

DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.3\(54\).2022.9](https://doi.org/10.34287/MMT.3(54).2022.9)I. V. Koshurba^{1,2}¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України
Харків, Україна²Комуніальне некомерційне підприємство «Чернівецький обласний перинатальний центр»I. V. Koshurba^{1,2}¹Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
Kharkiv, Ukraine²Municipal non-commercial enterprise «Chernivetsk Regional Perinatal Center»
Kharkiv, Ukraine

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КРІОЕКСТРАКТУ ПЛАЦЕНТИ НА ПРОЦЕСИ ЦИТОЛІЗУ ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ ЗА CCl₄-ІНДУКОВАНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

Study of the effect of cryopreserved placenta extract on the processes of cytolysis and lipid peroxidation in CCl₄-induced liver damage

Реферат

Пошук нових стратегій корекції екзогенно-токсичних уражень печінки обумовлено неухильним зростанням захворюваності на гепатити та цироз серед працездатного населення, що є важливою медико-соціальною проблемою.

Мета роботи. Встановити вплив кріоекстракту плаценти (КЕП) на стан печінки щурів при тетрахлорметан (CCl₄)-індукованому ураженні за показниками перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та маркерами цитолізу.

Матеріали та методи. Експериментальні дослідження проведені на 28 щурах-самцях. Гострий CCl₄-індукований гепатит відтворювали шляхом одноразового введення 50,0% олійного розчину CCl₄. КЕП вводили 1 р/д впродовж 5 днів до введення CCl₄. Матеріалом для дослідження виступали цільна кров та гомогенати печінки, в яких визначали вміст реактантів з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-РП), активність каталази, активність супероксиддисмутази (СОД), активність аланінамінотрансферази (АлАт) та аспартатамінотрансферази (АсАт), а також активність γ-глутаміл-траспептидази (γ-ГТП) та лужної фосфатази (ЛФ) за загальноприйнятими методиками.

Результати та їх обговорення. Дослідження показало, що у щурів яким профілактично вводили КЕП вміст ТБК-РП в гомогенатах

Abstract

The search for new strategies for the correction of exogenous toxic liver lesions is due to the steady increase in the incidence of hepatitis and cirrhosis among the working population, which is an important medical and social problem.

The purpose of the study. Determine the effect of cryopreserved placenta extract (CEP) on the state of the liver of rats with tetrachloromethane (CCl₄)-induced damage by indicators of lipid peroxidation (LP) and markers of cytolysis.

Materials and methods. Experimental studies were conducted on 28 male rats. Acute CCl₄-induced hepatitis was reproduced by a single injection of 50,0% CCl₄ oil solution. CEP was administered 1 time per day for 5 days before the introduction of CCl₄. The material for the study was whole blood and liver homogenates, in which the content of reactants with thiobarbituric acid (TBA-RP), catalase activity, superoxide dismutase (SOD) activity, alanine aminotransferase (AlAt) and aspartate aminotransferase (AsAt) activity, as well as γ-glutamyl activity were determined. γ-glutamyl transpeptidases (γ-GTP) and alkaline phosphatase (AP) according to standard methods.

Results and discussion. The study showed that the content of TBA-RP in liver homogenates was lower ($p < 0,01$) by 35,6% in rats that were prophylactically injected with CEP compared

печінки був нижче ($p < 0,01$) на 35,6% відносно показників щурів зі змодельованим CCl_4 -індукованим гепатитом без лікування (контрольна група). Встановлено зростання рівня каталази ($p = 0,02$) при застосуванні КЕП на 33,8% та зростання активності СОД ($p < 0,01$) на 45,5% відносно показників щурів групи контролю. Також показано, що рівень АЛАТ після введення КЕП знизився ($p < 0,001$) на 56,0%, рівень АСАТ – знизився ($p < 0,001$) на 48,6%, рівень γ -ГТП – знизився на 37,8% відносно показників щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом без лікування.

Висновки. Профілактичне п'ятиденне введення КЕП призводить до нівелювання CCl_4 -індукованої активації ПОЛ та ознак синдрому цитолізу.

Ключові слова: кріоконсервований екстракт плаценти, тетрахлорметановий гепатит, гепатопротекція, цитоліз, перекисне окислення ліпідів.

ВСТУП

Наслідки військових дій в Україні вже сьогодні становлять серйозні виклики для забезпечення функціонування системи громадського здоров'я: перебування людей в незадовільних гігієнічних умовах у бомбосховищах, підвалах та інших укриттях, стрес, нестача якісних продуктів харчування та води, ліків, кваліфікованої медичної допомоги, зростання кількості вогнепально-вибухових ран, знаходження в приміщеннях без опалення, фінансова криза, втрата роботи та багато іншого сприяють поширенню низки інфекційних хвороб, зокрема туберкульозу, гострих кишкових інфекцій, дифтерії, ботулізму та вірусних гепатитів В та С [1]. Гострі токсичні ураження печінки гепатотоксичними отрутами, знеболюючими, протизапальними, антибактеріальними, антиметаболічними та іншими лікарськими препаратами, становлять загрозу життю через високий ризик розвитку печінкової недостатності. Це визначає необхідність пошуку нових резервів, а також методів корекції, спрямованих на підтримку структурної цілісності та функціональної стабільності печінки [2]. На сьогоднішній день до числа гепатопротекторів належать речовини різної хімічної будови, серед яких виокремлюють:

1. гепатопротектори рослинного походження (легалон, силімар, карсил, росилімар, гепабене, біеносилім, сибектан, фосфонціале, гепафор, артихол та ін.);

2. фосфоліпідні препарати (ессенціале, резалют, фосфоглів, еслівер, фосфонціале, ліволін, еслідин, вітрум ейконол, сикод та ін.);

3. похідні амінокислот (L-орнітин-L-аспартат, глутамін-аргінін, адеметіонін, метіонін та ін.);

4. препарати урсодезоксихолевої кислоти

to rats with simulated CCl_4 -induced hepatitis without treatment (control group). An increase in the level of catalase ($p = 0,02$) with the use of CEP was established by 33,8% and an increase in the activity of SOD ($p < 0,01$) by 45,5% compared to the indicators of rats in the control group. It is also shown that the level of ALAt after administration of CEP decreased ($p < 0,001$) by 56,0%, the level of AsAt decreased ($p < 0,001$) by 48,6%, the level of γ -HTP decreased by 37,8% compared to the rats with untreated CCl_4 -induced hepatitis.

Conclusions. Prophylactic five-day administration of CEP leads to the leveling of CCl_4 -induced LP activation and signs of cytolysis syndrome.

Keywords: cryopreserved placenta extract, tetrachloromethane hepatitis, hepatoprotection, cytolysis, lipid peroxidation.

(грінтерол, укрлів, урослів, урсофальк, урсохол та ін.);

5. селеновмісні засоби (селеназа, лівонорм, детоксил та ін.);

6. препарати інших груп (токоферолу ацетат, кислота аскорбінова та ін.) [3, 4, 5].

У якості гепатопротекторних засобів останнім часом все частіше розглядають органопрепарати, які отримують з біологічних тканин. Механізм дії органопрепаратів комплексний та включає прямий і опосередкований активуючий вплив на процеси регенерації. Активація синтезу білка препаратами біологічної терарії може здійснюватися за рахунок дії речовин пептидної або нуклеїнової природи, які входять до їх складу.

Відомо про цілу низку механізмів токсичного впливу на печінку, що пов'язане з різноманітністю потенційних токсикантів, а також з безліччю структур та функцій, які вони порушують. Токсикант, що досяг мішені, може безпосередньо вступати з нею у взаємодію, викликаючи клітинну дисфункцію, а також здатний змінювати біологічне оточення, впливаючи на молекули, органели, клітини чи органи. На сьогоднішній день існує велика кількість експериментальних моделей пошкодження печінки, обумовлених дією токсичних речовин, числу яких належить D-галактозамін, парацетамол, CCl_4 , тіоацетамід, конканавалін-А та ін. Серед токсичних моделей широке поширення отримала модель токсичного пошкодження печінки, індукована введенням CCl_4 [6, 7]. Гепатотоксичний ефект CCl_4 обумовлений аутокаталітичним перекисним окисленням ліпідів (ПОЛ), що виникає внаслідок впливу вільних радикалів, утворених при метаболізмі цієї сполуки в ендоплазматичному ретикулумі печінки під впливом комплексу оксидаз (рис. 1).



Рис. 1. Схема патогенної дії галагенованих вуглеводнів

Пошук нових стратегій корекції екзогенно-токсичних уражень печінки обумовлений неухильним зростанням захворюваності на гепатити та цироз серед працездатного населення, що є важливою медико-соціальною проблемою. У якості потенційного лікарського засобу з можливою гепатопротекторною активністю нашу увагу привернув кроекстракт плаценти (КЕП). Вперше кріоконсервованій препарат плацентарної тканини людини отримано науковцями Інституту проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України (далі – ІПКіК НАН України), які й розробили та впровадили в практику унікальну методику його тривалого зберігання у низькотемпературному середовищі [8, 9]. Плацента є природним «депо» та продуцентом практично всього спектру біологічно активних речовин, що забезпечують ріст плоду під час внутрішньоутробного розвитку. Вона забезпечує процеси трофіки та білковий синтез, газообмін, гормонovidілення та гормонорегуляцію, регуляцію кров'яного тиску, зсідання крові, антитоксичну функцію та виділення метаболітів, депонування біологічно активних речовин, регуляцію процесів ПОЛ та ін. [10, 11, 13].

МЕТА РОБОТИ

Встановити вплив кріоекстракту плаценти на стан печінки щурів при тетрахлорметан-індукованому ураженні за показниками перекисного окислення ліпідів та маркерами цитолізу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведено на 28 щурах-самцях масою 200–220 г, рандомізованих на чотири групи: I – інтактні щури (n = 7); II (контроль) – щури з модельною патологією (гострий CCl_4 -індукований гепатит) без лікування (n = 7);

III – щури (n = 7) з гострим CCl_4 -індукованим гепатитом, яким вводили КЕП (0,16 мл/кг маси тіла, внутрішньом'язово (в/м)); IV – щури (n = 7) з гострим CCl_4 -індукованим гепатитом, яким вводили референс-препарат силбор (50 мг/кг, внутрішньошлунково (в/шл)) [12, 14, 15, 16].

Гострий CCl_4 -індукований гепатит відтворювали шляхом внутрішньошлункового (в/шл) введення 50,0% олійного розчину CCl_4 у дозі 10 мл/кг маси тіла тварини одноразово, що викликало гостру жирову дистрофію печінки [12]. Тварин виводили з експерименту через 24 год після введення CCl_4 .

КЕП вводили в/м у профілактичному режимі – 1 р/д впродовж 5 днів до введення CCl_4 . КЕП отримано у Державному підприємстві «Міжвідомчий науковий центр (МНЦ) кріобіології і кріомедицини НАН, Національної академії медичних наук (НАМН) та МОЗ України» у вигляді ампульованого препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти». Заготівля, консервування та гіпотермічне зберігання КЕП виконувалось згідно методики, розробленої в ІПКіК НАН України [8, 9, 14]. Різниця цільової концентрації речовин в крові ссавців та людини, яка залежить від інтенсивності їх надходження та елімінації, обумовлює видові відмінності в дозах лікарських препаратів для досягнення еквівалентних ефектів. Тому для екстраполяції середньотерапевтичних доз для людини на ізоефективні дози для щурів нами здійснено перерахунок за методом Риболовлева Ю.Р. та співав. [12, 14]. Препарат КЕП «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» згідно інструкції застосовується у пацієнтів парентерально в разовій дозі 1,8 мл. Відповідно разова доза для щурів становить: $(1,8 \text{ мл}/70 \text{ кг}) \times 6,35 = 0,16 \text{ мл}/\text{кг}$ маси тіла або відповідно $0,02 \text{ мл}/100 \text{ г}$ маси тіла щура. Перед застосуванням препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» разову дозу

(0,16 мл/кг) екстемпорально розводили у 0,9% р-ні NaCl з розрахунку 0,1 мл 0,9% розчину (р-ну) NaCl/100 г маси тіла. Через 24 год після введення CCl_4 щурів виводили з експерименту шляхом червікальної дислокації під інгаляційним «рауш-наркозом».

Матеріалом дослідження виступали цільна кров та гомогенати печінки. Для отримання гомогенату тканини печінки перфузували холодним (+4°C) ізотонічним 1,15% розчином KCl та гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) у середовищі буферного розчину при співвідношенні 1 : 10 (маса/об'єм: наважка 250 мг + 2,25 мл 1,15% розчину KCl), отримуючи 10,0% гомогенат. Постядерний супернатант отримували шляхом центрифугування гомогенату СОШ впродовж 30 хв при 600 г з подальшим відбором аліквот у мікропробірки «Eppendorf». Депротейнізований екстракт отримували додаванням до гомогенату тканини СОШ трихлорцтової кислоти (0,6 М) з подальшою нейтралізацією 5,0 М калію карбонатом. При визначенні активності NO-синтаз гомогенат СОШ перфузували холодним (+4°C) буферним розчином (250 ммоль сахароза, 5 ммоль Na_2EDTA , 5 ммоль трис-HCl буфер (pH = 7,4)) та гомогенізували при 3000 об/хв (тефлон-скло) у середовищі буферного розчину.

Вміст реактантів з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-РП) визначали спектрофотометрично за методом Asakawa T. et al. за реакцією з тіобарбітуровою кислотою та розраховували за показниками оптичної щільності, визначеної за світлопоглинанням при довжині хвилі $\lambda = 535$ нм, враховуючи коефіцієнт молярної екстинції забарвленого у червоний колір комплексу, який дорівнює $1,56 \times 10^5$ моль⁻¹/см⁻¹ та виражали у мкмоль/кг тканини [17, 20]. Активність каталази визначали спектрофотометрично за методом Корольок М.А. та співав. за світлопоглинанням при довжині хвилі $\lambda = 410$ нм. Метод ґрунтується на здатності каталази розкладати H_2O_2 та утворювати стійкий комплекс жовтого кольору з амоній молібдатом (4,0% – 1,0 мл), який додають для зупинки реакції H_2O_2 з каталазою. Активність каталази виражали у мкат/кг тканини [19, 20]. Антиоксидантно-прооксидантний індекс (АПІ) визначали за формулою:

$$\text{АПІ} = (\text{Активність каталази} \times 100) / \text{Вміст ТБК-РП}$$

Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали спектрофотометрично за методом Чевари С. та співав., за здатністю СОД інгібувати відновлення нітротетразолію синього при наявності НАДН₂ за показниками оптичної щільності, визначеними при довжині хвилі $\lambda = 540$ нм. Активність СОД виражали у ум од/кг [18, 20]. Активність аламінінотрансферази (АлАт) визначали спектрофотометрично за методом Reitman S. та Frankel S., який ґрунтується на тому, що внаслідок амінування 2-оксоглутарової кисло-

ти L-аланіном, яке відбувається під дією АлАт, утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідрозонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в лужному середовищі при довжині хвилі $\lambda = 530$ (500–560) нм. Показник виражали у мкмоль/(мл × год) [19, 20]. Активність аспартатамінотрансферази (АсАт) визначали спектрофотометрично за методом Reitman S. та Frankel S., який ґрунтується на тому, що внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аспарагіновою кислотою, яке відбувається під дією АсАт, утворюються L-глутамінова та щавелевооцтова к-ти, яка декарбоксилується до піровиноградної к-ти. Показник виражали у мкмоль/(мл × год) [20]. Розраховували коефіцієнт де Рітца = АсАт/АлАт. Активність γ -глутаміл-траспептидази (γ -ГТП) визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на тому, що під дією γ -ГТП глутаміновий залишок з гамма-L-(+)-глутаміл-4-нітроаналіда переходить на дипептидний акцептор – гліцилгліцин. При цьому вилучається хромоген-п-нітроанілін. Оптичну щільність реакційного розчину вимірюють при довжині хвилі $\lambda = 405$ (400–430) нм після гальмування ензиматичної реакції ацетатною к-тою. Показник виражали у Од/л [20, 22, 23]. Активність лужної фосфатази (ЛФ) визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на властивості ЛФ гідролізувати ефірний зв'язок у β -гліцерофосфаті з відщепленням фосфатної кислоти. Вміст фосфору, що утворився, визначають за реакцією з молібденовим реактивом у присутності аскорбінової кислоти. Інтенсивність забарвлення молібденового синього пропорційна к-ті фосфору. Показник виражали у мкмоль/л [20, 21].

Методи статистичної обробки. Статистичну обробку одержаних результатів проведено з використанням прикладної програми для роботи з електронними таблицями «Microsoft Office Excel 2003; 2013» (Microsoft Corporation, США) за допомогою розширення «Real Statistics» (<http://www.real-statistics.com/>) у середовищі Widows 10 (Microsoft Corporation, США). Оцінку характеру розподілу величин в кожній групі вибіркової сукупності проводили з використанням W – критерію Шапіро-Вілка (Shapiro-Wilk test, $n < 50$). Однорідність дисперсій визначали за критерієм Левена (Levene's test). Для оцінки значущості виявлених відмінностей досліджуваних показників за різних умов експерименту проводили статистичний аналіз з використанням параметричних або непараметричних критеріїв.

При нормальному розподілі незалежних величин відмінності між групами визначали попарно за t -критерієм Ст'юдента. При ненормальному розподілі принаймні однієї з груп незалежних величин відмінності між ними

визначали попарно за непараметричним ранговим U-критерієм Манна-Уїтні (Mann-Whitney). Отримані значення порівнювали з критичними при рівні вірогідності вище 95,0% ($p \leq 0,05$), вище 99,0% ($p \leq 0,01$), вище 99,5% ($p \leq 0,005$) та вище 99,9% ($p \leq 0,001$) та робили висновок про ймовірність похибки. Цифрові дані у разі нормального розподілу величин наведені у вигляді « $M \pm m$ » ($M \pm SE$), де M – середнє арифметичне значення, m (SE) – стандартна похибка середнього арифметичного або M (95% ДІ: 5% – 95%), де 95% ДІ: – 95% довірчий інтервал (Confidence interval – CI). При ненормальному розподілі отриманих величин дані представлені у вигляді $Me [LQ; UQ]$, де Me – медіана, $[LQ; UQ]$ – верхня межа нижнього квантиля (lower quartile – LQ) та нижня межа верхнього квантиля (upper quartile – UQ). Для графічного представлення даних обрано діаграми розмаху (box-and-whiskers diagram – «шухлядові» діаграми з «вусами») [24].

Біоетичні аспекти дослідження. Всі експериментальні дослідження над лабораторними тваринами виконано з урахуванням вимог належної лабораторної практики «GLP» (Good Laboratory Practice), відображених в настанові «Лікарські засоби. Належна лабораторна практика», затвердженої Законом України наказом МОЗ України № 95 від 16 лютого 2009 р. і з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях від 18 березня 1986 р., Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 р. про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, наказу МОЗ України від 14 грудня 2009 р. № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», Закону України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Комплексну програму досліджень розглянуто та погоджено Комітетом з біоетики при ІПКіК НАН України (витяг з Протоколу № 2 від 3 січня 2022 р.).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показало, що в ініціюючим механізмом розвитку гострого CCl_4 -індукованого гепатиту у щурів виступає активація аутокаталітичного ПОЛ, викликана дією вільних радикалів, зокрема трихлорметильного (CCl_3^+) та трихлорметилпероксидного (CCl_3OO^+), які є метаболітами CCl_4 [6, 7]. На активацію процесів ПОЛ в тканинах печінки під дією CCl_4 вказувало підвищення вмісту ТБК-РП у 3 рази ($p < 0,01$) на тлі зниження активності каталази на 21,3% ($p = 0,15$) та СОД на 52,2% ($p < 0,001$) відносно показників

інтактних щурів (табл. 1). Встановлене накопичення продуктів ПОЛ на тлі виснаження антиоксидантної системи (АОС) призвело до статистично вірогідного ($p < 0,01$) зниження інтегрального показника стану ПОЛ-АОС – АПІ на 72,1% відносно показників інтактних тварин (рис. 2).

Крім активації процесів ПОЛ встановлено, що одноразове введення CCl_4 у дозі 10 мл/кг маси тіла призводило до гострого токсичного гепатиту, який супроводжується розвитком цитолізу, що підтверджується статистично вірогідним ($p < 0,001$) зростанням АЛат та АсАт у 2,3 та 2,1 рази відповідно відносно показників інтактних щурів, що призводило до зниження кофіцієнту де Рітиса на 22,9% ($p < 0,01$). Як відомо, зменшення кофіцієнту де Рітиса відзначається при активації процесів гліюкогенезу через гліюкозоаланіновий шунт із використанням АЛат, який є необхідним для підтримки адекватного рівня гліюкози у крові та розвитку гіпоглікемії, що призводить до зростання активності трансаміназ або може вказувати на зниження функціональної активності печінки [25]. На індукцію деструктивно-запальних процесів у паренхімі печінки також вказує статистично вірогідне ($p < 0,001$) зростання активності γ -ГТП та ЛФ на 64,8% та 85,8% відповідно відносно показників інтактних тварин (табл. 2). Отримані дані узгоджуються із літературними відомостями про зростання γ -ГТП з одночасним підвищенням рівня ЛФ у 90,0% хворих на захворювання печінки та гепатобіліарної системи [20]. Збільшення активності γ -ГТП в сироватці крові може бути обумовлена не тільки індукуванням синтезу ферменту, а і вивільненням мембранозв'язаного пулу вказаного ферменту, що доцільно розцінювати як ознаку цитолітичних процесів [20].

Порівняльний аналіз гепатороптективної активності силібору та КЕП показав, що за здатністю пригнічувати CCl_4 -індуковані процеси ПОЛ досліджуваний кріоекстракт дещо поступався обраному референс-препарату. Так вміст ТБК-РП в гомогенатах печінки статистично вірогідно ($p < 0,01$) був нижче у щурів яким профілактично вводили КЕП на 35,6%, а після введення силібору був нижче на 53,8% відносно показників щурів контрольної групи та становив $12,1 \pm 1,71$ (95% ДІ: 8,8–15,5) мкмоль/кг тканини та $8,7 \pm 1,06$ (95% ДІ: 6,6–10,8) мкмоль/кг тканини відповідно. З боку активності АОС встановлено співставне зростання рівня каталази як при застосуванні КЕП так і при застосуванні силібору відповідно на 33,8% та 37,6% відносно показників щурів зі змодельованим CCl_4 -індукованим гепатитом без лікування (табл. 1). Крім того відмічене статистично вірогідне зростання активності СОД на 45,5% та 63,6% відносно показників тварин групи контролю відповідно на тлі застосування КЕП та силібору.

Вплив КЕП за профілактичного режиму введення на біохімічні показники перекисного окислення ліпідів та антиоксидантної системи в гомогенатах печінки на тлі CCl_4 -індукованого гепатиту у щурів ($M \pm m$ (95% ДІ) або Me [LQ; UQ], n = 28)

Досліджуваний показник, одиниці вимірювання	Умови експерименту			
	I група	II група	III група	IV група
	Інтактні щури	CCl_4 -гепатит	CCl_4 + КЕП	CCl_4 + Силібор
n	7	7	7	7
ТБК-РП, мкмоль/кг тканини	6,1 ± 0,74 (95% ДІ: 4,7–7,6)	18,9 ± 2,92 (95% ДІ: 13,1–24,6) $p_{1-2} < 0,01$	12,1 ± 1,71 (95% ДІ: 8,8–15,5) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} = 0,07$	8,7 ± 1,06 (95% ДІ: 6,6–10,8) $p_{1-4} = 0,07$ $p_{2-4} < 0,01$ $p_{3-4} = 0,1$
Каталаза, мкат/кг тканини	2,4 ± 0,27 (95% ДІ: 1,9–2,9)	1,9 ± 0,18 (95% ДІ: 1,5–2,2) $p_{1-2} = 0,15$	2,5 ± 0,14 (95% ДІ: 2,2–2,8) $p_{1-3} = 0,7$ $p_{2-3} = 0,02$	2,6 ± 0,36 (95% ДІ: 1,9–3,3) $p_{1-4} = 0,7$ $p_{2-4} = 0,1$ $p_{3-4} = 0,9$
СОД, ум. од/кг	4,9 ± 0,35 (95% ДІ: 4,2–5,6)	2,4 ± 0,14 (95% ДІ: 2,1–2,6) $p_{1-2} < 0,001$	3,4 ± 0,17 (95% ДІ: 3,1–3,8) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,001$	3,9 ± 0,21 (95% ДІ: 3,4–4,3) $p_{1-4} = 0,02$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} = 0,1$

Примітки: Індексами $_{1, 2, 3, 4}$ вказано номер групи, між показниками яких проведено зрівняння; p_{2-1} – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників

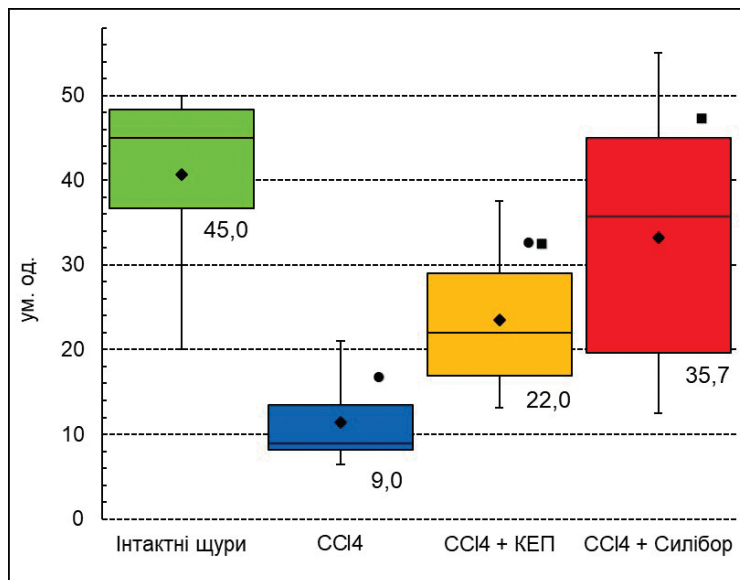


Рис. 2. Вплив КЕП за профілактичного режиму введення на значення антиоксидантно-прооксидантного індексу в гомогенатах печінки на тлі тетрахлорметанового гепатиту у щурів

Примітки: Розподіл величин ненормальний. Бокси включають результати від 25-го до 75-го перцентилю, вертикальні лінії за межами боксів – мінімальне та максимальне значення. Горизонтальна лінія всередині боксу – медіана; ♦ – середнє значення; ● – $p < 0,05$ відносно показників інтактних щурів; ■ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з гострим тетрахлорметановим гепатитом; ▲ – $p < 0,05$ відносно показників щурів з гострим тетрахлорметановим гепатитом, яким вводили силібор

Оцінка впливу п'ятиденного профілактичного введення КЕП та силібору до відтворення CCl_4 -

індукованого ураження печінки показала здатність застосованого у дослідженні кріоекстракту

до виразнішого нівелювання цитолітичного синдрому на тлі модельного гострого токсичного гепатиту порівняно з рослинним препаратом силібором. Так встановлено, що рівень АЛат в периферичній крові щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом після введення КЕП статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизився на 56,0%, в той час як введення силібору призвело до зниження аналогічного показника ($p < 0,001$) лише на 32,0% відносно показників щурів групи контролю (табл. 2). Аналогічні зміни встановлені і з боку рівня АсАт – на тлі введення КЕП вказаний показ-

ник знизився ($p < 0,001$) на 48,6%, в той час як при застосуванні рослинного референс-препарату вказаний показник був нижчим ($p < 0,01$) на 28,6% відносно показників щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом без лікування (табл. 2). Вказані зміни з боку рівня амінотрансфераз призвели до виразнішої нормалізації значення коефіцієнту де Рітиса, який на тлі введення КЕП зріс на 28,7% ($p = 0,07$), в той час як після профілактичного введення силібору аналогічний показник зріс ($p = 0,06$) на 19,5% порівняно з показниками щурів без лікування.

Таблиця 2

Вплив КЕП за профілактичного режиму введення на рівень маркерів цитолізу в периферичній крові щурів на тлі тетрахлорметанового гепатиту (M ± m (95% ДІ) або Me [LQ; UQ], n = 28)

Номер групи	Умови досліджу	n	АЛат, мкмоль/ (мл × год)	АсАт, мкмоль/ (мл × год)	Коефіцієнт де Рітиса (АсАт/АЛат)	γ-ГТП, Од/л	Лужна фосфатаза, мкмоль/л
1	Інтактні щури	7	1,1 [1,0; 1,1]	1,7 [1,6; 1,8]	1,6 ± 0,08 (95% ДІ: 1,4–1,8)	6,4 ± 0,12 (95% ДІ: 6,2–6,7)	2,6 ± 0,12 (95% ДІ: 2,4–2,8)
2	CCl_4 -гепатит (ТХМ)	7	2,5 [2,5; 2,9] $p_{1-2} < 0,001$	3,5 [3,1; 3,5] $p_{1-2} < 0,001$	1,2 ± 0,05 (95% ДІ: 1,1–1,3) $p_{1-2} < 0,01$	10,6 ± 0,65 (95% ДІ: 9,3–11,8) $p_{1-2} < 0,001$	4,9 ± 0,45 (95% ДІ: 4,0–5,7) $p_{1-2} < 0,001$
3	ТХМ + КЕП	7	1,1 [1,0; 1,2] $p_{1-3} = 0,4$ $p_{2-3} < 0,001$	1,8 [1,5; 2,0] $p_{1-3} = 0,28$ $p_{2-3} < 0,001$	1,6 ± 0,16 (95% ДІ: 1,3–1,9) $p_{1-3} = 0,5$ $p_{2-3} = 0,07$	6,6 ± 0,61 (95% ДІ: 5,4–7,8) $p_{1-3} = 0,8$ $p_{2-3} < 0,001$	3,7 ± 0,22 (95% ДІ: 3,3–4,2) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} = 0,05$
4	ТХМ + Силібор	7	1,7 [1,6; 1,8] $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,01$	2,5 [2,3; 2,5] $p_{1-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,01$ $p_{3-4} < 0,01$	1,5 ± 0,11 (95% ДІ: 1,2–1,7) $p_{1-4} = 0,1$ $p_{2-4} = 0,06$ $p_{3-4} = 0,3$	8,5 ± 0,57 (95% ДІ: 7,4–9,6) $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} = 0,03$ $p_{3-4} = 0,04$	3,2 ± 0,05 (95% ДІ: 3,1–3,3) $p_{1-4} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,01$ $p_{3-4} = 0,04$

Примітки: Індексами $1, 2, 3, 4$ вказано номер групи, між показниками яких проведено зрівняння; p_{2-1} – рівень статистичної вірогідності розбіжності показників

На виразнішу цитопротективну дію КЕП вказувало й статистично вірогідне ($p < 0,001$) зниження рівня γ-ГТП на 37,8% відносно показників щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом без лікування.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що на тлі розвитку CCl_4 -індукованого гепатиту відмічається статистично вірогідне підвищення вмісту ТВК-РП у 3 рази ($p < 0,01$) відносно інтактних тварин при одночасному виснаженні антиоксидантної системи. Крім того відмічаються ознаки розвитку цитолітичного синдрому, що підтверджується статистично вірогідним ($p < 0,001$) зростанням рівня АЛат та АсАт у 2,3 та 2,1 рази, а також статис-

тично вірогідне ($p < 0,001$) зростання активності γ-ГТП та ЛФ на 64,8% та 85,8% відповідно відносно показників інтактних тварин.

2. Профілактичне п'ятиденне введення КЕП призводить до нівелювання CCl_4 -індукованої активації ПОЛ та ознак синдрому цитолізу: вміст ТВК-РП в гомогенатах печінки статистично вірогідно ($p < 0,01$) знизився на 35,6% відносно показників щурів контрольної групи та становив відповідно $12,1 \pm 1,71$ (95% ДІ: 8,8–15,5) мкмоль/кг тканини; рівень АЛат після введення КЕП статистично вірогідно ($p < 0,001$) знизився на 56,0%; рівень АсАт – знизився ($p < 0,001$) на 48,6%, рівень γ-ГТП – знизився на 37,8% відносно показників щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом без лікування.

REFERENCES

1. Railian MV, Chumachenko TO, Makarova VI, Semishev VI. Acute Hepatitis of Unknown Etiology: the Task of Epidemiological Surveillance in Ukraine in Modern Conditions. *Ukrains'kij žurnal medicini, biologii ta sportu* [Internet]. 2022; 7 (3): 21–26. Available from: doi:10.26693/jmbs07.03.021.
2. Drug-, herb- and dietary supplement-induced liver injury. *Archivos Argentinos de Pediatría* [Internet]. 2017; 115 (6). Available from: doi:10.5546/aap.2017.eng.e397.
3. Palmer M, Regev A, Lindor K, Avigan MI, Dimick-Santos L, Treem W, et al. Consensus guidelines: best practices for detection, assessment and management of suspected acute drug-induced liver injury occurring during clinical trials in adults with chronic cholestatic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [Internet]. 2019; 51 (1): 90–109. Available from: doi:10.1111/apt.15579.
4. Garcia-Cortes M, Robles-Diaz M, Stephens C, Ortega-Alonso A, Lucena IM, Andrade RJ. Drug induced liver injury: an update. *Archives of Toxicology* [Internet]. 2020; 94 (10): 3381–3407. Available from: doi:10.1007/s00204-020-02885-1.
5. Hamilton LA, Collins-Yoder A, Collins RE. Drug-Induced Liver Injury. *AACN Advanced Critical Care* [Internet]. 2016; 27 (4): 430–440. Available from: doi:10.4037/aacnacc2016953.
6. Frank D, Savir S, Gruenbaum BF, Melamed I, Grinshpun J, Kuts R, et al. Inducing Acute Liver Injury in Rats via Carbon Tetrachloride (CCl₄) Exposure Through an Orogastric Tubexposure Through an Orogastric Tube. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2020; (158). Available from: doi:10.3791/60695.
7. Myshkin VA, Enikeev DA, Srubilin DV. Experimental evaluation of pyrimidine derivatives on models toxic liver damage: a review. *Scientific Review. Medical Sciences*. 2016; 3: 88–98.
8. Evtereva YA, Holtsev AN, Yurchenko TN, Blazhko EV, Bobyreva LE, Heraskyna LR, Hryshchenko VY, Hubyina-Vakulyk HY, Dvornyk YL, Zhdan VN. Placenta: cryopreservation, clinical use. *Kharkiv: Harkovskij Nacjonalnyj Mediczynskij Universitet*; 2013.
9. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and Placental Derivatives in Regenerative Therapies: Experimental Studies, History, and Prospects. *Stem Cells International* [Internet]. 2018; 2018: 1–14. Available from: doi:10.1155/2018/4837930.
10. Koshurba IV, Hladkykh RV, Chyzh MO. The effect of placental cryoextract on the state of protein-lipid metabolism in the gastric mucosa in experimental stress-induced ulcers. *Eastern Ukrainian Medical Journal* [Internet]. 2022; 10 (2): 155–164. Available from: doi:10.21272/eumj.2022;10(2):155-164.
11. Koshurba IV, Hladkykh FV, Chyzh MO. Evaluation of antiulcerogenic effect of cryoconserved placenta extract on the model of ethanol-predisonolic lesions of the gastric mucosa. *Medical Science of Ukraine (MSU)* [Internet]. 2022; 18 (2): 3–9. Available from: doi:10.32345/2664-4738.2.2022.01.
12. Stefanov OV. Preclinical studies of drugs: guidelines. *Kyiv: Avicenna*; 2001.
13. Hladkykh F. Antiulcer activity of placental cryoextract in experimental indomethacin-induced ulcerogenesis. *Acta Medica Leopoliensia* [Internet]. 2021; 27 (3–4): 68–83. Available from: doi:10.25040/aml2021.3-4.068.
14. Hladkykh F. Gastrocytoprotective properties of cryopreserved placenta extract in combined action of low temperatures and inhibition of cyclooxygenase. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* [Internet]. 2022; 39 (1): 48–56. Available from: doi:10.5937/afmna139-33036.
15. Hladkykh FV, Chyzh MO. Nesteroidny'e protivovospalitel'ny'e sredstva: sovremennoe predstavlenie o mexanizmax povrezhdeniya pishhevaritel'nogo trakta, minusy` preparatov patogeneticheskogo lecheniya i perspektivy` biologicheskoy terapii NPVS-inducirovannoj e'zofag ogastroe'nterokolonopatii. *GASTROENTEROLOGY* [Internet]. 2021; 54 (4): 253–266. Available from: doi:10.22141/2308-2097.54.4.2020.216714.
16. Shanaida MI, Oleshchuk OM, Lykhatskyi PH, Kernychna IZ. Doslidzhennia hepatoprotekturnoi aktyvnosti ridkoho ekstraktu travy chaberu sadovoho pry tetrakhlormetanovomu hepattyti. *Farmatsevtichnyi chasopys* [Internet]. 2017; (2). Available from: doi:10.11603/2312-0967.2017.2.7899.
17. Asakawa T, Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids* [Internet]. 1980; 15 (3): 137–140. Available from: doi:10.1007/bf02540959.
18. Chevary S, Chaba I, Sekei Y. The role of superoxide reductase in the oxidative processes of the cell and the method for determining it in biological material. *Laboratory work*. 1985; 11: 678–681.
19. Korolyuk MA, Ivanova LK, Mayorova IG, Tokareva VA. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy. *Laboratornoye delo*. 1988; 4: 44–47.
20. Kamyshnikov VS. Handbook of clinical and biochemical research and laboratory diagnostics. *MEDpress-inform*; 2009.

21. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1946; 164 (1): 321–329. Available from: doi:10.1016/s0021-9258(18)43072-4.

22. Szasz G. A Kinetic Photometric Method for Serum γ -Glutamyl Transpeptidase. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1969; 15 (2): 124–136. Available from: doi:10.1093/clinchem/15.2.124.

23. Szasz G. New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Z Klin Chem Klin Biochem* . 1974; 12 (5): 228.

24. Zar JH. *Biostatistical analysis* (5 ed.). Prentice-Hall: Englewood; 2014.

25. Futorny SM, Osadchaya OI, Shmatova EA. 25., Osadchaya OI, Shmatova EA. *Sports medicine and physical rehabilitation*. 2016; 2: 13–19.

Стаття надійшла до редакції 01.06.2022