозі, трис-НСІ, рН 7,4 при 4°C. Мітохондрії виділяли диференціальним центрифугуванням при 12000 g протягом 30 хв. Надосадову рідину використовували як постмітохондріальну фракцію при визначенні активності алкогольдегідрогенази, а в мітохондріях визначали активність аконітатгідратази та вміст карбонільованих білків.

Отриману кров використовували для отримання сироватки, після чого інкубували її при 37°C протягом 20 хв. Центрифугували при 1000 g протягом 20 хв.

Для визначення активності алкогольдегідрогенази печінку гомогенізували в середовищі зі складом 0,25 М сахарози, трис-НСІ, рН 7,4 у відношенні 1 г тканини на 9 мл середовища. Визначення активності

алкогольдегідрогенази проводили в середовищі з наступним складом: 2,6 мл (0,1М гліцин-NAOH буфер, рН 9,0); 0,1 мл (0,04М НАД); 0,1мл (0,75М етиловий спирт); 0,1 мл гомогенату. Активність ферменту виражали в нмоль НАДН/хв. на мг білку. Вміст білку в зразках визначали по методу Лоурі.

Оцінку інтенсивності окислювальної модифікації білків в досліджуваних зразках проводили по методу Левіна в модифікації Дубініної. Методика заснована на реакції взаємодії карбонільних карбонільних груп та аміногруп окислених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) з утворенням динітрофенілгідрозонів, які володіють специфічним спектром поглинання в ультрафіолетовій та видимій областях спектру.

Рівень спонтанної окислювальної модифікації білків відображає кількість наявних у пробі карбонільованих похідних білків. Для визначення карбонільних похідних білків до 0,1 мл суспензії мітохондрій додавали 1 мл 20% трихлороцтової кислоти та 1 мл 0,01М розчину 2,4-ДНФГ. Контрольна проба містила ті самі компоненти, але з заміною 2,4-ДНФГ на 1 мл 2М соляної кислоти. Проби інкубувалися протягом 60 хвилин у темному місці при кімнатній температурі, після чого їх центрифугували на протязі 15 хвилин при 3000 g. Для екстракції ліпідів, видалення вільного 2,4-ДНФГ та усунення екстрагуючих реагентів триразово проводили відмивку утворених осадів з використанням спирт-ефірної суміші (1:1 96% етиловий спирт та етилацетат) та центрифугування при 3000 g на протязі 5 хвилин. Утворені осадки висушували, а потім розчиняли в 8М розчині сечовини. Оптичну щільність утворених 2,4-динітрофенілгідрозонів визначали спектрофотометрично при довжині хвиль 230, 254, 270, 280, 356 нм (альдегід-динітрофенілгідрозони), 363, 370 нм (кетон- динітрофенілгідрозони); та видимого спектру: 428, 430 нм (альдегід- динітрофенілгідрозони), 434, 520,

524, 530 и 535 нм (кетон- динітрофенілгідразони). Результати були виражені в мкмоль на мг білку мітохондрій.

Дані представлені як групові середні та стандартна помилка ($\bar{x} \pm SE$). Аналіз та візуалізація даних були проведені за допомогою допомогою Excel 2013 (Microsoft Corporation., USA). Достовірні відмінності між групами визначали за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Вітні та ANOVA, а також log-rank критерію для оцінки виживання Каплан-Мейєра. Відмінності між контрольною та дослідною групами вважали достовірними при $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Стійкість молодих та старих тварин до хронічної дії алкоголю

Тривалий прийом етилового спирту призводить до розвитку системного запального процесу, на тлі якого можуть змінюватись функції мозку, печінки, система детоксикації організму, а в деяких випадках не виключені летальні випадки.

Не зважаючи на щоденний прийом алкоголю, молоді тварини (3 місячні самці) продовжували рости та набирати масу тіла (рис. 3.1А). За 160 днів прийому спирту не було виявлено жодного летального випадку серед залучених до експерименту 45 молодих тварин (рис. 3.1Б).

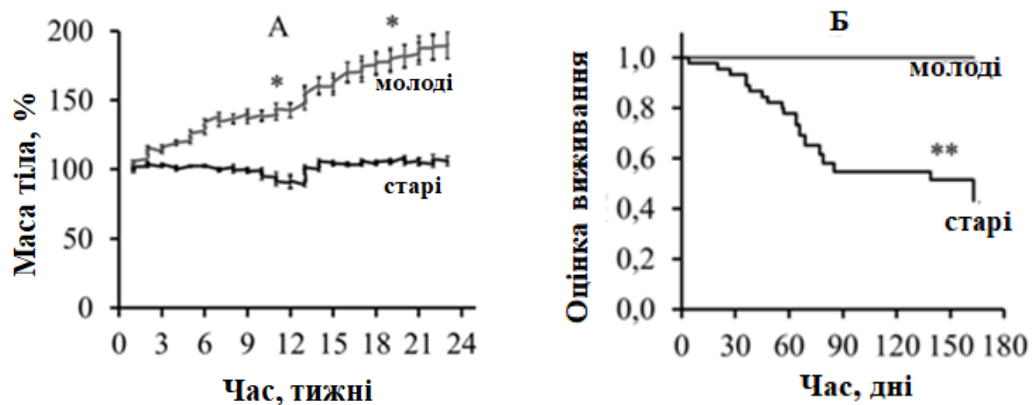


Рис. 3.1. Динаміка маси тіла у молодих та старих щурів, які щоденно на протязі 160 днів вживали 15% етиловий спирт (А) та коефіцієнт смертності за Капплан-Майером у групах молодих та старих тварин (Б). Кожна група містила по 45 особин. * - варіанти, для яких $P < 0,05$ у порівнянні з контролем, ** - варіанти, для яких $P < 0,05$ старих у порівнянні з молодими

У той же час старі тварини (20 місячні самці) в тих самих умовах майже не набирали масу, але вона залишалась у межах норми для даної вікової групи (рис. 3.1А). Однак серед старих тварин, починаючи з 20 доби, почала зростати смертність, що продовжувалося приблизно до 80 дня

прийому алкоголю (рис. 3.1Б). За цей час з початкової кількості у 45 особин в живих лишилося близько 50% тварин.

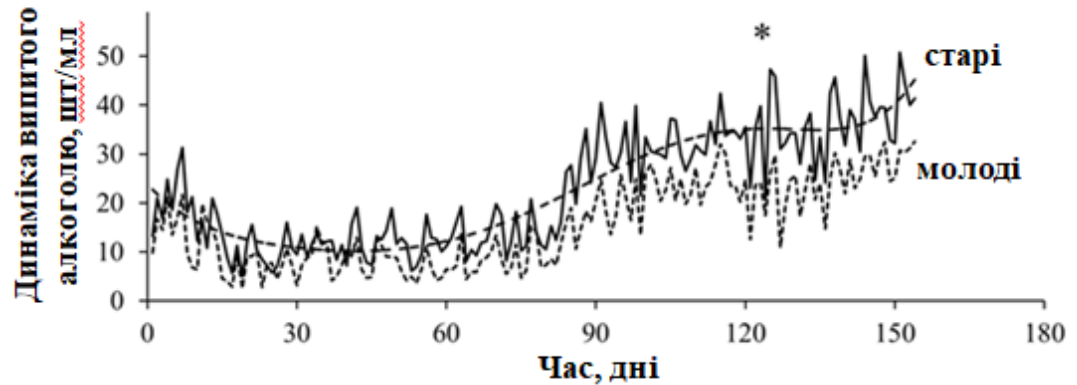


Рис.3.2. Динаміка вживання водного розчину спирту в групах молодих та старих тварин. Кожна група містила по 45 особин. * - варіанти, для яких $P < 0,05$ в порівнянні з контролем

Експериментальні тварини мали вільний доступ для вживання 15% розчину етилового спирту щодня. В перші дні експерименту старі щури випивали приблизно по 18 мл, молоді – по 12 мл, однак після близько 80 днів прийому алкоголю вони самостійно збільшили дозу майже вдвічі (рис.3.2). Кількість випитого спирту мала виражений не лінійний характер, який був подібним у молодих та старих тварин. При цьому кількість випитого спирту на масу тіла у молодих тварин могла бути навіть більшою за старих щурів.

У молодих тварин може розвиватися гостра толерантність до етанолу, тому вони можуть споживати більшу кількість, ніж дорослі тварини. В той час як старі тварини ділилися на чутливих та стійких до токсичної дії алкоголю, що проявилось в перші 80 діб щоденного прийому етанолу.

3.2. Зміна відносної маси печінки та селезінки у молодих та старих тварин після довготривалого прийому алкоголю

У процесі онтогенезу маса печінки зменшується по відношенню до маси тіла. Згідно з результатами проведеного дослідження, відносна маса печінки старих тварин була на 28% менше у порівнянні з печінкою молодих особин (рис. 3.3А).

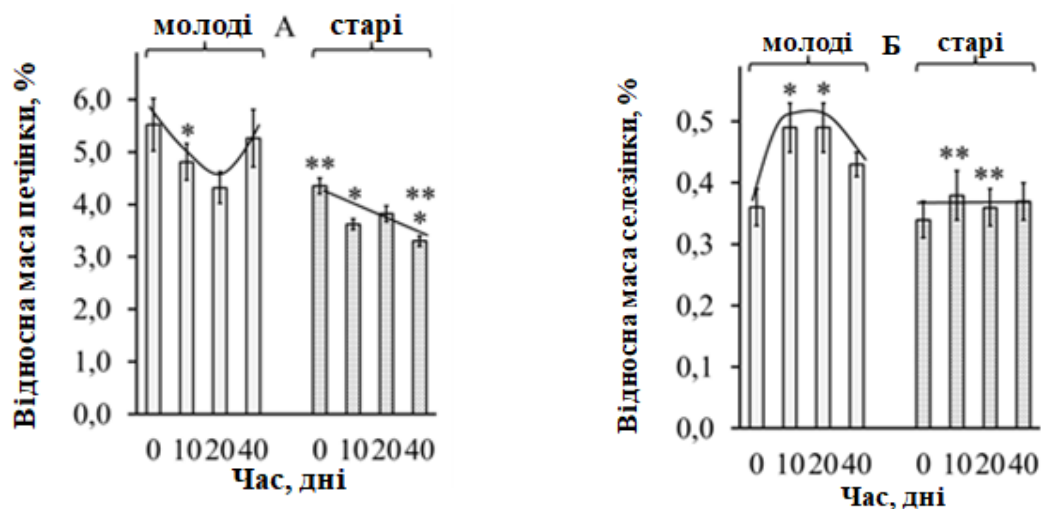


Рис.3.3. Відносна маса печінки (А) та селезінки (Б) для молодих та старих щурів у контрольній (інтактній) групі (нульова точка на осі) та після щоденного прийому 15% розчину етилового спирту на протязі 10, 20 та 40 днів. Зображені середні результати, отримані у 5 особин у групі та стандартні помилки. * - варіанти, для яких $P < 0,05$ у порівнянні з контролем, ** - варіанти, для яких $P < 0,05$ старих у порівнянні з молодими

Коли молоді тварини щоденно отримували 15% розчин етилового спирту протягом 10 днів, їх відносна маса печінки дещо зменшилася (на 13%) у порівнянні з контрольними особинами, які взагалі не отримували алкоголь (рис.3.3А). При подовженні терміну прийому алкоголю до 20 днів відносна маса печінки зменшувалася ще більше (на 22%) у порівнянні з контролем (рис.3.3А). Однак після 40 днів щоденного прийому етанолу відносна маса печінки майже не відрізнялась від контрольних аналогів, тобто у молодих тварин вона відновилась до початкових значень маси (рис.3.3А).

У той же час динаміка відносної маси селезінки молодих тварин мала інший характер на тлі щоденного прийому алкоголю у порівнянні з печінкою. Спостерігалось збільшення на 36% після 10-денного прийому етанолу, подібний стан також був зафіксований після 20 днів прийому спирту. Лише на 40 день експерименту селезінка почала зменшуватися наближуватися до норми у молодих особин (рис.3.3.Б).

Отже, довготривалий прийом етилового спирту молодими тваринами характеризувався зменшенням відносної маси печінки після 10 та 20 днів прийому спирту з наступним відновленням, мала місце U-подібна тимчасова відповідь. Одночасно спостерігалось збільшення відносної маси селезінки з поступовим відновленням її маси, тобто та сама U-подібна відповідь, але з протилежними значеннями.

Звертаючись до старих тварин, при щоденному прийомі етанолу на 10 день їхня відносна маса печінки зменшувалась на 17% у порівнянні з інтактним контролем, але не сильно відрізнялася від контролю на 20 день експерименту (рис.3.3А). На 40 день щоденного прийому алкоголю маса печінки знову зменшувалась на 25% у порівнянні з контролем (рис.3.3А).

На відміну від молодих тварин, відносна маса селезінки у старих особин залишалась відносно незмінною на протязі усіх 40 днів прийому спирту (рис.3.3Б).

Аналізуючи ці результати, можна казати про те, що у разі молодих тварин довготривалий прийом алкоголю супроводжується яскраво вираженим процесом адаптації до його токсичних ефектів, в той час як у старих тварин відновлення відносної маси печінки на тлі прийому етилового спирту не відбувалося, так само як і реакція селезінки на рівні її маси не спостерігалася. У старих тварин токсичний вплив алкоголю міг зберігатися на протязі усього експерименту.

Динаміка маси органів може бути пояснена кількома причинами, основними з яких є зміна ступеня обводнення (кількістю води в органі) або кількості клітин в органі. З метою визначення вмісту води в досліджуваних

тканинах, фрагменти печінки та селезінки контрольних тварин та тих, що щоденно приймали алкоголь на протязі 20 днів витримували в термостаті при послідовному підвищенні температури від 25°C до 50°C та визначали втрату маси зразками (рис.3.4А, Б).

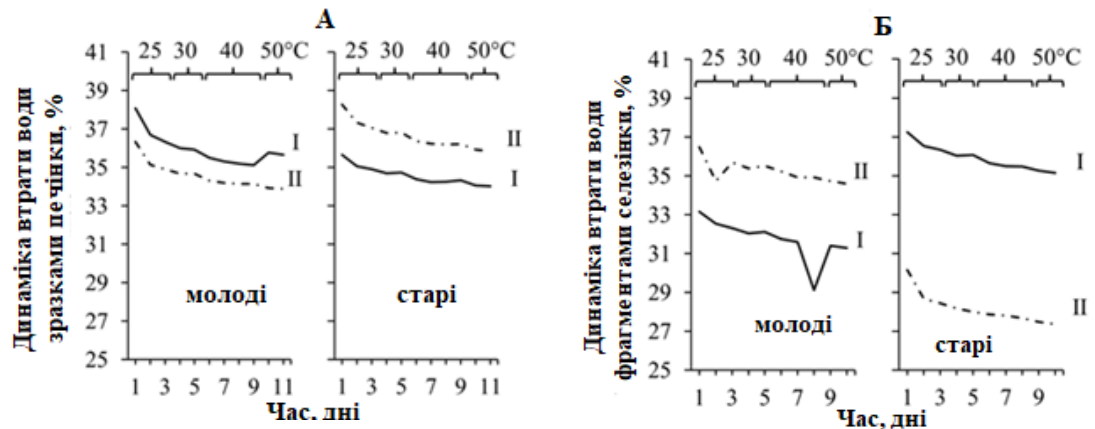


Рис.3.4. Динаміка втрати води фрагментами печінки (А) та селезінки (Б) контрольною групою тварин (І) та експериментальною, яка 20 днів приймала 15% розчин етилового спирту.

Було виявлено, що більш ніж 60% води зразки печінки та селезінки втрачали у першу добу. При подальшому підвищенні температури до 50°C тканини втрачали не більш ніж 2-3% води (рис.3.4А, Б). Також спостерігався різний характер втрати води фрагментами печінки та селезінки у особин різного віку. Отже, динаміка маси печінки та селезінки, залежна від віку, не може бути пояснена ступенем обводнення цих органів, а більше пов'язана зі зміною кількості клітин або ступенем їхньої гіпертрофії.

3.3. Динаміка активності алкогольдегідрогенази в печінці молодих та старих щурів на тлі довготривалого прийому алкоголю

Етиловий спирт, який потрапляє до організму, метаболізується до ацетальдегіду за участю АДГ в печінці, і саме ця сполука індукує токсичний ефект алкоголю.

Було відмічено, що активність алкогольдегідрогенази у контрольних старих тварин була в 2,5 рази вище, ніж у молодих тварин (рис.3.5).

Після 10-ти денного прийому алкоголю тваринами не спостерігалось значної різниці в активності АДГ у порівнянні з вихідним рівнем як у молодих, так і у старих особин (рис.3.5).

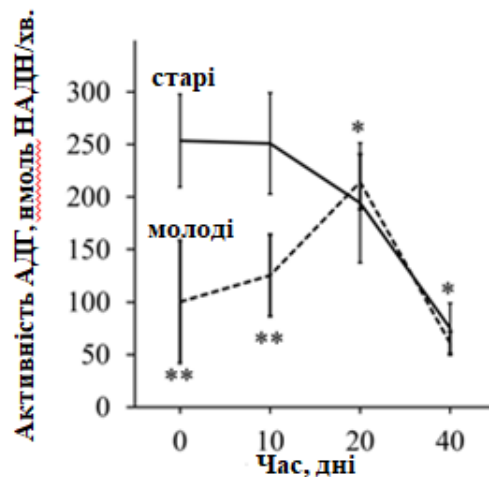


Рис.3.5. Активність алкогольдегідрогенази в постмітохондріальній фракції печінки молодих та старих інтактних щурів (нульова точка на осі) та тварин, які щоденно отримували 15% розчин етилового спирту на протязі 10, 20 та 40 днів. Зображені середні результати, отримані у 5 особин у групі та стандартні помилки. * - варіанти, для яких $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (0), ** - варіанти, для яких $P < 0,05$ старих у порівнянні з молодими тваринами

Щоденне вживання алкоголю на протязі 20 днів молодими тваринами призводило до збільшення рівня алкогольдегідрогенази на 114% у порівнянні з вихідним значенням (рис.3.5). Подовження прийому спирту до 40 днів супроводжувалося, навпаки, зменшенням активності АДГ у 3,5 рази у порівнянні з тваринами, які отримували алкоголь на протязі 20 днів (рис.3.5).

Отже, між динамікою активності АДГ та динамікою відносної маси печінки на фоні 40 денного прийому алкоголю молодими тваринами спостерігалась протилежна залежність (рис.3.3 та рис.3.5).

Ефект впливу довготривалого вживання етилового спирту на старих тварин, які початково мали значно вищий рівень активності АДГ у порівнянні з молодими тваринами, був відмінним від молодих тварин. Вона різко зменшувалася з 20 по 40 день прийому алкоголю (рис.3.5).

Після 40-ка денного прийому етанолу старими тваринами активність АДГ була у 3,3 рази нижча за вихідний рівень, тоді як у молодих тварин у той самий період вона не сильно відрізнялася від початкового рівня (рис.3.5).

Відповідно, між динамікою активності АДГ та динамікою відносної маси печінки на тлі 40-ка денного прийому алкоголю старими тваринами спостерігалася пряма залежність (рис.3.3 та рис.3.5).

3.4. Вміст карбонільованих білків у мітохондріальній фракції печінки молодих та старих тварин при довготривалому прийомі алкоголю

Загальновідомо, що токсичний вплив алкоголю та його метаболітів обумовлений модифікацією білків. Саме тому було визначено вміст карбонільованих білків (КБ) у мітохондріях печінки молодих та старих щурів.

Вміст КБ у мітохондріях печінки молодих тварин складав близько 4 мкмоль/мг від загальної кількості білків мітохондрій. В інтактних старих тварин їхня кількість була збільшена на 73% у порівнянні з молодими інтактними особинами (рис.3.6).

10-ти денний прийом алкоголю у групі молодих тварин супроводжувався невеликим достовірним збільшенням вмісту карбонільованих білків (на 29%) у мітохондріях печінки (рис.3.6). Збільшення часу прийому спирту цими тваринами до 20 днів цієї групи призвело до значного збільшення вмісту КБ (на 42% у порівнянні з 10-ти денним прийомом, та на 80% у порівнянні з вихідним рівнем). Подовження прийому етанолу до 40-ка днів молодими щурами не вплинуло на вміст КБ

у порівнянні з 20-ти денним прийомом, тобто цей показник вийшов на стаціонарний рівень (рис.3.6).

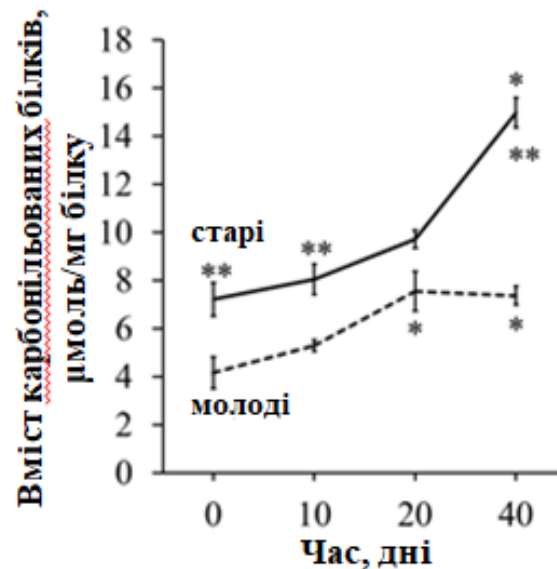


Рис.3.6. Вміст карбонільованих білків у мітохондріальній фракції печінки у молодих та старих тварин, інтактних (нульова точка на осі) та тварин, які щоденно отримували 15% розчин етилового спирту на протязі 10,20 та 40 днів. * - варіанти, для яких $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (0), ** - варіанти, для яких $P < 0,05$ старих у порівнянні з молодими тваринами

Відповідно, динаміка вмісту карбонільованих білків у мітохондріях печінки молодих тварин, які вживали алкоголь, мала характер, подібний до характеру динаміки активності алкогольдегідрогенази (рис.3.5 та рис.3.6).

Прийом алкоголю старими тваринами характеризувався іншою динамікою вмісту КБ у порівнянні з молодими тваринами. При 10-ти денному прийомі алкоголю не спостерігалось достовірного збільшення вмісту КБ у порівнянні з вихідним рівнем (рис.3.6). Після 20-ти денного прийому етилового спирту зміст КБ незначно збільшився, однак після 40 днів прийому алкоголю кількість КБ у мітохондріях печінки збільшилася на 54% у порівнянні з 20 днем, та на 108% у порівнянні з контролем. При цьому вміст КБ після 40 днів прийому алкоголю у старих тварин був у 2

рази більше, якщо порівнювати з молодими тваринами після 40-ка днів прийому спирту (рис.3.6).

Отже, якщо у молодих тварин між динамікою активності АДГ у постмітохондріальній фракції печінки та вмістом КБ у мітохондріях спостерігався слабо виражений взаємозв'язок ($r=0,39$), то у старих тварин цей взаємозв'язок був яскраво вираженим та мав протилежний знак, тобто був зворотнім ($r=-0,995$).

ВИСНОВКИ

1. Було розглянуто експериментальні моделі фіброзу печінки з використанням різноманітних методів та різних експериментальних тварин. Усі вони мають як свої переваги, так і недоліки, тому варто оцінити їх усі та підібрати відповідну модель згідно з метою експерименту, наявного обладнання та досвіду. Однак існуючі моделі поки що не здатні повною мірою відобразити фіброз печінки у людини.

2. Надмірне вживання алкоголю є однією з основних причин розвитку хвороб печінки у світі. При цьому організм реагує на токсичну дію спирту по-різному в залежності від віку особи, що вживає його.

3. Молодий організм майже завжди адаптується та розвиває толерантність до токсичного ефекту алкоголю, в той час як старші за віком у половині випадків стають толерантними до нього, а інші половина – чутливою та сприятливою до ускладнень та летальних наслідків.

4. Вживання етилового спирту на протязі 40 днів старими тваринами призвело до різкого падіння активності алкогольдегідрогенази та одночасного збільшення кількості карбонільованих білків. Молоді щури не показали подібної реакції, більшість показників на момент 40 дня експерименту вирівнялася з вихідним показником.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Balog S., Li Y., Ogawa T., Miki T., Saito T., French S.W., Asahina K. Development of capsular fibrosis beneath the liver surface in humans and mice. *Hepatology*. 2020. Vol. 71(1), P. 291-305.
2. Bao Y.L., et al. Animal and organoid models of liver fibrosis. *Frontiers in physiology*. 2021. Vol. 12, 666138.
3. Bataller R., Gao B. Liver fibrosis in alcoholic liver disease. In *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers. 2015. Vol. 35 (2), P. 146-156
4. Blanc J.F., Bioulac-Sage P., Balabaud C., Desmouliere A. Investigation of liver fibrosis in clinical practice. *Hepatology research*. 2005. Vol. 32(1), P. 1-8.
5. Bozhkov A.I., Ivanov E.G., Kuznetsova Y.A., Ohienko S.L., & Bondar' A.Y. Copper-induced liver fibrosis affects the behavior of bone marrow cells in primary culture. *Frontiers in biology*. 2017. Vol. 12, P. 271-279.
6. Bozhkov A.I., Nikitchenko Y.V., Klimova E.M., Linkevych O.S., Lebid K.M., Al-Bahadli A.M.M., Alsardia M.M.A. Young and old rats have different strategies of metabolic adaptation to Cu-induced liver fibrosis. *Advances in Gerontology*. 2017. Vol. 7, P. 41-50.
7. Bozhkov A.I., Ohienko S.L., Bondar A.Y., Klimova E.M., Ivanov E.G. Induced Liver Fibrosis Is Accompanied in Young and Old Animals by Age-Dependent Changes in Bone Marrow Cells. *Advances in Gerontology*. 2019. Vol. 9, P. 289-297.
8. Bubnov R.V., Drahulian M.V., Buchek P.V., Gulko T.P. High regenerative capacity of the liver and irreversible injury of male reproductive system in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis rat model. *EPMA Journal*. 2018. Vol. 9, P. 59-75.
9. Calvaruso V., Maimone S., Gatt A., Tuddenham E., Thursz M., Pinzani M., Burroughs A.K. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease. *Gut*. 2008. Vol. 57(12), P. 1722-1727.

10. Crespo Yanguas S., et al. Experimental models of liver fibrosis. *Archives of toxicology*. 2016. Vol. 90, P. 1025-1048.
11. Guo F., Zheng K., Benedé-Ubieto R., Cubero F. J., Nevzorova Y.A. The Lieber-DeCarli Diet—A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2018. Vol. 42(10), P. 1828-1840.
12. Guyot C., Lepreux S., Combe C., Doudnikoff E., Bioulac-Sage P., Balabaud C., Desmoulière A. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo) fibroblastic cell subpopulations involved. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006. Vol. 38(2), P. 135-151.
13. Hirano A., Kaplowitz N., Tsukamoto H., Kamimura S., Fernandez-Checa J.C. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology*. 1992. Vol. 16(6), P. 1423-1427.
14. Im G.Y. Emerging Biomarkers in Alcohol-associated Hepatitis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2022. Vol. 13(1), P. 103-115
15. Liedtke C., et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2013. Vol. 6, P. 1-25.
16. Louvet A., Mathurin P. Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2015. Vol. 12(4), P. 231-242.
17. Lucey M.R., Mathurin P., Morgan T.R. Alcoholic hepatitis. *New England Journal of Medicine*. 2009. Vol. 360(26), P. 2758-2769.
18. Myers M.B., Cherry G. Effect of methyl cyanoacrylate on the hepatic capsule. *The American Journal of Surgery*. 1967. Vol. 113(5), P. 642-645.
19. O'shea R.S., Dasarathy S., McCullough A.J., Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases, & Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010. Vol. 51(1), P. 307-328.

20. Pavanato A., Tuñón M.J., Sánchez-Campos S., Marroni C.A., Llesuy S., González-Gallego J., Marroni N. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Digestive diseases and sciences*. 2003. Vol. 48, P. 824-829.
21. Roan E. The effect of Glisson's capsule on the superficial elasticity measurements of the liver. *Journal of biomechanical engineering*. 2010. Vol. 132(10).
22. Seitz H.K., et al. Alcoholic liver disease. *Nature reviews Disease primers*. 2018. Vol. 4.1, 16.
23. Wu S., Wang X., Xing W., Li F., Liang M., Li K., He Y., Wang J. An update on animal models of liver fibrosis. *Frontiers in medicine*. 2023. Vol. 10, 1160053.
24. Xu S., et al. Quantification of liver fibrosis via second harmonic imaging of the Glisson's capsule from liver surface. *Journal of biophotonics*. 2016. Vol. 9(4), P. 351-363.