

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ І ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ ЗА УМОВ ІНДУКОВАНОГО ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ У ЩУРІВ

Дніпропетровська державна медична академія,
Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

Хронічні захворювання печінки часто призводять до розвитку фіброзу, який при несприятливому перебігу може завершитися цирозом. Золотим стандартом у діагностиці уражень печінки при хронічних гепатитах вважають аналіз біопсійного матеріалу печінки, що дозволяє досить повно оцінити ступінь фіброзних змін у цій тканині. Однак високий ризик ускладнень і неоднозначність морфологічної оцінки біоптату спонукає до пошуку нових неінвазійних маркерів фіброзу. Стандартними маркерами фіброгенезу вважають зменшення рівня тромбоцитів, альбуміну та співвідношення АЛТ/АСТ [1]. Останнім часом все більшого поширення набуває ліцензійний «Фібротест», що включає цілу низку біохімічних показників: α_2 -макроглобулін, загальний білірубін, аполіпопротеїн А1, гаптоглобін і активність γ -глутамілтранспептидази [2]. Враховуючи, що фіброз перш за все пов'язаний з перерозподілом компонентів екстрацелюлярного матриксу, слід очікувати, що саме ці зміни будуть вірогідніше відображати процес фіброзоутворення.

Метою нашого дослідження було встановити зміни рівня глікозаміногліканів і матриксних металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 у сироватці крові щурів за умов індукованого хронічного гепатиту й оцінити антифіброзні властивості вітчизняного цитопротектора глутаргіну.

Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували три групи білих щурів (по 7 тварин у кожній) лінії Вістар масою 170–200 г: 1-ша група — здорові тварини, у 2-й і 3-й групах була використана модель хронічного гепатиту С (ХГС) за В. Ю. Ніколенко і співавторами [3], що ґрунтується на токсичному ушкодженні гепатоцитів чотирихлористим вуглецем і формуванні автоімунної відповіді. Після триразового введення чотирихлористого вуглецю дозою 0,25 мл 50%-го розчину в рафінованій олії з урахуванням маси тіла тваринам вводили триразово гомогенат печінки з повним ад'ювантом Фрейнда дозою 0,5; 0,25; 0,25 мл через 15 і 9 днів і дворазово у проміжках азатіоприн дозою 50 мг/кг. Усі тварини знаходилися на звичайному загальнолабораторному раціоні. Після закінчення моделювання хвороби 3-тя група отримувала глутаргін («Здоровье», Харків) *per os* дозою 50 мг/кг маси тіла тварин один раз на день протягом 10 діб. Після закінчення експерименту тварин декапітували під ефірним наркозом згідно з етичними нормами.

У всіх тварин проводили морфологічне дослідження стану печінки й оцінку стандартних біохімічних показників у сироватці крові: аланін- і аспартат-амінотрансферази (АЛТ та АСТ), сечовини з використанням тест-наборів («Реагент»,

Дніпропетровськ). Визначення загального білка у сироватці крові проводили за методом Бредфорда [4]. Вміст гіалуронової кислоти та гепарину визначали за допомогою альціанового блакитного за методом Гольда [5]. Для оцінки активності ММП-2 і ММП-9 використовували метод ензим-зимографії у гелі, що містить 1% желатину [6]. Активність ММП у досліджуваних зразках сироватки щурів кількісно визначали як відсоток від еталона, як такий використовували пул 10 зразків плазми здорових людей. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Excel згідно з *t*-тестом, вірогідними вважалися дані, якщо $p < 0,1$.

Результати дослідження та їх обговорення

За даними морфологічних досліджень печінки дослідних щурів, порівняно з контрольною групою, у тварин 2-ї групи відмічалися зміни гепатоцитів, що характеризувалися дрібнозернистою цитоплазмою, гідропічною дистрофією, множинними фокальними некрозами та лімфоцитарною інфільтрацією. При забарвленні за Ван Гізоном встановлено фіброз портальних трактів. Після лікування глутаргіном у тварин 3-ї групи виявлені лише поодинокі фокальні некрози, помірне розширення портових трактів, збільшення кількості двоядерних гепатоцитів і вузькі тяжі сполучної тканини. Це свідчить про наяв-



ність репаративних процесів у гепатоцитах і зменшення фібротичного ураження печінки під дією глутаргіну.

При вивченні біохімічних показників у всіх досліджуваних тварин не було встановлено статистично вірогідних змін активності АЛТ і АСТ порівняно з контрольною групою, хоча половина тварин 2-ї групи мала підвищену активність указаних ферментів. Отримані дані вказують на те, що активність амінотрансфераз у щурів не є діагностично значущим показником хронічного ушкодження печінки. За результатами наших досліджень, у щурів 2-ї групи спостерігалось вірогідне зменшення загального білка до $(56,9 \pm 7,6)$ мг/мл і сечовини — до $(8,16 \pm 0,80)$ мкмоль/л. Лікування глутаргіном протягом 10 діб після розвитку хронічної форми ушкодження печінки призводило до відновлення нормального вмісту як загальної кількості білка у сироватці крові, так і сечовини (рис. 1, а, б).

Аналіз концентрації сульфатованих і нессульфатованих глікозаміногліканів у сироватці крові тварин 1-ї та 2-ї груп по-

казав відсутність статистично вірогідних змін рівня гепарину та збільшення гіалуронової кислоти в 1,43 разу в умовах хронічного ушкодження печінки (рис. 1, в, з). Отримані дані підтверджують можливість оцінки рівня гіалуронової кислоти в сироватці крові як чутливого тесту на наявність розвитку фіброзу за умов хронічного гепатиту С. Раніше було показано збільшення концентрації гіалуронової кислоти у сироватці крові пацієнтів, хворих на гепатит В, причому, на відміну від інших біохімічних маркерів, зміни рівня гіалуронової кислоти мали чітку кореляцію зі ступенем фіброзу та запалення у печінці [6]. Слід відзначити, що введення глутаргіну призводило до різноспрямованих змін продукції глікозаміногліканів. Було встановлено стимуляцію продукції гепарину в сироватці крові тварин 3-ї групи у 2 рази порівняно з контрольними тваринами, тимчасом як рівень гіалуронової кислоти зменшувався до нормальних значень. Цей факт можна пояснити різними механізмами біосинтезу гепарину та гіалуронової кислоти. Крім

того, Джан Ші і співавтори припускають, що гепарин та його низькомолекулярні форми можуть гальмувати експресію α -актину, проколагену I та IV, а також знижувати рівень гіалуронової кислоти у пацієнтів із хронічним гепатитом В [7]. Недавно було показано, що сульфатовані аналоги гепарину гальмують проникнення вірусу гепатиту С у клітини реципієнта [8].

Визначення активності матриксних металопротеїназ ММП-2 та ММП-9 у сироватці крові щурів показало, що активність ММП-9 вірогідно зростає за умов індукованого гепатиту, тимчасом як активність ММП-2 — знижується. Лікування глутаргіном призводило до збільшення проММП-9 на фоні зменшення його активної форми. Активність ММП-2 практично не змінювалася під впливом глутаргіну і залишалася нижчою порівняно з нормою (рис. 1, д). Цікаву закономірність встановлено при порівнянні співвідношення ММП-2/ММП-9 у досліджуваних групах, що становило 2,94, 1,29 і 1,73 у 1-й, 2-й та 3-й групі відповідно. Отримані нами результати можна зіста-

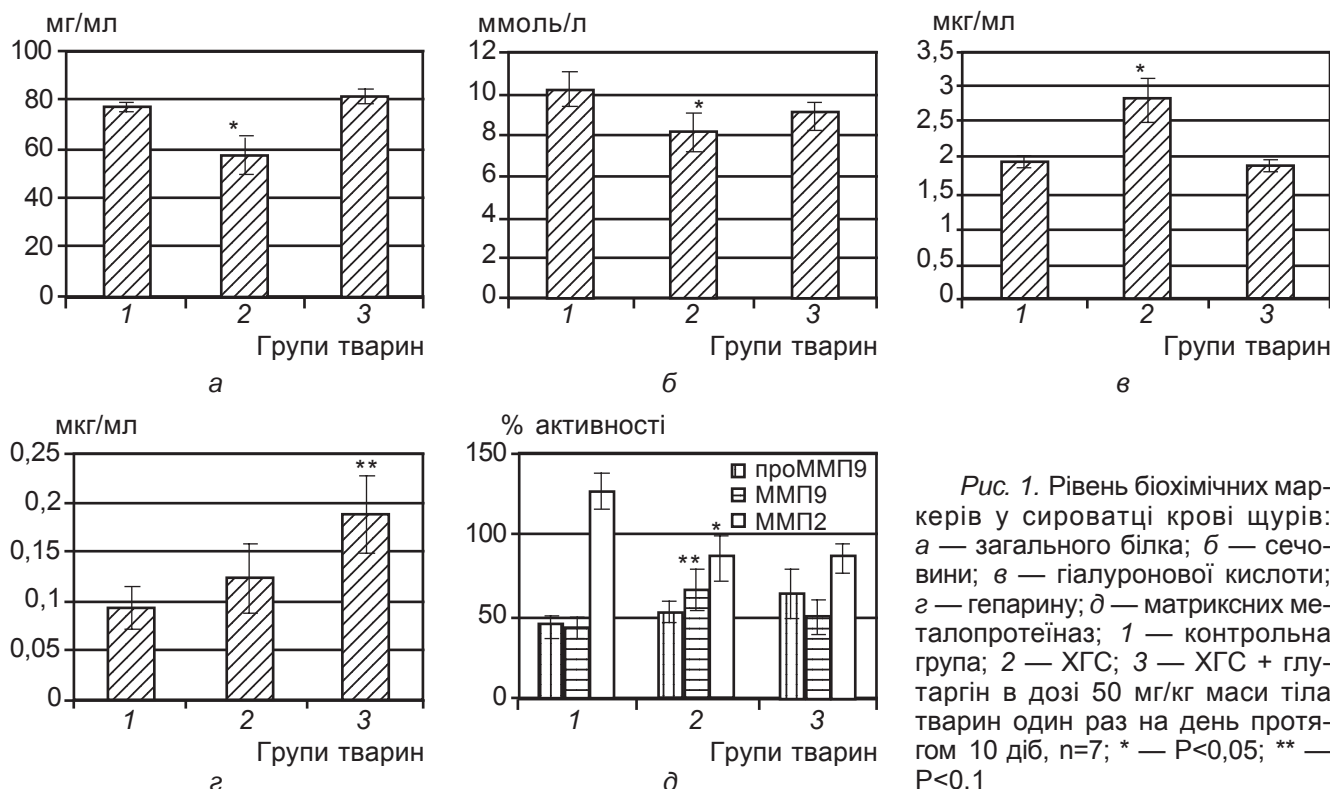


Рис. 1. Рівень біохімічних маркерів у сироватці крові щурів: а — загального білка; б — сечовини; в — гіалуронової кислоти; г — гепарину; д — матриксних металопротеїназ; 1 — контрольна група; 2 — ХГС; 3 — ХГС + глутаргін в дозі 50 мг/кг маси тіла тварин один раз на день протягом 10 діб, n=7; * — P<0,05; ** — P<0,1



вити з даними A. Khandoga et al. [9], які показали, що у відповідь на ішемію / реперфузію печінки в експериментальних мишей зростала активність тільки ММП-9, тимчасом як ММП-2 залишалася незмінною. Більше того, останнім часом з'явилися роботи, в яких обговорюються антифібротичні властивості ММП-9 [10]. Отже, співвідношення ММП-2/ММП-9 може бути більш вірогідним показником стану печінки, ніж визначення активності окремих желатиназ.

Висновки

Таким чином, на експериментальній моделі ХГС показано зміну концентрації компонентів міжклітинного матриксу в сироватці крові, що дає додаткову інформацію про розвиток фіброзу за допомогою неінвазивних методів. Отримані дані вказують на те, що глутаргін, маючи цитопротекторні, дезінтоксикаційні, антигіпоксантні властивості, ще й при-

скорює репаративні процеси у печінці та може бути рекомендований у комплексній терапії хворих на ХГС з метою гальмування фіброзоутворення в печінці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Павлов Ч. С. Современные методы ранней диагностики фиброза печени / Ч. С. Павлов, В. Б. Золоторевский, В. Т. Ивашкин [и др.] // Клиническая медицина — 2005. — Т. 83, № 12. — С. 58-60.
2. Halfon P. FibroTest-ActiTest as a non-invasive marker of liver fibrosis / P. Halfon, M. Munteanu, T. Poynard // Gastroenterol Clin Biol. — 2008. — Vol. 32 (6 Suppl 1). — P. 22-39.
3. Пат. 15752 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб моделювання хронічного гепатиту С / Ніколенко В. Ю., Ніколенко Ю. І., Ніколенко О. Ю.; заявник та патентовласник Донецький держ. мед. ун-т. — № u2006004614; заявл. 18.01.06; набрано чинності 17.07.06.
4. Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // Anal. Biochem. — 1956. — Vol. 72. — P. 248-254.

5. Gold E. W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels / E. W. Gold // Biochimica et Biophysica Acta. — 1981. — Vol. 673. — P. 408-415.

6. Serum hyaluronate as a non-invasive marker of hepatic fibrosis and inflammation in HBeAg-negative chronic hepatitis B / G. Montazeri, A. Estakhri, M. Mohamadnejad [et al.] // BMC Gastroenterol. — 2005. — Vol. 12. — P. 5-32.

7. Effects of heparin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B / J. Shi, J. H. Hao, W. H. Ren [et al.] // World J Gastroenterol. — 2003. — Vol. 9 (7). — P. 1611-1614.

8. Sulfated homologues of heparin inhibit hepatitis C virus entry into mammalian cells / A. Basu, T. Kanda, A. Beyene [et al.] // J. Virol. — 2007. — Vol. 81 (8). — P. 3933-3941.

9. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver / Andrej Khandoga, Julia S. Kessler, Marc Hanschen [et al.] // Journal of Leukocyte Biology. — 2006. — Vol. 79. — P. 1295-1304.

10. Inhibition of hepatic fibrogenesis by matrix metalloproteinase-9 mutants in mice / Martin Roderfeld, Ralf Weiskirchen, Sandra Wagner [et al.] // The FASEB Journal. — 2006. — Vol. 20. — P. 444-454.

Передплачуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті
Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

