

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ДАЦКО ВІТАЛІЙ АНДРІЙОВИЧ

УДК 612.12-02:616.831-001-06:616.831-006

ДИСЕРТАЦІЯ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТЕКТОРНОГО
ВПЛИВУ L-ОРНІТИНУ L-АСПАРТАТУ ЗА УМОВ
УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Дацко В.А.

Науковий керівник: Олещук Олександра Михайлівна, доктор медичних наук,
професор

Тернопіль – 2023

АНОТАЦІЯ

Дацко В. А. Експериментальне дослідження протекторного впливу L-орнітину L-аспартату за умов ураження печінки різного генезу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

У дисертаційній роботі наведено наукове обґрунтування і представлено результати вирішення актуального завдання – з'ясування ефективності L-орнітину L-аспартату (LOLA) при гострому гепатиті та цирозі печінки і встановлення нітроген оксид та поліамін-залежних механізмів дії препарату

Експериментальні дослідження проведено на 84 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях. Гострий токсичний гепатит моделювали одноразовим внутрішньочеревним введенням тетрахлорметану у розрахунку 2 г/кг маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину на оливковій олії. Контрольна група тварин отримувала ідентичний об'єм оливкової олії. Корируючі речовини вводили відповідно впродовж 2 та 6 діб інтраперитонеально, один раз на добу, щоденно. Дослідження проводили на 3-тю та 7-му доби. Цироз печінки моделювали шляхом перорального введення 50 % розчину тетрахлорметану двічі на тиждень протягом 12 тижнів з розрахунку 2 мл на кг маси тварини. Корируючі агенти вводили впродовж 10 діб після закінчення моделювання досліджу. Декапітацію тварин проводили під кетаміновим наркозом через 24 год після останнього введення засобів корекції. Для дослідження використовували сироватку крові, гомогенат печінки, мітохондрії гепатоцитів, фрагменти печінки для гістологічного дослідження. Корируючі чинники вводили інтраперитонеально, один раз на добу, щоденно відповідно до моделі ураження

та її корекції. Дози коригуючих речовин: L-орнітину L-аспартат (LOLA) – лікарський засіб “ГЕПА-МЕРЦ” амп. 0,5 % 10 мл, виробник Мерц Фарма ГмбХ і Ко., вводили в дозі 200 мг/кг маси тварини; N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME) (“Oldrich. Chem. Co.”, Англія) вводили по 10 мг/кг маси щура у вигляді 1 % водного розчину; D, L - α дифторметилорнітин (DFMO) (“Sigma”, США), в дозі 25 мг/кг маси щура. В гомогенатах печінки визначали інтенсивність процесів вільнорадикального окиснення (вміст ТБК-активних продуктів та гідропероксидів ліпідів (ГПЛ)) та стан антиоксидантної системи: активність супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), загальну антиоксидантну активність (знешкодження радикалів), вміст відновленого глутатіону (GSH). Окрім того досліджували вміст нітрит-аніонів в гомогенатах печінки, вміст загального білка, визначали показники стану мітохондріального дихання (активність сукцинатдегідрогенази (СДГ), цитохромоксидази (ЦХО)). У крові об’єктами дослідження були показники цитолізу та холестазу (активність аланінамінотрансферази (АСТ), аспартатамінотрансферази, (АЛТ) лужної фосфатази (ЛФ), гама-глутамілтранспептидази (ГГТ)), вміст загального білірубину, холестеролу, активність каталази (КАТ), концентрація церулоплазміну (ЦП), вміст нітрит-аніонів, рівень сечовини, вміст загального білка, стан процесів детоксикації та рівень ендогенної інтоксикації (вміст молекул середньої маси (МСМ) в крові, активність глутатіон-S-трансферази (GST) печінки). Проводили гістологічне дослідження печінки. Імуногістохімічно визначали експресію цитокінів TNF- α та TGF- β .

Результати проведених експериментальних досліджень показали, що повторне введення LOLA при гострому токсичному гепатиті сприяє відновленню морфофункціонального стану печінки та виявляє протективні властивості щодо гепатоцитів, запобігаючи розвитку синдромів цитолізу і холестазу, на що вказує зниження активності АСТ, АЛТ, ЛФ, концентрації холестеролу та білірубину в крові. Введення препарату за умов гепатиту підвищує синтез білка, сечовини та путресцину. Встановлено, що LOLA сприяє покращенню перебігу процесів детоксикації в печінці та зменшує явища

ендотоксикозу, на що вказують зростання активності GST та зниження концентрації MCM. Встановлено, що препарат достовірно знижує вміст таких продуктів ліпопероксидації, як ТБК-активні продукти та ГПЛ, підвищуючи при цьому активність антиоксидантних ферментів СОД та КАТ, а також вміст GSH та церулоплазміну. Введення препарату сприяло збалансуванню функціонування системи L-аргінін – нітрит-аніон. Вплив препарату на стан електрон-транспортної системи мітохондрій характеризувався наростанням активності ферментів СДГ та ЦХО.

З метою вивчення NO-залежних механізмів реалізації гепатопротективних ефектів препарат LOLA вводили у комбінації із неселективним блокатором NOS – N-нітро-L-аргінін метиловим ефіром (L-NAME). Гістологічно встановлено, що блокада синтезу NO шляхом інтраперитонеального введення L-NAME в дозі 10 мг/кг у щурів із токсичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA сповільнила процес відновлення гепатоцитів у ділянці портальних трактів, що вказує на залежність гепатопротективної дії препарату від впливу на синтез нітроген оксиду. Встановлено, що пригнічення цитолізу, холестазу та ендотоксикозу, активація мітохондріального дихання за введення LOLA відбувається через NO-залежний механізм. Щодо впливу на процеси ліпопероксидації та стан антиоксидантної системи, то ці ефекти LOLA реалізує не тільки через здатність препарату, а саме його компоненту орнітину, бути попередником синтезу NO, а й через інші механізми. Блокування NOS не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, достовірно не змінювало активність Mn та Cu, Zn ізоформ СОД та рівень ТБК-активних продуктів у печінці. Встановлено взаємозв'язок між блокуванням синтезу NO та концентрацією ГПЛ, GSH та активністю каталази.

Результати наших досліджень свідчать, що важливе значення в реалізації протекторної дії LOLA має вплив препарату на синтез поліамінів. Встановлено, що застосування блокатора синтезу поліамінів DFMO у щурів із токсичним гепатитом на фоні корекції LOLA реверсує більшість ефектів останнього у

запобіганні розвитку патологічних синдромів, що супроводжують гостре ураження печінки. Морфологічна будова печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичними змінами, лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією, білковою та жировою дистрофією гепатоцитів. Введення DFMO інгібувало здатність LOLA запобігати зростанню маси печінки при гепатиті та підтримувати нормальний рівень білка у крові й печінці, що підтверджує роль поліамінів у регуляції білкового синтезу. Встановлено поліамін-залежний механізм дії препарату у попередженні цитолізу і холестазу. Про наростання явищ ендотоксикозу та пригнічення процесів детоксикації в печінці за умов блокування синтезу поліамінів свідчили рівні MCM_1 та MCM_2 та активність GST. Застосування DFMO призвело до блокування впливу LOLA на вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з гепатитом, що вказує про критичну роль орнітиндекарбоксилази (ОДЛ) у функціонуванні орнітинового циклу перетворення L-аргініну в механізмах реалізації протекторних ефектів LOLA. Нами встановлено, що препарат LOLA втрачав свою здатність пригнічувати процеси ліпопероксидації та відновлювати стан показників ферментативної (СОД, КАТ) та неферментативної ланок (GSH, ЦП) антиоксидантної системи за цих умов.

З'ясовано, що при цирозі печінки повторне введення LOLA впродовж 10 діб сприяє покращенню морфофункціонального стану печінки та виявляє протективні властивості щодо гепатоцитів запобігаючи наростанню синдромів цитолізу та холестазу, знижує експресію цитокінів TNF- α та TGF- β , стимулює синтез білка, сечовини та поліамінів, зменшує явища ендотоксикозу, покращує метаболічні процеси у печінці покращує функціонування системи мітохондріального дихання, пригнічує прооксидантні процеси, посилюючи при цьому антиоксидантні.

Блокування синтезу оксиду азоту за допомогою L-NAME не сприяло реверсу значної частини протективних ефектів LOLA при експериментальному цирозі печінки. Встановлено, що ефекти LOLA щодо активності АЛТ, ЛФ, ГГТ,

СДГ, ЦХО, вмісту загального білірубину, сечовини, загального білка у крові та печінці, ТБК-активних продуктів, GSH були реалізовані незалежно від активності NO-синтази. За даної експериментальної моделі встановлено взаємозв'язок в механізмі дії LOLA між впливом на синтез нітроген оксиду та експресією цитокінів TNF- α , TGF- β , концентрацією MCM, активністю GST, KAT та СОД.

Результати наших досліджень свідчать, що застосування блокатора синтезу поліамінів DFMO у щурів із цирозом печінки на фоні корекції LOLA реверсує протективну дію препарату щодо досліджуваних показників цитолізу та холестазу, стану системи прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального дихання, ендотоксикозу. Зміна морфологічної будови печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичними змінами гепатоцитів, лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією колагенової стромы, мукоїдним та фібриноїдним набряком полів фіброзу.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертації вперше встановлено, що протекторна дія LOLA при гепатиті та цирозі забезпечується складним і багатокомпонентним механізмом, який пов'язаний зі здатністю препарату впливати на синтез нітрит аніону та поліамінів.

Нами показано, що препарат амінокислотного походження LOLA, в склад якого входять L-орнітин та L-аспартат, за умов гепатиту та при цирозі печінки сприяє відновленню морфофункціонального стану печінки та виявляє протективні властивості щодо гепатоцитів запобігаючи розвитку синдромів цитолізу та холестазу, стимулює синтез білка, сечовини та поліамінів, зменшує явища ендотоксикозу, покращує детоксикуючі та метаболічні процеси у печінці, відновлює функціонування системи прооксиданти-антиоксиданти, L-аргінін-NO та мітохондріального дихання.

Вперше показано, що LOLA реалізує механізми пригнічення цитолізу, холестазу та ендотоксикозу, активації мітохондріального дихання при токсичному гепатиті через NO-залежний механізм. Щодо впливу на процеси

ліпопероксидації та стан антиоксидантної системи, встановлено що ці ефекти LOLA реалізовані не лише системою L-аргінін-NO. Виявлено залежність між рівнем продукції NO та синтезом ГПЛ, вмістом GSH та активністю каталази. Блокування синтезу NO не впливає на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, активність ізоформ СОД, рівень ТБК-активних продуктів.

Вперше встановлено, що здатність LOLA бути модулятором синтезу нітроген оксиду не є визначальною в його гепатопротекторній дії при цирозі, адже блокування NOS за допомогою L-NAME не забезпечувало реверсію ефектів LOLA щодо активності ферментів електрон-транспортної системи мітохондрій, показників цитолізу та холестази, показників ліпопероксидації, а саме продуктів тіобарбітурової кислоти та GSH. На моделі цирозу печінки ми вперше встановили взаємозв'язок в механізмі дії LOLA між здатністю впливати на синтез нітроген оксиду та експресією цитокінів TNF- α і росту TGF- β , концентрацією MCM, активністю GST, каталази та СОД.

Вперше показано, що здатність LOLA впливати на синтез поліамінів відіграє критичну роль у протекторному впливі препарату при гепатиті та цирозі. Введення блокатора синтезу поліамінів DFMO зменшує виразність більшості досліджуваних ефектів LOLA як при гепатиті, так і цирозі, а морфологічна будова печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичними змінами, лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані експериментальні результати дозволять розширити розуміння механізму протекторної дії LOLA при гепатиті та цирозі. Встановлення критичної ролі синтезу NO та поліамінів у механізмі дії препарату може бути підґрунтям щодо раціоналізації фармакотерапії захворювань печінки. Отримані результати можуть слугувати обґрунтуванням недоцільності застосування препаратів на основі орнітину та аргініну як гепатопротекторів при цирозі та гепатиті за

умови пригнічення синтезу поліамінів, наприклад, при застосуванні цитостатичних лікарських засобів.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес на кафедрі фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедрах фармакології Вінницького національного медичного університету, Буковинського державного медичного університету, Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Дніпровського державного медичного університету.

Ключові слова: L-орнітину L-аспартат, гепатопротекторна дія, печінка, гепатит, цироз, щурі, нітрогену оксид, поліаміни, ендотоксикоз, цитокіни, прооксиданти-антиоксиданти, мітохондріальне дихання.

ANNOTATION

Datsko V. A. Experimental study of the protective effect of L-ornithine L-aspartate in liver damage of various origins. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 222 «Medicine» (22 «Healthcare»). – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

The dissertation provides scientific justification and presents the results of addressing the urgent task of clarifying the effectiveness of L-ornithine L-aspartate (LOLA) in acute hepatitis and liver cirrhosis, as well as establishing the nitrogen oxide and polyamine-dependent mechanisms of the drug's action.

Experimental studies were conducted on 84 white male nonlinear rats. Acute toxic hepatitis was modeled by a single intraperitoneal injection of tetrachloromethane in the form of a 50 % oil solution in olive oil at a dose of 2 g/kg

body weight. The control group of animals received an identical volume of olive oil. Corrective substances were administered intraperitoneally once per day for 2 or 6 days, respectively. The study was conducted on 3 and 7 days of experiment. Liver cirrhosis was modeled by oral administration of a 50 % solution of tetrachloromethane twice a week for 12 weeks at a dose of 2 ml/kg body weight. Corrective agents were administered for 10 days after the end of the experiment. The animals were decapitated under ketamine anesthesia 24 hours after the last administration of the correction agents. Blood serum, liver homogenate, hepatocyte mitochondria, and liver fragments were used for histological examination. Corrective agents were administered intraperitoneally once daily according to the model of injury and its correction. The doses of corrective substances were as follows: L-ornithine L-aspartate (LOLA) – drug "HEPA-MERTZ" amp. 0.5% 10 ml, manufacturer Mertz Pharma GmbH & Co., administered at a dose of 200 mg/kg body weight; N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ("Oldrich. Chem. Co.," England) was administered at a dose of 10 mg/kg body weight in the form of a 1 % aqueous solution; D, L-alpha-difluoromethylornithine (DFMO) ("Sigma," USA) was administered at a dose of 25 mg/kg body weight. Free radical oxidation processes (content of TBA-active products and hydroperoxides of lipids (HPL)), and the state of the antioxidant system: superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, total antioxidant activity (radical scavenging), reduced glutathione (GSH) content, nitrite anions in liver homogenates, total protein content, and indicators of mitochondrial respiration (succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome oxidase (CHO) activity) were determined in the liver.

The indicators of cytolytic and cholestatic activity were determined in the blood (alanine aminotransferase (AST), aspartate aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GGT)), the level of total bilirubin, cholesterol, catalase activity (CAT), concentration of ceruloplasmin (CP), nitrite-anion content, urea level, total protein content, state of detoxification processes, and the level of endogenous intoxication (content of molecules of average mass (MAM) in the blood, activity of liver glutathione-S-transferase (GST)). Liver histological

examination was performed. Immunohistochemistry was used to determine the expression of cytokines TNF- α and TGF- β .

The results of experimental studies have shown that the repeated administration of LOLA during acute toxic hepatitis contributes to the restoration of the morphofunctional state of the liver and exhibits protective properties towards hepatocytes by preventing the development of cytolysis and cholestasis syndromes, as indicated by a decrease in the activity of AST, ALT, ALP, cholesterol, and bilirubin concentrations in the blood. The administration of the drug in conditions of hepatitis increases the synthesis of protein, urea, and putrescine. It has been established that LOLA promotes the improvement of the detoxification processes' activity in the liver and reduces the phenomenon of endotoxemia, as evidenced by an increase in GST activity and a decrease in MAM concentration. The drug significantly reduces the content of such products of lipid peroxidation as TBA-active products and HPL, while increasing the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT, GSH content, and ceruloplasmin. The effect of the drug on the state of the electron transport system of mitochondria was judged by the increase in the activity of SDH and TCA. The administration of the drug contributed to balancing the functioning of the L-arginine-nitrite anion system.

To study the NO-dependent mechanisms of implementing the hepatoprotective effects of the LOLA drug, it was administered in combination with a non-selective NOS blocker – N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Histologically, it was found that the blockade of NO synthesis by intraperitoneal injection of L-NAME at a dose of 10 mg/kg in rats with toxic liver damage against the background of LOLA correction slowed down the process of hepatocyte restoration in the area of portal tracts, indicating the dependence the hepatoprotective effect of the drug on its influence on nitric oxide synthesis. It has been established that the inhibition of cytolysis, cholestasis, and endotoxemia, as well as the activation of mitochondrial respiration, occur through an NO-dependent mechanism after LOLA administration.

Regarding the effect on lipid peroxidation processes and the state of the antioxidant system, these effects of LOLA are realized not only through the ability of

the drug, namely its component ornithine, to be a precursor of NO synthesis. Blocking NOS did not affect the ability of LOLA to maintain a high level of antioxidant protection during hepatitis, did not significantly alter the activity of Mn and Cu, Zn isoforms of SOD, and the level of TBA-active products in the liver. A correlation was established between the inhibition of NO synthesis and the concentration of HPL, GSH, and the activity of catalase.

The results of our research indicate that the synthesis of polyamines plays an important role in the implementation of the protective action of LOLA. It has been established that the use of the polyamine synthesis blocker DFMO in rats with toxic hepatitis in combination with LOLA, reverses most of the effects of LOLA in preventing the development of pathological syndromes accompanying acute liver damage. The change in the morphological structure of the liver following the administration of LOLA in combination with DFMO is characterized by deep dystrophic-necrotic changes, lymphohistiocytic and leukocytic infiltration, and protein and fat dystrophy of hepatocytes. The administration of DFMO inhibited the ability of LOLA to prevent liver mass growth during hepatitis and maintain normal levels of protein in the blood and liver, confirming the role of polyamines in regulating protein synthesis. A polyamine-dependent mechanism of action of the drug in preventing cytolysis and cholestasis has been established. The level of MAM1 and MAM2 and the activity of GST were used to judge the increase in endotoxemia and suppression of detoxification processes in the liver with the blockade of polyamine synthesis. The use of DFMO led to the blocking of the influence of LOLA on the nitrite-anion content in the serum and liver of rats with hepatitis, indicating the critical role of ornithine decarboxylase (ODC) in the functioning of the ornithine cycle of L-arginine transformation, and therefore in the mechanism of implementing the protective effects of LOLA. We have established that the LOLA drug, under conditions of polyamine synthesis blockade, loses its ability to inhibit lipid peroxidation processes and restore the state of enzymatic (SOD, CAT) and non-enzymatic (GSH, CP) antioxidant systems.

It has been established that repeated administration of LOLA for 10 days improves the morphofunctional state of the liver and exhibits protective properties for hepatocytes, preventing the development of cytolytic and cholestatic syndromes. It reduces the expression of cytokines TNF- α and TGF- β , stimulates protein, urea, and polyamine synthesis, decreases endotoxemia, improves metabolic processes in the liver, enhances mitochondrial respiration, inhibits oxidative processes, while simultaneously strengthening antioxidant processes.

Blocking the synthesis of nitric oxide using L-NAME did not reverse a significant part of the protective effects of LOLA in experimental liver cirrhosis. It was found that the effects of LOLA on the activity of ALT, LF, GGT, SDH, CCO, levels of total bilirubin, urea, total protein in the blood and liver, TBARS, and GSH were realized independently of the activity of NO synthase. In this experimental model, we established a relationship in the mechanism of action of LOLA between the effect on nitric oxide synthesis and the expression of cytokines TNF- α , TGF- β , concentration of MSM, activity of GST, CAT, and SOD.

The results of our studies indicate that the use of the polyamine synthesis blocker DFMO in rats with liver cirrhosis on the background of LOLA correction reverses the drug's protective effect on the studied indicators of cytolysis and cholestasis, the state of the pro-oxidant-antioxidant system and mitochondrial respiration, and endotoxemia. Changes in the morphological structure of the liver upon administration of LOLA in combination with DFMO are characterized by profound dystrophic-necrotic changes in hepatocytes, lymphohistiocytic and leukocytic infiltration of collagenous stroma, and mucoid and fibrinoid swelling of fibrosis fields.

Scientific novelty. It was first established that the protective action of LOLA in hepatitis and cirrhosis has a complex and multifaceted mechanism that is associated with the drug's ability to influence the synthesis of nitrite anions and polyamines. It is shown that the LOLA drug, which is of amino acid origin and contains L-ornithine and L-aspartate, promotes the restoration of the morphofunctional state of the liver and exhibits protective properties against

hepatocyte damage, preventing the development of cytolytic and cholestatic syndromes. It stimulates the synthesis of protein, urea, and polyamines, reduces endotoxemia, improves detoxifying and metabolic processes in the liver, and restores the functioning of the pro-oxidant-antioxidant system, L-arginine-NO, and mitochondrial respiration.

It is also shown for the first time that LOLA implements mechanisms of cytolytic and cholestatic suppression, and endotoxemia inhibition, as well as the activation of mitochondrial respiration in toxic hepatitis via an NO-dependent mechanism. Regarding the impact on lipid peroxidation processes and the state of the antioxidant system, it is established that LOLA achieves these effects not only through the L-arginine-NO system. A correlation between NO production levels and the synthesis of HPL, GSH content, and catalase activity has been found. Blocking the synthesis of NO did not affect the ability of LOLA to maintain a high potential of antioxidant protection in hepatitis, the activity of SOD isozymes, or the level of TBA-active products.

It was first established in this study that the ability of LOLA to modulate the synthesis of nitrogen oxide is not the determining factor in the hepatoprotective action of the drug in cirrhosis. This is because blocking NOS with L-NAME did not reverse the effects of LOLA on the activity of mitochondrial electron transport system enzymes, cytolysis and cholestasis indicators, lipid peroxidation indicators, namely thiobarbituric acid and GSH products. In the liver cirrhosis model, we first established a relationship in the mechanism of action of LOLA between the ability to influence nitrogen oxide synthesis and the expression of cytokines TNF- α and TGF- β , MAM concentration, GST, catalase, and SOD activity.

We have shown for the first time that the ability of LOLA to influence polyamine synthesis plays a critical role in the protective effect of the drug in hepatitis and cirrhosis. Blocking polyamine synthesis with DFMO reverses most of the investigated effects of LOLA in both hepatitis and cirrhosis, and the morphological structure of the liver after administration of LOLA in combination

with DFMO is characterized by deep dystrophic-necrotic changes, lymphohistiocytic and leukocytic infiltration.

Practical value of the obtained results. The experimental results obtained will allow for an expansion of the understanding of the mechanism of the hepatoprotective action of LOLA in cases of hepatitis and cirrhosis. The establishment of the critical role of NO synthesis and polyamines in the mechanism of action of the drug may serve as a basis for rationalizing pharmacotherapy for liver diseases. Our results can be used to justify the inefficiency of using drugs based on ornithine and arginine as hepatoprotectors in cases of cirrhosis and hepatitis, under conditions of polyamine synthesis suppression, such as when using cytostatic drugs.

The materials of the dissertation have been implemented in the educational process at the Department of Pharmacology with Clinical Pharmacology of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, the Departments of Pharmacology of the Vinnytsia National Medical University, Bukovinian State Medical University, O. Bogomolets National Medical University, Dnipro State Medical University.

Keywords: L-ornithine L-aspartate, hepatoprotective action, liver, hepatitis, cirrhosis, rats, nitric oxide, polyamines, endotoxemia, cytokines, pro-oxidants-antioxidants, mitochondrial respiration.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Experimental cirrhosis liver morphology and function / V. A. Datsko, L. Ya. Fedoniuk, Y. I. Ivankiv, K. I. Kurylo, A. S. Volska, S. L. Malanchuk, O. M. Oleshchuk. *Wiadomości Lekarskie*. 2020. Vol. LXXIII, № 5. P. 947–952. (SCOPUS) DOI: 10.36740/WLek202005120

2. Hepatoprotective effectsof L-orinitine-L-aspartate in toxic liver injury / O. M. Oleshchuk, V. A. Datsko, H. Ya. Loi, T. V. Datsko, A. Ye. Mudra,

S. L. Malanchuk, Ya. I. Ivankiv, L. Ya. Fedoniuk, N. S. Badiuk. *Pharmacology OnLine*. 2021. Vol. 3. P. 146–155. (SCOPUS) URL: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2021/vol3/PhOL_2021_3_A018_Oleshchuk.pdf3.

3. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Т. В. Дацко, Т. К. Головата. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2021. № 2. С. 54–61. DOI: 10.11603/1811-2471.2021.v.i2.12203

4. Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, А. З. Ничик, Я. І. Іванків, В. П. Пида, А. В. Чорномидз. *Медична та клінічна хімія*. 2022. Т. 24, № 1. С. 32–38. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2022.i1.12683

5. Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, К. А. Посохова, І. П. Мосейчук, А. З. Ничик. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16, № 1. С. 36–44. DOI: <https://doi.org/10.33250/16.01.0366>.

6. Nitric oxide-mediated effects of L-ornithine-L-aspartate in acute toxic liver injury / V. Datsko, H. Loi, T. Datsko, A. Mudra, A. Mykolenko, T. Golovata, M. Furdela, Y. Orel, I. Smachylo, A. Burak, M. Klantsa, O. Oleshchuk. *Pharmacia*. 2022. Т. 69, № 2. С. 527–534. DOI: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e83067> (SCOPUS)

7. Дацко В. А., Олещук О. М. Вплив L-орнітину L-аспартату на вміст TNF- α та TGF- β у печінці при експериментальному цирозі на фоні блокади синтезу оксиду азоту та поліамінів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2022. № 3. С. 42–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2022.v.i3.13286>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

8. Ефективність застосування L-орнітину L-аспартату при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, Т. В. Дацко, М. А. Орел. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 черв. 2020 р. Тернопіль : ТНМУ «Укрмедкнига», 2020. С. 68–69.

9. L-орнітину -L-аспарат при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, А. Є. Мудра, Т. В. Дацко, Я. І. Іванків. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль : ТНМУ «Укрмедкнига», 2020. С. 295–296.

10. Дацко В. А., Олещук О. М., Дацко Т. В. Стан печінки за введення L-орнітину L-аспартату при токсичному гепатиті. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф., присв. Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології ТДМІ 110-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О., Галицькі читання II, 29–30 жовтня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 37–38.

11. Datsko V., Darmorys I., Havinska A. L-ornitine L-aspartate and L-NAME effectiveness in experimental cirrhosis. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 159.

12. Олещук О. М., Дацко В. А., Лой Г. Я. Вплив L-орнітин L-аспартату на маркери холестазу при гострому гепатиті. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIV наук.-практ. конф., 11 черв. 2021 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2021. С. 168–169.

13. Дацко В. Вплив L-аргініну L-аспартату на структуру та функцію печінки при експериментальному цирозі у тварин. *Сучасні аспекти медицини та фармації–2021* : матеріали 81 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, 15-16 квітня 2021р. Запоріжжя, 2021. С. 32.

14. Дацко В. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки у експериментальних тварин. *Матеріали XXV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 12–14 квіт. 2021 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2021. С. 191.

15. Дацко В. А., Олещук О. М. Вплив L-аргініну L-аспартату на структуру та функцію печінки пр. и експериментальному цирозі у тварин. *УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)* : матеріали Всеукр. міждисципл. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 8 жовт. 2021р., м. Полтава. Полтава, 2021. С. 47–49.

16. Імуногістохімічне дослідження експресії TNF- α та TGF- β при експериментальному цирозі печінки за умов корекції L-орнітину L-аспартатом у комбінації із інгібіторами синтезу NO та поліамінів / В. А. Дацко, О. М. Олещук, А. З. Миколенко, С. Б. Крамар. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXV наук.-практ. конф., 9 черв. 2022р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 89–91.

17. Дацко В. А., Лой Г. Я. Імуногістохімічне дослідження печінки при токсичному ураженні CCl₄ та при корекції L-орнітину L-аспартатом у комбінації з блокатором синтезу оксиду азоту. *Матеріали XXVI Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квіт. 2022 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 131.

18. Значення синтезу поліамінів в механізмі дії L-орнітину L-аспартату при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, Г. Я. Лой, Т. В. Дацко, Я. І. Іванків, М. І. Луканюк. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 127.

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	22
Вступ	24
Розділ 1 L-орнітину-L-аспартат як гепатопротектор при гострих та хронічних захворюваннях печінки (огляд літератури)	31
1.1 Епідеміологія та основні ланки патогенезу гострих та циротичних уражень печінки	31
1.1.1 Епідеміологія та етіологія хвороб печінки	31
1.1.2 Основні ланки патогенезу гострих уражень печінки	34
1.1.3 Основні ланки патогенезу цирозу печінки	37
1.2 Фармакологічна властивості L-орнітину-L-аспартату та ефективність його застосування як гепатопротектора	42
1.2.1 Лікарські засоби, що використовуються при захворюваннях печінки: класифікація, механізми дії, переваги та недоліки	42
1.2.2 L-орнітин-L-аспартат: фармакологічна характеристика та механізм дії	44
1.2.3 L-орнітин та система знешкодження аміаку	49
1.2.4 L-орнітин та система нітроген II оксиду	54
1.2.5 L-орнітин і синтез поліамінів	56
Розділ 2 Матеріал та методи дослідження	61
2.1 Відбір тварин для дослідження	61
2.2 Визначення показників цитолізу та холестазу	64
2.2.1 Визначення активності аланінамінотрансфери	64
2.2.2 Визначення активності аспаратамінотрансфери	64
2.2.3 Визначення активності лужної фосфатази	65
2.2.4 Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази	65
2.2.5 Визначення вмісту загального білірубіну	65
2.2.6 Визначення вмісту холестеролу	66

2.3 Дослідження процесів вільнорадикального окиснення та стану антиоксидантної системи	66
2.3.1 Метод визначення концентрації ТБК-активних продуктів у печінці	66
2.3.2 Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів	67
2.3.3 Визначення активності супероксиддисмутази	68
2.3.4 Визначення активності каталази	68
2.3.5 Визначення концентрації церулоплазміну плазмі крові	69
2.3.6 Визначення вмісту відновленого глутатіону	70
2.3.7 Загальна антиоксидантна активність	71
2.4 Визначення показників метаболізму	71
2.4.1 Визначення вмісту нітрит-аніонів	72
2.4.2 Визначення вмісту сечовини у сироватці крові	72
2.5 Визначення показників білкового обміну	73
2.5.1 Визначення вмісту загального білка у сироватці крові та печінці	73
2.5.2 Визначення вмісту путресцину в печінці	73
2.6 Визначення показників окислювальних процесів у мітохондріях	73
2.6.1 Виділення мітохондрій печінки	73
2.6.2 Визначення активності сукцинатдегідрогенази	74
2.6.3 Визначення активності цитохромоксидази	74
2.7 Дослідження стану ендогенної інтоксикації	75
2.7.1 Визначення вмісту молекул середньої маси	75
2.7.2 Визначення активності глутатіон-S-трансферази	76
2.8 Морфологічні дослідження	76
2.8.1 Гістологічне дослідження печінки	76
2.8.2 Імуногістохімічне дослідження TNF- α , TGF- β	77
2.9 Статистичний аналіз результатів дослідження	77

Розділ 3 Вивчення ролі системи NO та синтезу поліамінів у механізмі дії L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті	79
3.1 Вивчення ефективності L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті	79
3.1.1 Зміни морфофункціонального стану печінки при гострому токсичному гепатиті	79
3.1.2 Стан системи ліпопероксидації та метаболічних процесів у печінці при гострому токсичному гепатиті	83
3.2 Вивчення NO–залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату за умов гепатиту	96
3.2.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови блокади NOS та введення L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті	96
3.2.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за умови блокади NO–залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті	106
3.3 Вивчення поліамін-залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату за умов гепатиту	118
3.3.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови застосування L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при гострому токсичному гепатиті	118
3.3.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за застосування L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при гострому токсичному гепатиті	128
Розділ 4 Вивчення ролі системи NO та синтезу поліамінів у механізмі дії L-аргініну L-аспартату при цирозі печінки	139

4.1 Вивчення ефективності L-аргініну L-аспартату при цирозі	139
4.1.1 Зміни морфофункціонального стану печінки при цирозі та за умови корекції L-аргініном L-аспартатом	139
4.1.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за введення L-аргініну L-аспартату при цирозі печінки	144
4.2 Вивчення NO–залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при експериментальному цирозі печінки	151
4.2.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови блокади NO–залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при цирозі	151
4.2.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за умови блокади NO–залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при цирозі	157
4.3 Вивчення поліамін-залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату за умов цирозу	163
4.3.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови застосування L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при цирозі	163
4.3.2 Стан прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за введення L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при цирозі печінки	169
Розділ 5 Аналіз та узагальнення результатів дослідження.	177
Висновки	199
Список використаних джерел	203
Додатки	238

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АлАТ – аланінамінотрансфераза
АсАТ – аспартатамінотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфат
GST – глутатіон-S-трансфераза
ГГТ – гама-глутамілтрансфераза
ГГТ – гамма-глутамілтранспептидаза
ГЕБ – гематоенцефалічний бар'єр
ГПЛ – гідропероксили ліпідів
ГПН – гостра печінкова недостатність
ЗАА – загальна антиоксидантна активність
ЗБ – загальний білірубін
ЗКП – запальні цитокіни
ЗКП – зірчасті клітини печінки
ЗХ – загальний холестерол
ЗХП – хронічні захворювання печінки
КАТ – каталаза
КК – клітини Купфера
ЛФ – лужна фосфатаза
МСМ – молекули середньої маси
НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки
ОС – оксидативний стрес
РААС – ренін-ангіотензин-альдостеронова система
СДГ – сукцинатдегідрогеназа
СЕКП – синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки
СЕКП – синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки
СОД – супероксиддисмутаза
ТБП – ТБК-активні продукти
ХЗП – хронічні захворювання печінки

ЦНС – центральна нервова система

ЦП – церулоплазмін

ЦХО – цитохромоксидаза

GSH – відновлений глутатіон

NO – нітроген оксиду

NO₂⁻ – нітрит-аніон

ВСТУП

Актуальність теми. Гострі та хронічні захворювання печінки є основними причинами захворюваності та смертності в усьому світі. Сучасні протоколи лікування патології печінки включають два основних напрямки фармакотерапії: етіотропну та патогенетичну терапії. Серед лікарських засобів патогенетичної дії, які можуть покращувати метаболічну та синтезуючу функції печінки, сприяти регенерації гепатоцитів та активізувати процеси детоксикації, привертають увагу препарати на основі амінокислот.

L-орнітину L-аспартат – це суміш ендогенних амінокислот із доведеною здатністю посилювати виведення аміаку. Останні наукові публікації щодо фармакодинамічних та фармакокінетичних властивостей препарату дозволяють припустити, що окрім відомого механізму його дії при печінковій недостатності, а саме участь у детоксикації аміаку, L-орнітину L-аспартат спричиняє ще ряд важливих метаболічних ефектів, що забезпечує його протекторний вплив на головний мозок та внутрішні паренхіматозні органи, в тому числі і печінку [1, 2]. На сьогодні відомо, що введення L-орнітину L-аспартату призводить до достовірного збільшення глутатіону, що є наслідком двохетапної реакції трансамінування L-орнітину до глутамату, обов'язкового субстрату глутамінсинтетази [3]. Важливим продуктом глутамату, як похідного L-орнітину L-аспартату, є глутатіон, потужний антиоксидант, що володіє здатністю контролю окисного пошкодження клітин. Таким чином реалізується антиоксидантний ефект препарату. Ще один можливий механізм дії препарату пов'язаний із підвищенням рівня L-аргініну – субстрату для синтезу нітроген оксиду (NO), що є основним маркером функціональної спроможності стану системи кровообігу.

Після декарбоксілування L-орнітин приймає участь у синтезі поліамінів, а саме сперміну, спермідину, путресцину та кадаверину. Останні відіграють важливу регуляторну роль у процесах білків і нуклеїнових кислотвкрай необхідними для проліферації ендотеліальних клітин і ангіогенезу. Відомо, що

ці процеси зазнають істотних змін при дії на організм екстремальних чинників середовища і при різних патологіях. Вирішальну роль у біосинтезі білка відіграє печінка, і дані літератури свідчать про порушення синтезу поліамінів за умов її ураження [4, 5]. Вивчення впливу L-орнітину L-аспартату на синтез поліамінів при ураженні печінки є надзвичайно актуальним, оскільки L-орнітин виступає у якості субстрату і регулятора цього процесу.

Аналізуючи наукову літературу, ми виявили лише поодинокі дані щодо впливу L-орнітину L-аспартату на морфофункціональний стан гепатоцитів, процеси ліпопероксидації та стану антиоксидантного захисту, мітохондріального дихання, систему L-аргінін-NO. Залишається невивченим його вплив на синтез поліамінів та ролі цього механізму в протекторній дії препарату за умов патології.

Проведення такого дослідження сприятиме поглибленню розуміння біохімічних та патофізіологічних процесів, які відбуваються при гострих та хронічних захворюваннях печінки, механізмів дії сучасних лікарських засобів на основі амінокислот L-орнітину та L-аргініну, дозволить обґрунтувати фармакодинамічні ефекти та ефективність застосування таких препаратів як гепатопротекторні засоби.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексних науково-дослідних робіт кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України на тему «Фармакологічне дослідження кардіо- та гастропротективного впливу біотехнологічних, рослинних та синтетичних лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0119 U000617) та «Фармакологічні властивості лікарських засобів природного і синтетичного походження та молекулярні механізми їх реалізації при ураженні внутрішніх органів інфекційного та неінфекційного генезу» (номер державної реєстрації 0122U0001620). Автор є співвиконавцем вказаних НДР.

Мета дослідження: встановити ефективність застосування L-орнітину L-аспартату та з'ясувати NO- та поліамінзалежні механізми його дії при гострому токсичному ураженні печінки та експериментальному цирозі печінки.

Завдання дослідження:

1. З'ясувати структурні та функціональні зміни гепатоцитів, перебіг метаболічних процесів у печінці за умов змодельованого гострого тетрахлорметанового гепатиту та експериментального цирозу печінки.

2. Дослідити вплив L-орнітину L-аспартату на морфофункціональний стан печінки, процеси ліпопероксидації та мітохондріального дихання, ендотоксикозу при експериментальному гепатиті.

3. З'ясувати значення синтезу нітроген оксиду в механізмі дії L-орнітину L-аспартату при гострому гепатиті.

4. Вивчити роль синтезу поліамінів механізмі протекторної дії L-орнітину L-аспартату при гострому гепатиті.

5. Дослідити вплив L-орнітину L-аспартату на морфофункціональний стан печінки, процеси ліпопероксидації та мітохондріального дихання, ендотоксикозу при експериментальному цирозі печінки.

6. З'ясувати роль системи L-аргінін- NO в механізмі дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки.

7. Вивчити роль синтезу поліамінів в механізмі протекторної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі.

Об'єкт дослідження: механізми дії L-орнітину L-аспартату при гострому токсичному ураженні та експериментальному цирозі печінки.

Предмет дослідження: динаміка біохімічних, гістологічних та імуногістохімічних показників стану печінки при введенні L-орнітину L-аспартату та на фоні блокування синтезу оксиду нітрогену та поліамінів при гострому токсичному гепатиті та цирозі печінки.

Методи дослідження: експериментальні (моделювання патологічного процесу); біохімічні (для встановлення функціональних змін гепатоцитів, порушень систем прооксиданти-антиоксиданти, L-аргінін-NO,

мітохондріального дихання, ендотоксикозу); морфологічні (для аналізу структурних змін у печінці експериментальних тварин); статистичні (для опрацювання отриманих результатів та встановлення достовірності змін).

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертації вперше встановлено, що протекторна дія LOLA при гепатиті та цирозі має складний та багатокомпонентний механізм, який пов'язаний зі здатністю препарату впливати на синтез нітрит аніону та поліамінів.

Нами показано, що препарат амінокислотного походження LOLA, в склад якого входять L-орнітин та L-аспартат, в умовах гепатиту та цирозі сприяє відновленню морфофункціонального стану печінки та виявляє протективні властивості щодо гепатоцитів запобігаючи розвитку синдромів цитолізу та холестазу, підвищує синтез білка, сечовини та поліамінів, зменшує явища ендотоксикозу, покращує детоксуючі та метаболічні процеси у печінці, відновлює функціонування системи прооксиданти-антиоксиданти, L-аргінін-NO та мітохондріального дихання.

Вперше показано, що через NO-залежний механізм LOLA реалізує механізми пригнічення цитолізу, холестазу та ендотоксикозу, активації мітохондріального дихання при токсичному гепатиті. Щодо впливу на процеси ліпопероксидації та стан антиоксидантної системи, то ці ефекти LOLA реалізує не тільки через систему L-аргінін-NO. Встановлено залежність між рівнем продукції NO та синтезом ГПЛ, відновленого глутатіону, активності каталази. Блокування синтезу NO не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, активність ізоформ СОД, рівень ТБК-активних продуктів.

Вперше встановлено, що здатність LOLA бути модулятором синтезу нітроген оксиду не є визначальною в гепатопротекторній дії препарату при цирозі, адже блокування NOS за допомогою L-NAME не реверсувало ефекти LOLA щодо активності ферментів електронтранспортної системи мітохондрій, показників цитолізу та холестазу, а також деяких показників ліпопероксидації, а саме продуктів тіобарбітурової кислоти та відновленого GSH. На моделі

цирозу печінки ми вперше встановили взаємозв'язок в механізмі дії LOLA між здатністю впливати на синтез нітроген оксиду та експресією цитокінів TNF- α та росту TGF- β , концентрацією молекул середньої маси, активністю глутатіон-S-трансферази, каталази та супероксиддисмутази.

Вперше показано, що здатність LOLA впливати на синтез поліамінів відіграє критичну роль в протекторному впливі препарату при гепатиті та цирозі. Введення блокатора синтезу поліамінів DFMO реверсує більшість досліджуваних ефектів LOLA як при гепатиті так і цирозі, а морфологічна будова печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичні змінами, лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією, білковою та жировою дистрофією гепатоцитів.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані експериментальні результати дозволять розширити розуміння механізму протекторної дії LOLA при гепатиті та цирозі. Встановлення критичної ролі синтезу NO та поліамінів в механізмі дії препарату може бути підґрунтям щодо раціоналізації фармакотерапії захворювань печінки. Отримані нами результати можуть слугувати обґрунтуванням недоцільності застосування препаратів на основі орнітину та аргініну як гепатопротекторів при цирозі та гепатиті за умови пригнічення синтезу поліамінів, наприклад при застосуванні цитостатичних лікарських засобів.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес на кафедрі фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедрах фармакології Вінницького національного медичного університету, Буковинського державного медичного університету, Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Дніпровського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Тему дослідження та його дизайн розроблено здобувачем разом з науковим керівником. Автором проведено аналіз вітчизняної і зарубіжної наукової літератури, патентно-інформаційний

пошук за темою, яка стосується патогенезу хвороб печінки, результатів експериментальних та клінічних досліджень щодо механізму дії, фармакологічних властивостей та ефективності застосування L-орнітину L-аспартату.

Основні ідеї, їх оформлення і реалізація експерименту належать здобувачу. Дисертант приймав безпосередню участь у проведенні експериментальних досліджень на лабораторних тваринах, моделюючи у них гострий токсичний гепатит та цироз печінки. Біохімічні дослідження крові та печінки проведено в Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України та науково-дослідній лабораторії порівняльної біохімії та молекулярної біології Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Морфологічні та імуногістохімічні дослідження виконано за технічною допомогою працівників кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судової медицини та імуногістохімічної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.

Здобувач провів розробку основних теоретичних і практичних положень роботи; самостійно виконав статистичну обробку отриманих результатів, провів аналіз та сформулював узагальнення результатів дослідження, написав усі розділи дисертації, сформував висновки. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, використано основні ідеї, результати експериментальних досліджень, огляд літератури і статистичні дані автора.

Апробація результатів роботи. Основні положення та результати досліджень, які були отримані під час виконання дисертаційної роботи, оприлюднені на підсумкових науково-практичних конференціях: «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2020, 2021, 2022), всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2020), всеукраїнській науково-практичній

конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» II Галицькі читання (Тернопіль, 2020), XXIV, XXV, XXVI міжнародних медичних конгресах студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2020, 2021, 2022), 81 всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2021), всеукраїнській міждисциплінарній науково-практичній конференції з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)» (Полтава, 2021), VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (Тернопіль, 2022).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць, в тому числі 4 статті у фахових виданнях України, 3 статті в іноземних журналах, індексованих у наукометричній базі SCOPUS, 11 публікацій у матеріалах наукових конгресів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 247 сторінках, ілюстрована 54 таблицями і 11 рисунками. Робота складається з вступу, огляду літератури, описів матеріалу та методів дослідження, двох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел літератури, що містить 307 найменувань, та додатків. Бібліографічний опис використаних літературних джерел і додатки викладено на 44 сторінках.

РОЗДІЛ 1

L-ОРНІТИНУ-L-АСПАРТАТ ЯК ГЕПАТОПРОТЕКТОР ПРИ ГОСТРИХ ТА ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ПЕЧІНКИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Епідеміологія та основні ланки патогенезу гострих та циротичних уражень печінки

1.1.1 Епідеміологія та етіологія хвороб печінки

Гострі та хронічні захворювання печінки є основними причинами захворюваності та смертності в усьому світі. За даними Global Burden of Disease Study у 2017 році 1,5 млрд людей страждали від хронічних захворювань печінки (ХЗП), які були спричинені неалкогольною жировою хворобою печінки (60 %), вірусним гепатитом С (29 %), вірусним гепатитом В (9 %) та алкогольною хворобою печінки (2 %) [6]. Інші захворювання печінки, включаючи первинний біліарний холангіт, первинний склерозуючий холангіт, дефіцит альфа-1-антитрипсину, хворобу Вільсона та аутоімунний гепатит, складають лише 1 % випадків. Хвороби печінки спричиняють приблизно 2 млн смертей на рік у всьому світі, з них через основні ускладнення, як цироз – 1,2 млн смертей і рак печінки – 790 тис. смертей, що становить 3,5 % смертності у світі [7]. Станом на січень 2019 р. в Україні зареєстровано 82 564 пацієнти з ВГС, з них 29 946 пацієнтів ко-інфіковані ВГС і ВІЛ. Із ВГВ зареєстровано 23 687 пацієнтів з них 5640 ко-інфіковані ВГВ і ВІЛ [8, 9].

Показник захворюваності на цироз печінки в Європі складає 26,0 на 100 тис., в Азії – від 16,5 у Східній Азії до 23,6 на 100 тис. населення у Південно-Східній Азії [10]. Спостерігається висока ймовірність прогресування хронічного захворювання печінки та цирозу до гепатоцелюлярної карциноми. Дослідники вказують на зростання приблизно на 80 % захворюваності на

гепатоцелюлярну карциному у США за останні 20–30 років і, за їх оцінками, щороку виникає приблизно 15 тис нових випадків [11].

Окрім високого ризику смертності, фармакоеконімічні показники є високими, а індекси якості життя низькими у пацієнтів із ХЗП. За даними L. imprin та співавт, найбільший тягар захворювань печінки у світі має Європа [12]. При цьому епідеміологія захворювань печінки відрізняється між країнами Європи, наприклад, у Фінляндії та Великобританії спостерігається значне зростання смертності від захворювань печінки за останні 40 років, тоді як у Франції та Італії, навпаки, смертність знижується. Відмінності в епідеміології захворювань печінки відбуваються частково через поширеність модифікованих факторів ризику, таких як вживання алкоголю, ожиріння та вірусний гепатит [13, 14, 15, 16].

Гостра печінкова недостатність (ГПН) визначається як потенційно оборотне гостре порушення функції печінки, що характеризується жовтяницею, коагулопатією та печінковою енцефалопатією у пацієнтів без попередньо діагностованої хвороби печінки [17]. ГПН вважається рідкісною патологією, що характеризується високою смертністю та потребує трансплантації печінки [18, 19]. Під час розрахунку щорічної захворюваності на ГПН виявлено, що вона коливається і складає від 5,5 випадків на 1 млн населення на рік у Сполучених Штатах Америки до 6,2 випадків на 1 млн населення на рік у Шотландії [20, 21]. ГПН може бути викликана токсичними, вірусними, автоімунними або, рідше, спадковими захворюваннями печінки. Існують різні домінуючі причини ГПН, характерні для кожної географічної зони та етнічної приналежності [22, 23, 24]. У Європі, Північній Америці та Японії найпоширенішими причинами ГПН є медикаментозне ураження печінки, гострий вірусний гепатит і криптогенна печінкова недостатність [23, 24]. У країнах, що розвиваються найпоширенішою причиною ГПН є гострий вірусний гепатит [25]. Ряд дослідників зазначають, що основною причиною ГПН у США та європейських країнах є часті випадки розвитку токсичних проявів при передозуванні парацетамолу (ацетамінофену), тоді як гостра вірусна інфекція гепатиту

поширена в Південній та Східній Азії [26, 27, 28]. В Україні медикаментозні ураження печінки становлять 50 % у загальній структурі гострої жовтяниці, і є основною причиною ГПН. У загальній структурі побічних ефектів від прийому лікарських засобів гепатотоксичність становить 10 % [29]. Загалом ГПН, спричинена не парацетамолом, зустрічається рідше, ніж парацетамол-індукована ГПН; у Сполучених Штатах, Австралії, Великобританії та багатьох країнах Західної Європи на ГПН, спричинену не парацетамолом, припадає всього 10-15 % випадків. Цій тенденції протилежні дані Іспанії та Німеччини, де поширеність парацетамол-індукованої ГПН складає відповідно 2 % і 15 % [30]. Смертність, пов'язана з ГПН, коливається від 60 % до 80 %, залежно від етіології захворювання, а також доступу пацієнта до медичної допомоги [31, 32]. Найпоширенішими причинами смерті пацієнтів із ГПН є набряк головного мозку та поліорганна недостатність [33]. З патофізіологічної точки зору гостре або хронічне запалення призводить до деструкції та прогресуючого фіброзу паренхіми печінки. Кінцевою точкою цього часто є цироз печінки [34]. Постійне ураження печінки з підвищенням портального тиску призводить до розвитку портальної гіпертензії (ПГ), яка є вирішальним фактором в розвитку цирозу. Коли виникають спричинені портальною гіпертензією явища декомпенсації печінки, такі як асцит, кровотеча із варикозно розширених вен, печінкова енцефалопатія або гепатоцелюлярна карцинома, смертність швидко зростає [35, 36]. Етіологія цирозу варіює географічно: алкоголізм, гепатит С і НАЖХП є найпоширенішими причинами в західних країнах [37], тоді як хронічний гепатит В є основною причиною цирозу печінки в Азіатсько-Тихоокеанському регіоні [38]. До етіологічних факторів цирозу печінки відносять також спадкові захворювання, такі як гемохроматоз і хвороба Вільсона [39], первинний біліарний цироз, первинний склерозуючий холангіт [40] і автоімунний гепатит [41]. Деякі випадки є ідіопатичними або криптогенними.

1.1.2 Основні ланки патогенезу гострих уражень печінки

Печінка є другим за величиною органом людини та виконує понад 5000 окремих функцій організму, включаючи участь у процесах детоксикації, коагуляції крові, травлення, контролю рівня гормонів, боротьбу з інфекціями, метаболізмі холестерину, білірубину, глюкози, заліза та контроль їх рівня, синтез білків та ін. Печінка постійно знаходиться під впливом токсичних речовин та метаболітів, ксенобіотиків і потенційно небезпечних хімічних агентів [42, 43]. Гостре ураження печінки розвивається внаслідок раптового пошкодження гепатоцитів, що призводить до послідовного швидкого підвищення рівня амінотрансфераз, порушення згортання крові [43, 44]. Ураження гепатоцитів відбувається в 3 стадії: ураження клітин (перша стадія), порушення проникності мітохондрій (друга стадія), і загибель гепатоцитів (остання стадія) [45]. Початкове пошкодження, спричинене хімічними агентами, не прогресує рівномірно до третьої стадії, а пошкоджені клітини печінки можуть бути відновлені за допомогою механізмів захисту та регенераційної здатності. Крім того, на кожній стадії задіяні різноманітні екологічні та генетичні фактори, і ступінь індивідуального ураження печінки.

Гепатоцелюлярне ураження, спричинене лікарськими засобами, супроводжується також медикаментозним холестазом. Було описано принаймні три тригерні чинники медикаментозного холестазу, включаючи вплив на транспортери ліків, різні гепатоцелюлярні зміни та змінену динаміку жовчних каналців [46]. Вони індукують дві клітинні відповіді, кожна з яких характеризується рядом ключових подій, а саме накопиченням жовчних кислот та адаптаційною реакцією, спрямованою на зменшення поглинання та збільшення експорту жовчних кислот у та з печінки, відповідно. Функція залучених мембранних транспортерів ліків пригнічується, що призводить до холестазу. Крім того, метаболіт препарату, який виходить через каналцеву мембрану, пошкоджує холангіоцит, викликаючи холестаз [47]. Поряд із цим, ураження печінки може поглиблюватися шляхом передачі сигналів пошкодження та запалення до сусідніх структур й може захоплювати й не

паренхіматозні клітини, окрім гепатоцитів і холангіоцитів [48]. Необхідно також вказати на різну індивідуальну чутливість до ліків, що обумовлює різний ступінь пошкоджень печінки. Фактори ризику медикаментозних уражень печінки можна розділити на генетичні та фактори середовища [49, 50]. Генетичні фактори включають мутації у ензимах цитохромів P450, експресію транспортних білків і ядерних рецепторів, а також зміни імунних компонентів. Підвищення частоти медикаментозних уражень печінки спостерігалось при поліморфізмі генів глутатіон-S-трансферази та марганцевої ізоформи супероксиддисмутази, специфічних генотипах HLA та з поліморфними варіаціями ферментів, які беруть участь у метаболізмі ліків [51]. Фактори навколишнього середовища включають старший вік, жіночу стать, вживання комбінації препаратів, попередні епізоди розвитку побічних реакцій на лікарські засоби, особливості харчування, вагітність, вживання алкоголю, запалення та наявні захворювання. Зміни мікробіоти кишечника впливають на метаболізм ліків та імунну систему, та можуть сприяти розвитку медикаментозних уражень печінки. Важливим фактом є те, що різні фактори ризику задіяні в різних концепціях триетапної моделі, які описують змінений механізм ураження печінки. [52].

Гепатотоксичність викликає активацію сигнальних молекул, таких як нітроген оксид (NO), які беруть участь у регуляції багатьох фізіологічних процесів, включаючи розширення судин, пригнічення агрегації тромбоцитів, нейротрансмісію, нервову пластичність і модуляцію запальних та імунних реакцій [53]. NO синтезується з L-аргініну синтазою оксиду азоту (NOS), яка існує в одній із трьох ізоформ залежно від аналізованої тканини: eNOS (ендотеліальна NOS), nNOS (нейрональна NOS) та iNOS (індукована NOS) [54]. У більшості клітин експресія iNOS регулюється кількома цитокінами, такими як інтерлейкіни та фактори некрозу пухлин (TNF- α). TNF- α є багатофункціональним цитокіном, який опосередковує відповіді гострої фази в печінці, де він регулюється ядерним фактором kB (NF-kB), фактором транскрипції, відповідальним за індукцію кількох генів, залучених до експресії

медіаторів і прозапальних цитокінів у відповідь на ураження печінки [55]. Характерною ознакою ГПН є прояв системної гіпотензії та гіпердинамічного кровообігу. Що може бути пов'язано з підвищеною активацією гуанілатциклази нітроген оксидом (NO) [56], який перетворює гуанідинтрифосфат на циклічний гуанідинмонофосфат і, як вважають, викликає вазодилатацію, що спостерігається при ГПН [57]. Варто також вказати результати дослідження Sharma та співавт. про те, що NO навряд чи бере участь у ініціації вазодилатації та гіпотензії, які спостерігаються на ранніх стадіях ГПН [58].

При ГПН механізми печінкової енцефалопатії та набряку мозку є багатофакторними. Некроз гепатоцитів виникає внаслідок виснаження АТФ, що викликає набряк клітин і руйнування клітинної мембрани. Патологія набряку головного мозку та печінкової енцефалопатії, яка спостерігається при ГПН, є багатофакторною та включає зміну проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) унаслідок медіаторів запалення, що призводить до активації мікроглії, накопичення глутаміну внаслідок проходження аміаку через ГЕБ та подальший окиснювальний стрес, що призводить до виснаження аденозинтрифосфату (АТФ) і гуанозинтрифосфату (ГТФ). Однак найважливішим механізмом розвитку печінкової енцефалопатії є виділення аміаку з ураженої печінки внаслідок недостатнього синтезу сечовини. Експериментальні та клінічні дослідження протягом останніх трьох десятиліть підтверджують, що гостра гіперамоніємія особливо впливає на ЦНС, оскільки аміак легко проникає через ГЕБ, і його роль характеризують як потужного нейротоксину [59]. Було запропоновано декілька механізмів, які пояснюють вплив аміаку на центральну нервову систему (ЦНС), зокрема, специфічні взаємодії між ендотелієм мозку та астроцитами, модифікація транспорту через гематоенцефалічний бар'єр, зміни в енергетичному метаболізмі, прямий нейротоксичний вплив на астроцити і мембрани нейронів, знижуючи синтез вільного глутамату з порушенням глутаматергічної нейротрансмісії [60, 61, 62, 63, 64].

Широке дослідження ролі вільних радикалів кисню у токсичності ацетамінофену (АРАР) встановило, що мітохондріальна дисфункція та

генерація вільних радикалів таких як супероксид-аніон є ключовими для некрозу гепатоцитів, спричинених АРАР [65]. Ця мітохондріальна дисфункція ініціюється утворенням аддуктів між реактивним метаболітом АРАР N-ацетил-Р-бензохіноніміну — (N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI) та мітохондріальними білками, особливо компонентами транспортного ланцюга електронів, таких як синтаза АТФ [66]. Крім того, активність комплексу I, що виступає джерелом мітохондріальних вільних радикалів у ряді досліджень [67], була збільшена після передозування ацетамінофену, що корелювало зі ступенем ушкодження печінки [68]. Проте, дослідження показали, що реакція супероксид-аніон радикалу з оксидом азоту в мітохондріях, яка призводить до генерації високореактивних видів пероксинітриту, є молекулярною основою ініціювання мітохондріальної дисфункції та наступних патофізіологічних змін [68]. Додатковим ініціатором мітохондріального генерації кисневих радикалів може бути лізосомальне залізо, яке вивільняється з порушених лізосом і приймається мітохондріями [69] через кальцієві транспортери, генеруючи гідроксильні радикали [70]. Відкриття перехідних пор проникності у внутрішній мітохондріальній мембрані призводить до набряку мітохондріальної матриці, вироблення дефектного аденозину трифосфату (АТФ) та окиснювального фосфорилування, збільшуючи утворення вільних радикалів та створюючи порочне коло, що веде до клітинної дисфункції [71].

Отже, патогенез гострих уражень печінки є складним, однак ключову роль відіграють запалення, зміни кровотоку та енергетичного метаболізму, окисний стрес, порушення синтезуючої та детоксикуючої функцій.

1.1.3 Основні ланки патогенезу цирозу печінки

Хоча причини формування цирозу печінки багатofакторні, існують деякі патологічні характеристики, які є загальними для всіх випадків цирозу печінки, включаючи дегенерацію та некроз гепатоцитів, заміщення паренхіми печінки фіброзною тканиною та формування вузлів регенерації, а також втрату функції печінки [72]. Розвиток цирозу печінки відбувається через 15-20 років хроніч-

ного гепатоцелюлярного ураження. Циротична печінка містить у шість разів більше екстрацелюлярного матриксу. Тривалий хронічний вплив токсичних агентів, таких як віруси, алкоголь або жовчні кислоти, може викликати пошкодження гепатоцитів і апоптоз. У відповідь запускається реакція відновлення, яка характеризується відкладанням екстрацелюлярного матриксу і запаленням, що призводить до фіброзу печінки [73]. У патогенезі цирозу печінки відіграють роль як гепатоцити, так і непаренхіматозні клітини стінки печінкових синусоїдів, а саме, зірчасті клітини печінки (ЗКП), синусоїдальні ендотеліальні клітини печінки (СЕКП) і клітини Купфера (КК). За рахунок дії запальних цитокінів ЗКП активуються, перетворюються на міофібробласти та починають відкладати колаген, що призводить до фіброзу. Доведено, що проліферація та синтез колагену ЗКП запускаються шляхом перекисного окиснення ліпідів, спричиненого окиснювальним стресом [74, 75]. Досліджуючи дію кисневих радикалів на активовані ЗКП, зазначається, що супероксид-аніон знижує їх життєздатність, викликаючи апоптоз цих клітин внаслідок мітохондріального вивільнення цитохрому-С, активації каспази-3 та посилення експресії Вах [76, 77]. Активні запальні клітини можуть виробляти більше кисневих та нітросоактивних радикалів, які здатні збільшити експресію генів, що кодують прозапальні цитокіни. Під час запалення активовані запальні клітини також виробляють фіброгенні цитокіни та фактори росту, що активують ЗКП [78].

Роль поліморфізму генів цитокінів у прогресуванні фіброзу печінки або розвитку цирозу у пацієнтів із печінковими захворюваннями була досліджена рядом науковців. Були виявлені алелі TNF_2 (-238A) та TNF_3 (-308A) у пацієнтів з цирозом печінки внаслідок гепатиту С [80]. Вважається, що поліморфізми гена $TGF-\beta$ є одним із детермінант прогресування фіброзу при вірусному гепатиті [80]. ЗКП відіграють важливу роль у фіброгенезі печінки, при цьому $IL1$ є потужним цитокіном, який індукує міофібробластичну активацію ЗКП, також задіяний у проліферації ЗКП та регуляції експресії різних матричних металопротеїназ, які відіграють ключову роль у депозиції екстрацелюлярного матриксу [81]. Дослідники зазначають, що поліморфізм гена $IL1\beta$ може впли-

вати на прогресування печінкового фіброзу, впливаючи на печінкову експресію IL1 під час ушкодження печінки [82]. TGF- β стимулює вироблення білків поза-клітинного матриксу та їх рецепторів, та інгібує синтез матричних протеолітичних ферментів при хронічному вірусному гепатиті С, позитивно корелюючи в сироватці з показником фіброзу [83]. IL10 відіграє захисну роль у фіброгенезі печінки, оскільки дослідження показали зниження печінкового запалення та підвищення рівня РНК у сироватці крові, що відповідає зниженню показника фіброзу печінки у пацієнтів з вірусним гепатитом С після терапії рекомбінантним IL10 [84, 85]. СЕКП утворюють синусоїдальну стінку, яку також називають ендотелієм або ендотеліальною вистилкою. Структурною характеристикою СЕКП є фенестри на поверхні ендотелію, які забезпечують обмін рідини та поживних речовин між синусоїдами та гепатоцитами. Дефенестрація синусоїдальної стінки може статися внаслідок хронічного вживання алкоголю та сприяти перисинусоїдальному фіброзу [86]. При цирозі печінки часто спостерігається дефенестрація синусоїдального ендотелію та наявність субендотеліальної базальної мембрани [72]. КК є сателітними макрофагами, які також вистилають стінку синусоїдів. Експериментальні дослідження показали, що вони відіграють важливу роль у фіброзі печінки, вивільняючи шкідливі медіатори під впливом токсичних агентів і діючи як антигенпрезентуючі клітини для вірусів [87]. Різноманітні цитокіни, такі як TNF α , можуть вироблятися в КК, індукованих окиснювальним стресом, що може збільшити запалення та апоптоз. Пошкоджені гепатоцити вивільняють активні форми кисню та медіатори запалення, що активує ЗКП та веде до формування фіброзу печінки [87, 88]. При цирозі печінки структура печінкових часточок руйнується, утворюються псевдочасточки, пошкоджується структура синусоїдів, що призводить до зниження постачання гепатоцитів поживними речовинами та киснем, посилює гепатоцелюлярний некроз та значно знижує синтез альбуміну крові (понад 50%) [89]. Дослідження показали, що пацієнти з цирозом печінки перебувають у стані високого метаболізму та високого розпаду, при цьому швидкість розпаду білка є вищою за швидкість синтезу. Крім того, вміст

глікогену в печінці у пацієнтів з цирозом печінки зменшується вдвічі, також існують перешкоди для утилізації глюкози, підвищуються рівні інсуліну, глюкагону та адреналіну в плазмі, що сприяє ранньому глюконеогенезу [90].

Функція печінки порушується через розвиток синусоїдального фіброзу із капіляризацією, фіброзом перегородок з порто-системними шунтами та втратою клітин Купфера [91]. Це структурне порушення знижує кліренс ендотоксинів та бактерій з крові, що призводить до бактеріємії та стійкої стимуляції імунної системи. Відсутність клітин Купфера або їх рецепторів призводить до неконтрольованої бактеріємії та збільшення смертності експериментальних тварин [92].

Основною причиною смертності у хворих на цироз печінки є розвиток портальної гіпертензії та гіпердинамічного кровообігу [93]. Портальна гіпертензія розвивається внаслідок фіброзу та вазорегуляторних змін, як внутрішньопечінкових, так і системних, що призводить до формування колатерального кровообігу та гіпердинамічної циркуляції [94]. Внутрішньопечінково СЕКП синтезують як нітроген оксид (NO), так і ендотелін-1 (ET-1), які діють на ЗКП, викликаючи відповідно розслаблення або скорочення синусоїдів і контролюючи синусоїдальний кровотік. У хворих на цироз печінки спостерігається підвищення продукції ET-1, а також підвищення чутливості його рецепторів зі зниженням продукції NO. Це призводить до збільшення внутрішньопечінкової вазоконстрикції та резистентності, ініціюючи портальну гіпертензію. Ремодельовання судин, опосередковане скоротливими ефектами СЕКП у синусоїдах, посилює збільшення опору судин. Щоб компенсувати це підвищення внутрішньопечінкового тиску, формується колатеральний кровообіг [95]. У системному кровотоці відбувається протилежний ефект із збільшенням продукції NO, що призводить до системної та внутрішньої вазодилатації та зниження системного опору судин. Це сприяє активації ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС), що призводить до затримки натрію та води, що веде до гіпердинамічного кровообігу. Таким чином, при цирозі печінки з портальною гіпертензією спостерігається дефіцит вазодилаторів (переважно NO) у внутрішньопечін-

ковій системі, але надлишок NO у позапечінковому кровообігу та системному кровообігу, що призводить до синусоїдальної вазоконстрикції та системної вазодилатації. Колатералі також сприяють гіпердинамічному кровообігу, збільшуючи венозне повернення до серця [34, 96]. Системний ОС, що виникає під час захворювання печінки, також може спричинити пошкодження позапечінкових органів, таких як порушення мозку та ниркова недостатність [97]. Він може бути суттєвим «першим ударом», що діє синергійно з аміаком, зумовлюючи набряк мозку при хронічній печінковій недостатності [98]. Загалом, ОС і запалення щільно корелюють і створюють вадовий цикл, який бере участь у прогресуванні захворювань печінки до цирозу та в кінцевому рахунку до гепатоцелюлярної карциноми [99]. Як і при ГПН, ще однією ознакою окисного стресу при цирозі печінки на тлі хронічного гепатиту В і С є порушення антиоксидантної здатності печінки та крові [100]. Проте дослідники зазначають, що окиснювальний стрес є двофазним: низькі або помірні концентрації активних форм кисню (АФК) запускають сигнальні каскади для ввімкнення антиоксидантного захисту; натомість більша кількість АФК пригнічує експресію генів, що кодують антиоксидантні ферменти, що призводить до пошкодження клітин. Крім того, вплив вірусних білків на антиоксиданти різний; деякі індукуються (каталаза, глутатіонпероксидаза), а інші (ізоферменти СОД) знижуються [101]. Таким чином, оцінка кумулятивного маркера як загальна антиоксидантна здатність повинна супроводжуватися індивідуальною оцінкою більшості антиоксидантів у патогенезі цирозу печінки. Дослідження антиоксидантів довели їх ефективність у покращенні функції печінки та зменшенні фіброзу в експериментальних дослідженнях [102, 103].

Таким чином, патогенез цирозу базується на зміні структури та функціонування печінкових часточок через хронічне запалення, дисбаланс цитокінів, порушення кровообігу та ендотеліальну дисфункцію, оксидативний стрес, ендотоксикоз та ін. Це обґрунтовує необхідність подальших досліджень щодо пошуку лікарських засобів механізм дії яких пов'язаний з патогенезом

цирозу, що дозволить підвищити ефективність та знизити смертність пацієнтів з цирозом печінки.

1.2 Фармакологічна властивості L-орнітину-L-аспартату та ефективність його застосування як гепатопротектора

1.2.1 Лікарські засоби, що використовуються при захворюваннях печінки: класифікація, механізми дії, переваги та недоліки

Сучасні протоколи лікування патології печінки включають два основних напрямки фармакотерапії: етіотропну та патогенетичну терапії. Етіотропна терапія, як правило, застосовується при вірусних гепатитах і спрямована на пригнічення реплікації збудника захворювання і його елімінацію. Основу патогенетичної терапії становлять препарати, що впливають на структуру і функції гепатоцитів. Саме засоби патогенетичної терапії прийнято позначати терміном «гепатопротектори» [104]. Асортимент лікарських засобів, що застосовуються в комплексній терапії захворювань печінки та жовчовивідних шляхів, налічує сотні найменувань [105]. Однозначного визначення терміну «гепатопротектори» не існує. Різні автори по різному формулюють це поняття [106, 107]. За визначенням Беловол А. Н. та Князькової І. І. гепатопротектори – це група лікарських засобів різного походження, дія яких спрямована на відновлення гомеостазу у гепатоцитах, що сприяє підвищенню стійкості органу до впливу патогенних факторів, нормалізації функціональної активності та стимуляції репаративно-регенераторних процесів у печінці [112]. Гепатопротекторна дія притаманна препаратам рослинного, тваринного походження, есенціальним фосфоліпідам, деяким амінокислотам, вітамінам та антиоксидантам; серед гепатопротекторів є і багато комбінованих препаратів [109, 110]. На фармакологічному ринку гепатопротектори сьогодні представлені численними групами, у зв'язку з чим нерідко відзначається «шаблонний» підхід до їх призначення гепатопротекторів, без урахування особливостей патогенезу хвороби, механізму дії фармакокінетики і фармакодинаміки, впливу на жовчо-

видільну систему, взаємодії з іншими лікарськими препаратами, особливо за наявності у хворого коморбідної патології. Незважаючи на той факт, що у більшості країн світу не використовується термін «гепатопротектори», препарати цієї групи широко призначають пацієнтам із патологією печінки [111, 112, 113, 114, 115, 116]. Li M. та співавтори зазначають, що до лікарських засобів з гепатопротективними властивостями відносять препарати, які можуть покращувати метаболічну функцію печінки, сприяти регенерації клітин печінки та/або посилювати детоксикаційну функцію печінки, і єдиного розуміння щодо їхньої класифікації немає, а за механізмом дії їх можна умовно поділити на детоксикаційні засоби, протизапальні засоби, протектори мембран гепатоцитів, антиоксидантні засоби, тощо [117].

АТС класифікація визначає більшість таких лікарських засобів як засоби метаболічної дії. В Україні загальноприйнятої класифікації гепатопротекторів також немає. Найчастіше їх поділяють залежно від походження, складу та механізму дії [108, 109].

Щодо загальних механізмів дії гепатопротекторів, то на сучасному етапі виділяють п'ять основних процесів, що запускають процес загибелі гепатоцитів: ушкодження плазматичної мембрани та порушення цитоскелету; мітохондріальна дисфункція; втрата внутрішньоклітинного іонного гомеостазу; активація ензимів деградації речовин; оксидативний стрес. Гепатопротектори посилюють детоксикуючу функцію гепатоцитів за рахунок збільшення запасів глутатіону, таурину, сульфатів або підвищення активності ензимів, які беруть участь в окисненні; гальмують реакції надмірного пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ), зв'язують продукти ПОЛ і беруть участь у репарації структур клітинних мембран; впливають на синтез, виділення та транспорт жовчі; беруть участь в регуляції синтезу протеїнів гепатоцитами та регуляції метаболізму глюкози; володіють протизапальним та імуномодулюючим впливом; блокують фіброгенез за рахунок зменшення некрозів гепатоцитів, перешкоджають надходженню антигенів з травного тракту в результаті транслокації кишкових бактерій та їх токсинів, що є активаторами клітин Купфера, стимулюють

активність колагеназ у печінці і блокують активність ензимів, що беруть участь у синтезі компонентів сполучної тканини [108, 118]. Загальними перевагами гепатопротекторів є вплив на патогенез захворювань печінки, сповільнення прогресування захворювання, багаторічний клінічний досвід, як правило, добра переносимість та відсутність виражених побічних ефектів [110]. Щодо загальних недоліків гепатопротекторів, то до них відносять відсутність етіотропної дії; ні один із відомих препаратів не має усіх характеристик ідеального гепатопротектора (досить повна абсорбція; наявність ефекту першого проходження через печінку; виражена здатність зв'язувати високоактивні ушкоджуючі сполуки або запобігати їх утворенню; можливість зменшувати надмірно виражене запалення; пригнічення фіброгенезу; стимуляція регенерації печінки; природний метаболізм при патології печінки; екстенсивна ентерогепатична циркуляція; відсутність токсичності); слабка доказова база; складність вивчення фармакокінетики [106].

Хоча, жоден з гепатопротекторів, що використовуються в даний час в медичній практиці, повною мірою не відповідає вимогам доказової медицини щодо клінічної ефективності. Разом з тим, ряд препаратів, особливо амінокислотного походження, показали достовірні результати при клінічних дослідженнях. До таких препаратів, зокрема, належить L-орнітину L-аспартат (LOLA) [119, 120].

1.2.2 L-орнітин-L-аспартат: фармакологічна характеристика та механізм дії

LOLA – це стабільна сіль двох природних амінокислот: L-орнітину та L-аспартату, які мають як загальні шляхи метаболізму, так і специфічні для кожної з них, що і визначає терапевтичні властивості препарату [121].

LOLA є безбарвним кристалічним порошком із молекулярною формулою $C_9H_{19}N_3O_6$, легко розчинним у воді і помірно розчинним в етанолі. LOLA випускається в гранульованій формі в пакетиках по 5 г, що містять 3 г LOLA і невелику кількість додаткових інгредієнтів, включаючи безводну лимонну

кислоту, лимонний ароматизатор, апельсиновий ароматизатор, сахарин натрію, цикламат натрію, жовто-оранжевий барвник S (полі [1-вініл-2-піролідон] та левулозу. Лікарський препарат також доступний у водному розчині для інфузій від безбарвного до блідо-жовтого кольору. 10 мл концентрату містять 5 г L-орнітину-L-аспартату [1].

LOLA дисоціює на амінокислоти, що входять до його складу, L-орнітин і L-аспартат, які всмоктуються з тонкої кишки шляхом активного транспорту через щіточкову облямівку кишкового епітелію. Це поглинання значною мірою залежить від градієнта іонів натрію. Аспартат переноситься транспортною системою дикарбонових амінокислот. У клітинах слизової оболонки відбувається перетворення глутаміну, глутамату та аспартату на аланін, цитрулін, орнітин та пролін. Більшість аспартату піддається переамінуванню з піруватом у клітинах слизової оболонки стінки кишечника з утворенням аланіну та оксалоацетату. Ця реакція різко знижує кількість аспартату, що надходить у портальну кров. У портальній крові більша частина аспартату знаходиться в плазмі, і лише дуже невелика його частина знаходиться в еритроцитах. При концентраціях 1–25 мМ переносники амінокислот активні трохи нижче за їх максимальну швидкість обороту, а чисте поглинання за допомогою простої пасивної дифузії може перевищувати швидкість опосередкованого шляху. У людей нормальні концентрації коливаються від 30 до 106 мкмоль/л (у середньому 59,8) для L-орнітину та 0–24 мкмоль/л (у середньому 7,5) для L-аспартату [1].

При пероральному введенні LOLA швидко розщеплюється на L-орнітин та L-аспартат у верхніх відділах кишки. Згодом за допомогою реакцій переамінування аміно-азот різних амінокислот може бути включений в аланін, аспартат та глутамат. Залежно від стану пацієнта він може повторно використовуватися для біосинтезу протеїнів або перетворюватися на сечовину з метою екскреції. Аланін використовується в синтезі протеїнів та інших реакціях, а оксалоацетат окислюється або через цикл трикарбонових кислот або через аспартат [122]. Деяка кількість залишкового аспартату може вступати в реакцію

з цитруліном з утворенням аргінін-сукцинату, який згодом розщеплюється до fumarату та аргініну або вступає в реакцію з карбамоїлфосфатом, щоб ініціювати синтез піримідину. Аспартат, що залишився, і новоутворений малат, α -кетоглутарат і оксалоацетат поглинаються перивенозними гепатоцитами, де вони служать джерелом вуглецю для синтезу глутаміну [1]. Після потрапляння в портальну кров L-орнітин безпосередньо захоплюється перипортальними гепатоцитами печінки та метаболізується у мітохондріях [123].

Орнітин служить посередником у циклі сечовини та є активатором карбамоїлфосфатсинтетази, ензиму, що обмежує швидкість синтезу сечовини [124]. Це особливо актуально для хворих цирозом, оскільки у них активність цього ензиму може бути знижена на 20 % [125].

Частина орнітину декарбоксилюється і включається до складу поліамінів; деякі піддаються переамінуванню з утворенням напівальдегіду глутамату та глутамату, в результаті реакції утворюється НАДН. L-орнітин постійно регенерується у циклі сечовини, а донор аміногрупи, L-аспартат, може регенеруватися у кілька ферментативних стадій. Таким чином, при біосинтезі сечовини гепатоцит втрачає дві молекули аміаку, а також бікарбонат та енергію. L-орнітин перетворюється на глутамат- γ -напівальдегід, який дегідратується з утворенням дикарбонової кислоти. Таким чином, шляхом зміни шляхів метаболізму та різних ензимів L-орнітин, з одного боку, може бути синтезований, а з іншого боку, може бути декарбоксилюваний з утворенням діаміну путресцину [126].

Отже, молекула орнітину є ключовим субстратом у ланцюзі послідовних ензиматичних реакцій орнітинового циклу синтезу сечовини (цикл Кребса-Хензелейта), що має місце в перипортальних гепатоцитах, в результаті якого токсичні азотовмісні продукти розпаду, в першу чергу аміак, перетворюються на нетоксичну водорозчинну сечовину – головний кінцевий продукт обміну протеїнів, що у свою чергу виділяється нирками. Орнітин збільшує активність і продукцію ензиму карбамоїлфосфатсинтетази, під дією якого в присутності N-ацетилглутамінової кислоти аміак перетворюється на карбамоїлфосфат, з якого

під дією орнітинкарбамоїлтрансферази утворюється амінокислота цитрулін, яка взаємодіє з аспаратом і трансформується в аргінін – «напівзамінну» амінокислоту, що в подальшому в присутності ензиму аргінази знову перетворюється на орнітин. В результаті орнітиновий цикл замикається, а його продуктом є утворення молекули сечовини, яка здатна ефективно виводитися з організму. При цьому одна з амідних груп сечовини формується з неорганічного аміаку, а друга приноситься аспаратом. Таким чином, орнітин оптимізує основний шлях детоксикації аміаку – синтез сечовини в орнітиновому циклі (рис. 1.1) [3, 127, 128, 129, 158].

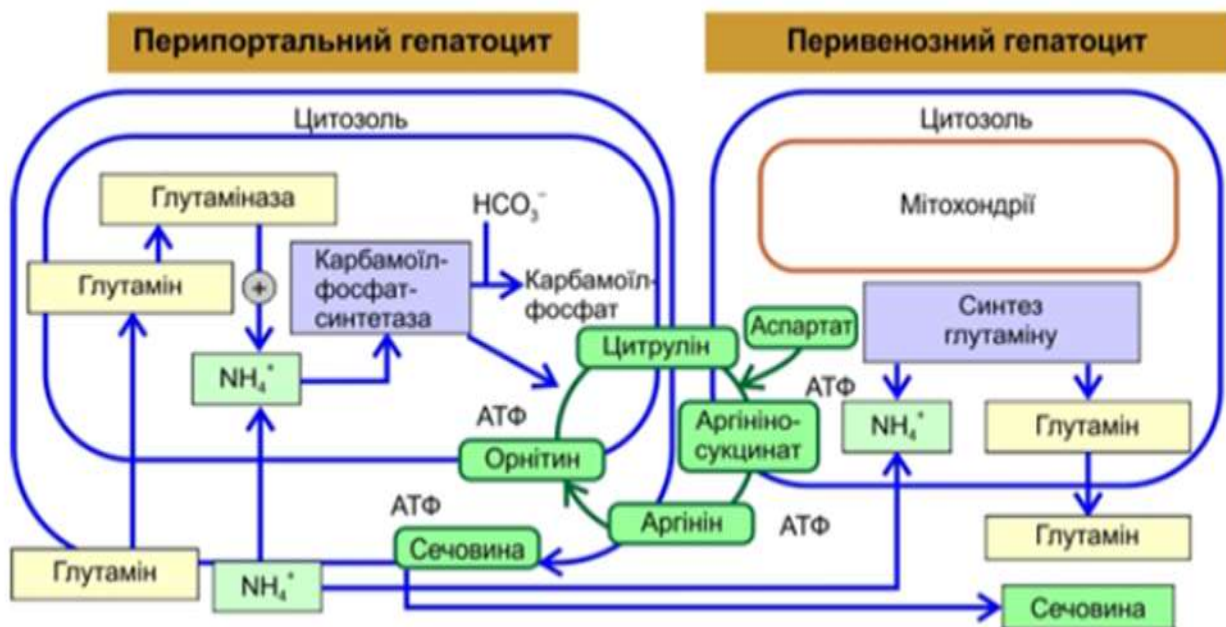


Рисунок 1.1 – Вплив L-орнітин-L-аспарату на синтез сечовини і глутаміну [158]

Орнітин також забезпечує продукцію енергетичних субстанцій, зокрема нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату – НАДФ, що зумовлює гепатопротективний ефект за рахунок збільшення енергетичного резерву мітохондрій гепатоцитів. Крім того, орнітин бере участь у біосинтезі глутамату, α -кетоглутарату та проліну, які також відіграють істотну роль у біосинтезі протеїнів, що зумовлює анаболічний ефект L-орнітин-L-аспарату

Аспартат, у свою чергу, під дією трансаміназ здатний метаболізуватися в оксалоацетат, який залучається до циклу трикарбонових кислот Кребса (рис. 1.2) і, крім того, піддається послідовній трансформації в глюкозу, яка у вигляді глікогену здатна депонуватися в печінці (процес глюконеогенезу) [130].

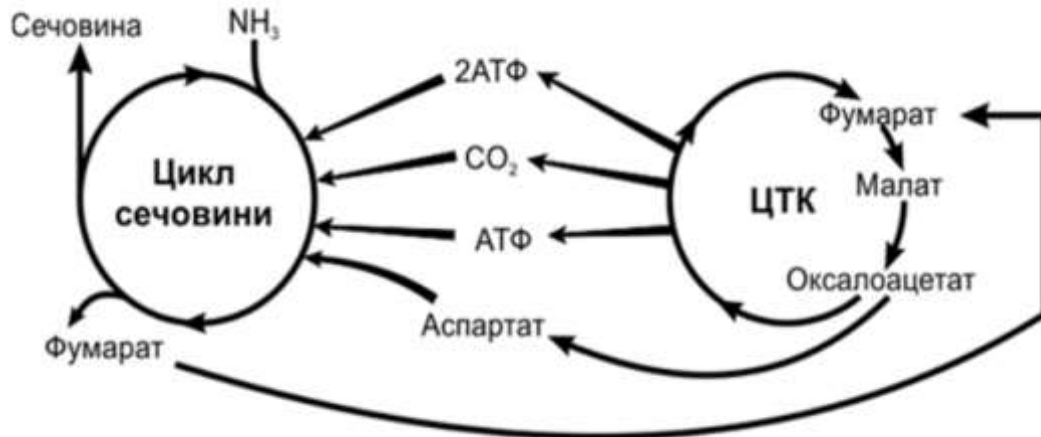


Рисунок 1.2 – Залучення аспартату до циклу трикарбонових кислот Кребса [131]

Аспартат також є субстратом у циклі синтезу сечовини. Крім того, аспартат відіграє важливу роль у знешкодженні аміаку в реакції синтезу глутаміну з глутамату, що протікає у перивенозних гепатоцитах та м'язовій тканині. Роль цього механізму детоксикації аміаку істотно зростає при хронічних захворюваннях печінки будь-якої етіології, в умовах зниження її функціонального резерву на тлі мітохондріальної дисфункції, що наростає. З м'язів та кишки надлишок аміаку виводиться переважно у вигляді аланіну, що є продуктом катаболізму аспартату, який надає безпосередню цитопротекторну дію на гепатоцити, запобігаючи зниженню внутрішньоклітинної концентрації ATP у уражених гепатоцитах та викиду з них трансаміназ, що сприяє зменшенню пошкодження тканини печінки [132]. Крім того, аспартат також виконує роль нейромедіатора та бере участь у реакції переамінування з глутаміном, внаслідок чого підвищує його концентрацію та трансформується в аспарагін – амінокислоту, здатну до ряду важливих біохімічних перетворень

[133]. LOLA не екскретується як такий, але сечовина, його основний продукт, виводиться із сечею. Потік через цикл сечовини контролюється позаклітинним рН, в першу чергу, бікарбонатом та CO_2 . Зниження синтезу сечовини при ацидозі супроводжується збереженням бікарбонатів та виділенням іонів амонію із сечею (нирковий аміакогенез) [126]. Глутамін бере участь у транспорті аміаку з печінки до нирок. При ацидозі потік через цикл сечовини та печінкову глутаміназу знижується, тоді як потік через печінкову глутамінсинтетазу та ниркову глутаміназу збільшується [123, 134, 135].

Отже, основними фармакологічними властивостями L-орнітину є: включення в цикл сечовини як субстрат (на етапі синтезу цитруліну); активація карбамоїлфосфатсинтетази I (першого ензиму циклу сечовини); активація глутамінсинтетазної реакції у печінці та м'язах, зниження концентрацію аміаку в плазмі крові; сприяє нормалізації кислотно-основної рівноваги організму; сприяє продукції інсуліну та соматотропного гормону; покращує обмін протеїнів при захворюваннях, які потребують парентерального харчування.

Щодо L-аспартату, то його основними фармакологічними властивостями є: включення в цикл сечовини на етапі синтезу аргінінсукцинату; є субстратом для синтезу глутаміну; бере участь у зв'язуванні аміаку в перивенозній крові, гепатоцитах, мозку, інших тканинах; стимулює синтез глутаміну в м'язах та перивенозних гепатоцитах; чинить стимулюючу дію на неактивні або уражені клітини печінки; стимулює регенерацію, покращує енергетичні процеси у пошкодженій тканині печінки; бере участь у циклі трикарбонових кислот; має здатність проникати через мембрани клітин шляхом активного транспорту; всередині клітини бере участь у процесах енергетичного обміну, що проходять у мітохондріях, за рахунок чого підвищує енергетичне забезпечення тканини [136].

1.2.3 L-орнітин та система знешкодження аміаку

Порушення функції печінки призводить до підвищення рівня аміаку (NH_3) в сироватці крові [130, 137]. NH_3 є центральним елементом міжорганного

транспорту азоту, що виробляється при розщепленні сечовини кишковими бактеріями, а також при дезамідуванні глутаміну та під час катаболізму амінокислот у тканинах [138]. У фізіологічних умовах NH_3 ефективно детоксикується за допомогою циклу сечовини, ензиматичного механізму, що відбувається лише в гепатоцитах, і за допомогою ензиму глутамінсинтетази [139]. Окрім печінки глутамінсинтетаза також конвертує NH_3 і глутамат в глутамін в інших тканинах, таких як м'язи, мозок і нирки [140]. У м'язах глутамін є амінокислотою, яка використовується для синтезу білка, але також є основним субстратом для глюконеогенезу [141]. Оскільки скелетно-м'язовий компонент становить до 50 % маси тіла, він стає критично важливим для детоксикації NH_3 у разі гострої та/або хронічної печінкової недостатності [142], при якій аміак накопичується за рахунок зниження активності циклу сечовини. Високі рівні аміаку у сироватці крові пов'язані з печінковою енцефалопатією, апоптозом гепатоцитів, запаленням, порушенням функції печінки та високою смертністю [143, 144].

За останні два десятиліття було опубліковано результати кількох систематичних оглядів та/або мета-аналізів ефектів LOLA при лікуванні печінкової енцефалопатії при цирозі [145]. Перше дослідження у вигляді абстракту опублікували Delcker A.M. та співавтори у 2000 р. [146]. На підставі результатів п'яти подвійних сліпих плацебо-контрольованих досліджень за участю 246 пацієнтів із цирозом печінки дослідники оцінювали ефективність внутрішньовенних інфузій LOLA (20–40 мг впродовж 4–8 год протягом 7-ми днів) щодо покращення психічного стану пацієнтів та рівня гіперамоніємії. Лікування LOLA призводило до збільшення шансів на видужання від печінкової енцефалопатії у 3,2 раза після 7 днів терапії порівняно з плацебо. Лікування також спричинило значне зниження рівня постпрандіального аміаку протягом цього часу. Другий мета-аналіз трьох рандомізованих досліджень, що включали 212 пацієнтів з цирозом, що був опублікований у 2009 році, підтвердив позитивний ефект LOLA у пацієнтів з цирозом печінки та печінковою енцефалопатією 1 або 2 ступеня. Варто вказати, що у це дослідження не включали вищі ступені печінкової енцефалопатії, і у пацієнтів з мінімальною печінковою

енцефалопатією не було виявлено позитивного впливу LOLA [147]. Наступний систематичний огляд та оновлений мета-аналіз були проведені для оцінки ефективності LOLA за участю 646 пацієнтів з цирозом печінки (клас С за Чайлд-П'ю у 15–50 % випадків) порівняно з плацебо (6 досліджень), лактулозою (1 дослідження) або пробіотиків (1 дослідження) [148]. На відміну від результатів попереднього мета-аналізу, LOLA був значно ефективнішим, ніж плацебо, і настільки ж ефективним, як лактулоза/пробіотики, для покращення психічного стану пацієнтів. У цьому ж дослідженні також було відзначено значне зниження рівня аміаку натще у пацієнтів, які отримували LOLA.

У 2018 р. Goh E.T. та співавтори провели систематичний огляд літератури з метою оцінки позитивних і негативних ефектів L-орнітину-L-аспартату в порівняно з плацебо, відсутністю втручань або іншими активними втручаннями у хворих з цирозом та печінковою енцефалопатією, який показав благоприємний вплив LOLA на перебіг печінкової енцефалопатії [2]. Також у 2018 р. Sidhu S.S. та співавтори провели один з найбільших та найгрунтовніших системних оглядів та мета-аналізів літературних даних щодо оцінки ефективності LOLA при печінковій енцефалопатії і виявили, що LOLA ефективний не лише для лікування субклінічної печінкової енцефалопатії, але й маніфестної печінкової енцефалопатії, включаючи високі ступені вираженості [149]. Проте дослідники вважають, що необхідні подальші дослідження ефективності LOLA за участю більшої кількості пацієнтів з більш високим ступенем печінкової енцефалопатії. LOLA може використовуватися як самостійний метод лікування субклінічної печінкової енцефалопатії, а при маніфестній печінковій енцефалопатії додавання парентерального LOLA до лактулози пов'язане зі значно більш коротким часом відновлення та більш короткою тривалістю перебування в лікарні.

Механізми за допомогою яких знижується рівень аміаку в крові при введенні LOLA до кінця не вивчені. LOLA, ймовірно, видаляє аміак за допомогою двох різних механізмів: а) за рахунок посилення синтезу сечовини, оскільки орнітин і аспартат є субстратами для аргініносукцинатсинтази і

орнітинтранскарбамілази; б) за рахунок збільшення синтезу глутаміну за допомогою ензиму глутамінсинтази [149]. За даними Rose С. та співавторів як L-орнітин, так і L-аспартат підвищують концентрацію глутамату за рахунок зміщення рівноваги трансаміназ [150] (рис. 1.3). Сьогодні існує ряд досліджень, які свідчать про зменшення прогресування синдромів цитолізу, холестазу, покращення показників системи згортання крові, а також про покращення показників за шкалами Чайлда-П'ю і MELD при застосуванні LOLA у пацієнтів з цирозом печінки [1, 121]. Сова В.А. зазначає, що на тлі застосування L-орнітину-L-аспартату (Гепатоксу), у хворих з алкогольним ураженням печінки значно зменшилися активність АЛТ, АСТ та вміст білірубину, що свідчить про високу ефективність препарату як гепатопротектора [151].



Рисунок 1.3 – Утворення глутамату за умови введення LOLA [157]

Для пояснення гепатопротекторної дії LOLA при хронічних захворюваннях печінки було запропоновано два основні механізми: антиоксидантні властивості глутатіону, що синтезується з L-орнітину та підвищена генерація нітроген оксиду (NO) за рахунок збільшення синтезу L-аргініну з L-орнітину [127, 130]. Важливим є і гіпоамонійемічний ефект LOLA, що дозволяє застосовувати його у патогенетичному лікуванні печінкової енцефалопатії у пацієнтів з цирозом печінки за рахунок збільшення синтезу сечовини, або за рахунок збільшення синтезу глутаміну через ензим

глутамінсинтетазу в перивенозних гепатоцитах [144, 166]. Ймовірно, що LOLA впливає на видалення аміаку також в скелетних м'язах і мозку [167, 168].

Jain A. та співавтори досліджували ефективність застосування LOLA при гострій печінковій енцефалопатії та показали, що комбінація LOLA + лактулоза + рифаксимін була більш ефективною відносно комбінації лактулоза + рифаксимін щодо покращення ступеня печінкової енцефалопатії та часу одужання з більш низькою 28-денною смертністю [3]. У той же час Pichon C. і співавтори, які досліджували ефективність печінкової і м'язової детоксикації аміаку у мишей з мутацією *Alms1* (*foz/foz*), що отримували дієту із високим (60 %) вмістом жиру та оцінювали при цьому ефект 8-тижневого прийому LOLA не виявили покращення метаболізму аміаку при застосуванні LOLA, ані покращення перебігу неалкогольного стеатогепатиту [132]. Активність циклу сечовини не змінилася при лікуванні, а експресія гена глутамінсинтетази та білка навіть знизилася під дією LOLA. Незважаючи на те, що в інших дослідженнях також повідомлялось про відсутність ефективності LOLA [153, 154], Pichon і співавтори зазначають, що зміни в обміні аміаку можуть бути надто незначними при неалкогольному стеатогепатиті, щоб зробити видимими зміни, спричинені лікуванням LOLA [132]. На додачу до прямого впливу LOLA на печінку через посилене видалення аміаку та покращення функціонування системи антиоксидантного захисту препарат може мати і непрямі гепатопротекторні ефекти [156], що потребує подальшого вивчення.

Підвищення концентрації глутамату в тканинах може стимулювати синтез глутаміну з допомогою ензиму глутамінсинтази, що активується аспаратом. Глутамінсинтаза присутня у відносно великій кількості в печінці (в перивенозних гепатоцитах), головному мозку та скелетних м'язах [158]. Крім того, портокавальне шунтування призводить до індукції глутамінсинтази в м'язах. Враховуючи підвищену доступність субстрату (глутамату) та можливість індукції ензиму у м'язах, цілком ймовірно, що важливим механізмом зниження рівня аміаку під дією LOLA є посилення синтезу глутаміну скелетними м'язами [157].

На додачу аланін, як один із продуктів катаболізму аспартату, проявляє пряму цитопротекторну дію на гепатоцити, запобігаючи зниженню внутрішньоклітинної концентрації АТФ в уражених гепатоцитах та виходу трансаміназ з гепатоцитів, таким чином зменшуючи пошкодження тканини печінки [158].

1.2.4 L-орнітин та система нітроген II оксиду

Нітроген II оксид (NO) є одним із найважливіших медіаторів та регуляторів, що беруть участь у розвитку як фізіологічних, так і патологічних процесів в організмі людини. NO розслаблює гладку мускулатуру, знижує тонус судин та силу серцевих скорочень, запобігає агрегації тромбоцитів, зменшує згортання крові, регулює швидкість апоптозу, є нейромедіатором, стимулює продукцію деяких гормонів, зокрема інсуліну. NO активує гуанілатциклазу і стимулює швидке утворення цГМФ, який зумовлює зниження рівня іонів кальцію в цитозолі клітин, ослаблення зв'язку між актином і міозином, подальше зниження тонусу судин і вазодилатуючий ефект, що покращує кровотік [159, 160].

В печінці NO приймає участь у більшості метаболічних процесів. Зокрема, у досліджах *in vitro* показано здатність NO пригнічувати синтез протеїнів, а також регулювати гомеостаз глюкози, завдяки пригніченню індукованого глюкогоном глюконеогенезу. Крім того, ймовірно, NO приймає участь у регуляції міжклітинної взаємодії в печінці, неспецифічній імунній відповіді, а також у процесах утворення та секреції жовчі [161]. Утворення NO в організмі людини і тварин відбувається в результаті п'яти-електронного окиснення амінокислоти L-аргініну під дією цитохром P450-подібних гемопротеїнів – NO-синтаз (NOS) [162]. У печінці за фізіологічних умов виявлено обидві ізоформи NOS – кальцій-залежну, ендотеліальну (eNOS) і кальцій-незалежну, індукцибельну (iNOS) [163]. За даними Бабак О. Я. та співавторів, NO, що утворюється під впливом eNOS, проявляє в основному

захисні функції в печінці у зв'язку з регуляцією току крові та взаємодією клітин, а NO, що утворюється під впливом iNOS, може проявляти як захисні, так і ушкоджувальні ефекти на гомеостаз печінки [164]. Є дані, що при хронічних захворюваннях печінки спостерігається значне підвищення активності iNOS в зонах цирозу [165, 166, 167].

Порівняно з іншими органами, які експресують iNOS, печінка унікальна тим, що в ній відбувається синтез сечовини і локалізується ензим фенілаланінгідроксилаза, яка конкурує з iNOS за кофактор тетрагідробіоптерин (BH₄). В циклі сечовини синтезується аргінін з аміаку і орнітину. Невідомо, де відбувається «витік» цієї амінокислоти із циклу сечовини, яка згодом перетворюється на субстрат для iNOS гепатоцитів. За відсутності аргініну продукція NO у печінці продовжується, оскільки в гепатоцитах містяться ендогенні джерела даної амінокислоти [164].

Клінічні спостереження показали, що L-орнітин-L-аспартат має суттєвий вазоактивний ефект і здатний покращувати кровотік у серцевому м'язі, печінці, підшлунковій залозі та, можливо, інших органах. Вазодилатуючі властивості L-орнітин-L-аспартату, ймовірно, обумовлюють і його ефективність при портальній гіпертензії [168]. Найвірогіднішим біохімічним механізмом, який може пояснити подібну дію, є генерування NO з L-аргініну, вміст якого при введенні L-орнітин-L-аспартату зростає. У присутності кисню та NO-синтази L-аргінін перетворюється на цитрулін, при цьому утворюється сигнальна молекула NO [168], що зумовлює покращення мікроциркуляції в печінці [169]. Господарський І.Я. та співавтори також відзначили нормалізацію печінкової гемодинаміки за використання L-орнітин-L-аспартату [170]. На думку дослідників зміни з боку судинної системи пов'язані з особливостями обміну орнітину в орнітиновому циклі, що в процесі біотрансформації аміаку в сечовину впливає на кількість аргініну і призводить до фізіологічного та сталого його збільшення, що змінює рівень NO та дає змогу покращити мікроциркуляцію.

Введення LOLA зумовлює накопичення L-глутамату та L-аргініну, що в свою чергу збільшує активність NOS з наступним посиленням печінкової

мікроперфузії [171]. Цей механізм був підтверджений і у пацієнтів із цирозом печінки [172], і на експериментальній моделі хронічної печінкової недостатності [157]. NO, що продукується завдяки eNOS, виявляє захисні властивості при пошкодженні печінки за допомогою регуляції діаметра синусоїдів, запобігання адгезії нейтрофілів, інгібування агрегації та адгезії тромбоцитів та видалення активних форм кисню [173]. Значимість NO в печінковій мікроциркуляції підтверджується тим фактом, що введення інгібіторів eNOS знижує перфузію мікросудин і посилює ішемічно-реперфузійне ушкодження, у той час як додавання L-аргініну (попередник NO) або донорів NO покращує мікроциркуляторний статус і зводить до мінімуму ушкодження печінки після ішемічно-реперфузійного ушкодження [174].

1.2.5 L-орнітин і синтез поліамінів

Не зважаючи на те, що основний механізм дії L-орнітин-L-аспартату (LOLA) пов'язують із детоксикацією аміаку через синтез сечовини в орнітиновому циклі варто вказати, що LOLA включається й до інших, «неорнітинових», шляхів метаболізму, зокрема, підвищує продукцію поліамінів – сперміну, спермідину та путресцину, біологічно активних речовин здатних регулювати біосинтез РНК, ДНК та протеїнів, та збільшувати ступінь агрегації полісом, що в цілому має стимулюючий ефект на протеїнсинтезуючу функцію печінки та може впливати на ріст і диференціацію клітин [175]. Оскільки поліаміни входять до складу хроматину і беруть участь в реплікації ДНК, їх концентрація значно збільшується в період активного поділу клітин та росту тканин, саме завдяки цьому LOLA, ймовірно, впливає на регенераторний потенціал гепатоцитів [170].

Поліаміни (путресцин, спермідин і спермін) – це позитивно заряджені багатофункціональні полікатіони (алкіламіни), що є похідними амінокислот і і присутні в клітинах ссавців у мілімолярних концентраціях [176]. За даними М.П.Прилуцького та співавторів поліаміни – це низькомолекулярні органічні ендogenousні полікатіони, що містять 2 або більше аміногруп. Так путресцин

містить 2 аміногрупи, а спермідин та спермін відповідно 3 та 4 [177]. Фізіологічно активними є спермідин і спермін, а путресцин використовується в основному як попередник поліамінів [177]. Внутрішньоклітинні рівні поліамінів залежать від активності їх біосинтетичних та катаболічних ензимів, а також від статусу поліамінних транспортерів. За даними авторів рівень поліамінів у здорових людей перебуває на рівні наномолярних концентрацій (у середньому 4–5 нМ). Так, концентрація сперміну в крові здорових чоловіків становить $(5,40 \pm 1,23)$ нМ/мл, а в жінок – $(7,07 \pm 1,03)$ нМ/мл, спермідину – $(7,54 \pm 1,32)$ нМ/мл у чоловіків та $(9,95 \pm 1,11)$ нМ/мл у жінок, а путресцину $(6,02 \pm 1,15)$ нМ/мл у чоловіків та $(8,32 \pm 1,20)$ нМ/мл у жінок [177, 178].

Важливо відзначити, що ці низькомолекулярні високозаряджені молекули беруть участь у багатьох фундаментальних процесах клітинного росту і виживання, включаючи підтримку синтезу протеїнів і нуклеїнових кислот, стабілізацію структури хроматину, диференціювання, апоптоз, захист від оксидативного пошкодження і депуринізацію нуклеїнових кислот та міжклітинну комунікацію. Поліаміни незамінні для диференціювання клітин та функціонують, утворюючи електростатичні зв'язки з негативно зарядженими макромолекулами, щоб опосередкувати низку біологічних процесів. До них відносяться синтез та стабільність ДНК, реплікація, транскрипція та трансляція, біогенез рибосом, модуляція іонних каналів і рецепторів та фосфорилування протеїнів. Виснаження пулу поліамінів призводить до цитостазу [179, 180].

Першим ензимом, що лімітує швидкість поліамінового шляху метаболізму є орнітиндекарбоксілаза (ODC1), яка каталізує декарбоксілювання та перетворення орнітину, продукту циклу сечовини, на первинний поліамін путресцин (1,4-діамінобутан) (рис. 1.4). Путресцин є попередником для синтезу спермідину і сперміну і надалі перетворюється на ці більш поширені поліаміни за допомогою двох амінопропілтрансфераз – спермідинсинтази (SRM) і спермінсинтази (SMS) [180]. Варто вказати, що для біосинтезу спермідину і сперміну необхідні також метіонін і аденозинтрифосфат.



Рисунок 1.4 – Регулювання поліамінів путресцину, спермідину і сперміну біосинтетичними ензимами і катаболічними ензимами [181]

Метіонін, перш ніж бути використаним для синтезу спермідину і сперміну, взаємодіє з аденозинтрифосфатом, утворюючи S-аденозил-L-метіонін (SAM). Другим ензимом, що лімітує швидкість поліамінового шляху метаболізму, є аденозилметіоніндекарбоксилаза (AMD1), яка декарбоксилює S-аденозилметіонін (SAM), щоб забезпечити донора амінопропілу для синтезу спермідину і сперміну [181]. Як ODC1, так і AMD1 строго контролюються на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях і мають один із найкоротших періодів напіврозпаду серед усіх ензимів ссавців [182]. Крім того, оборот ODC1 регулюється антизимидами 1,2,3 (OAZ1, OAZ2, OAZ3), які, у свою чергу, контролюються інгібіторами антизимів 1 та 2 (AZIN1 та AZIN2) [181]. Антизими ініціюють деградацію ODC1, зв'язуючи мономер ODC1, інгібуючи його активність та направляючи ODC1 до протеасоми 26S для деградації; OAZ1 найбільш ефективно стимулює деградацію ODC1. Експресія антизиму також індукується за механізмом зворотного зв'язку. Збільшення внутрішньоклітинних рівнів поліамінів стимулює +1 зсув рамки зчитування рибосомами під час трансляції антизимої мРНК, збільшуючи експресію

повнорозмірного протеїну. У відповідь на збільшення внутрішньоклітинних поліамінів антизими негативно регулюють транспорт поліамінів, сприяючи секреції поліамінів та інгібуючи поглинання, в той час як деградація антизимів убіквітіновим шляхом також інгібується [183]. Катаболізм поліамінів дозволяє повторно використовувати поліаміни, оскільки спермін знову перетворюється на спермідин, а спермідин – на путресцин. Катаболізм поліамінів залежить від трьох ензимів: спермін/ спермідин N1-ацетилтрансферази (SAT1), поліамінооксидази (PAOX) та сперміноксидази (SMOX) [181, 183, 184]. SAT1, сильно індукований цитозольний ензим, ацетилює спермін і спермідин (каталізує перенесення ацетильної групи ацетил-КоА або на спермідин, або спермін), які потім видаляються з клітини, або слугують субстратом для пероксисомального ензиму PAOX. PAOX переважно каталізує окиснення N1-ацетилсперміну/спермідину, що продукується під впливом ензиму SAT1, а не сперміну або спермідину, тоді як SMOX, що є цитозольним ензимом каталізує окиснення сперміну безпосередньо до спермідину, без ацетилювання та генерує гідроген пероксид і 2-амінопропанол [182]. В основному PAOX конститутивно експресується і залежить від SAT1, оскільки її швидкість обмежена доступністю ацетилюваного спермідину/сперміну. Таким чином, SAT1, ензим, що обмежує швидкість катаболізму поліамінів, значною мірою регулюється на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях і є основним гравцем, що регулює поліаміновий шлях метаболізму [181, 184].

Поліаміни пов'язані з різними біологічними процесами, насамперед – це важливі ендогенні регулятори проліферації, росту, диференціювання та запрограмованої загибелі клітин [179,184]. Більш того, путресцин, спермідин і спермін володіють протизапальними та антиоксидантними властивостями, а отже, можуть бути залучені до захисту клітин організму при старінні та захворюванні. З іншого боку, поліаміни при високих концентраціях також можуть бути токсичними для клітин та можуть сприяти загибелі клітин, головним чином за допомогою окиснювальних механізмів [177]. Різноманітні порушення метаболізму поліамінів відіграють важливу роль у таких

патологічних процесах, як дисдиференціація та малігнізація, ріст та прогресія пухлин, запалення, імунологічна реактивність тощо. У більшості ракових клітин спостерігається висока активність ензимів синтезу поліамінів та високі рівні путресцину і спермідину, що сприяє проліферації та злоякісній трансформації клітин [185, 186, 187]. Ряд авторів вказують на те, що рівень біогенних поліамінів може бути одним з факторів регуляції клітинного росту, проліферації, тканинної регенерації та малігнізації. Тому вони розглядаються як внутрішньоклітинні маркери росту та проліферації. Причому відомо, що спермін переважно слугує маркером диференціації, а спермідин – маркером проліферації [188, 189, 190, 191].

Аналіз літератури, наші клінічні спостереження, а також недостатньо вирішені питання щодо ефективності фармакотерапії уражень печінки свідчать про необхідність більш глибокого вивчення препаратів амінокислотного складу як протекторних засобів при ураженнях печінки різного генезу.

Підсумовуючи результати огляду наукової літератури, ми не виявили достатньо глибокої наукової інформації щодо обґрунтування точок прикладання дії препаратів амінокислотного складу з включенням орнітину на систему L-аргінін – нітроген оксид. Практично немає даних щодо проведення експериментальних досліджень щодо вивчення ролі поліамінів в механізмі дії орнітин-вмісних лікарських засобів, а саме LOLA. Це вказує на необхідність подальших досліджень щодо обґрунтування механізм дії лікарських засобів на основі знань патогенезу гепатиту та цирозу, що дозволить підвищити ефективність та знизити смертність пацієнтів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Відбір тварин для дослідження

З метою реалізації поставлених в дисертаційній роботі завдань експериментальні дослідження проведено на 84 білих статевозрілих нелінійних щурах-самцях, які утримувалися на стандартному раціоні віварію ТНМУ. Умови утримання тварин відповідали правилам, які рекомендовані Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, що використовуються для наукових цілей (Страсбург, 1986).

Вибір для дослідження самців цього виду тварин обумовлений тим, що у моделюванні уражень печінки важливу роль відіграє рівень гормонів пролактину та естрогенів щодо розвитку синдрому холестазу [192, 193]. Крім того, вказані гормони здатні впливати на концентрацію кінцевих продуктів метаболізму NO нітритів і нітратів [194], що було б обмеженням при вивченні NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату. Відомо, що існує взаємозв'язок між рівнем естрогенів та синтезом поліамінів [195], що в свою чергу могло б вплинути на досліджувані показники при вивченні впливу препарату на синтез поліамінів.

Експериментальних тварин, з вихідною масою 170-180 г, рандомізували методом випадкової вибірки. Всі піддослідні тварини були поділені на групи як наведено у таблиці 2.1. Кожна експериментальна група склала б особин, смертності тварин за даних експериментальних моделей не спостерігали.

Досліди проводили відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Комісією з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

порушень етичних норм при проведенні досліджень не виявлено (протокол № 72 від 6 січня 2023р.).

Таблиця 2.1 – Розподіл експериментальних тварин на групи за моделями ураження печінки та засобами корекції, що застосовувалися

Модель ураження печінки	Група	К-сть тварин
Гострий токсичний гепатит (3 та 7 доба)	Контроль	12
	Гепатит	12
	L-орнітину L-аспартат (LOLA)	12
	L-орнітину L-аспартат + N-нітро-L-аргінін (LOLA+L-NAME)	12
	L-орнітину L-аспартат+ D,L-альфа-дифторметилорнітин (LOLA+DFMO)	12
Цироз	Контроль	6
	L-орнітину L-аспартат (LOLA)	6
	L-орнітину L-аспартат + N-нітро-L-аргінін (LOLA+L-NAME)	6
	L-орнітину L-аспартат+ D,L-альфа-дифторметилорнітин (LOLA+DFMO)	6

Біохімічні дослідження крові та печінки проведено в Центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України та науково-дослідній лабораторії порівняльної біохімії та молекулярної біології Тернопільського національного педагогічного університету ім. В. Гнатюка. Морфологічні та імуногістохімічні дослідження виконано за технічною допомогою працівників кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судової медицини та імуногістохімічної лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.

Декапітацію тварин проводили під кетаміновим наркозом (внутрішньоочеревинне введення з розрахунку 75 мг/кг маси тіла тварини). Матеріалом для дослідження були печінка, сироватка крові.

Гострий токсичний гепатит моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням тетрахлорметану у розрахунку 2 г/кг маси тіла у вигляді 50 % олійного розчину на оливковій олії [196]. Контрольна група тварин отримувала ідентичний об'єм оливкової олії. Корируючі чинники речовини вводили відповідно протягом 2 та 6 діб інтраперитонеально, один раз на добу, щоденно. Дослідження проводили на 3 та 7 доби, що відповідає періодам виникнення вогнищ некрозу на фоні посиленого відкладання жиру та початку регенераторних процесів [197].

Цироз печінки моделювали за методикою, описаною К. Doi, Kurabe S. та співав. [198]. 50 % розчин тетрахлорметану вводили перорально двічі на тиждень протягом 12 тижнів з розрахунку 2 мл на кг маси тварини. Корируючі агенти вводили протягом 10 діб після закінчення моделювання досліду. Декапітацію тварин проводили під кетаміновим наркозом через 24 год після останнього введення засобів корекції. Для дослідження використовували сироватку крові, гомогенат печінки, мітохондрії гепатоцитів, фрагменти тканини печінки для гістологічного дослідження. Корируючі чинники вводили інтраперитонеально, один раз на добу, щоденно відповідно до моделі ураження та її корекції. Дози корируючих речовин: L-орнітину L-аспартат (LOLA) – препарат “ГЕПА-МЕРЦ” амп. 0,5 % 10 мл, виробник Мерц Фарма ГмбХ і Ко., вводили в дозі 200 мг/кг маси тварини. N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME) (“Oldrich. Chem. Co.”, Англія) вводили по 10 мг/кг маси щура у вигляді 1 % водного розчину, D, L - α дифторметилорнітин Difluoromethylornithine DFMO (“Sigma”, США) – вводили по 25 мг/кг маси щура [199].

Доза LOLA, а саме 200 мг/кг для внутрішньоочеревинного введення щурам, ґрунтується на перерахунку середньотерапевтичної дози для парентерального введення препарату пацієнтам з цирозом за методикою Ю. Р. Риболовлева та узгоджується із дозами, які використовували інші дослідники [127]. Підбір доз неспецифічного блокатора синтезу оксиду азоту N-нітро-L-аргінін метиловий ефір (L-NAME; «Oldrich. Chem. Co.», Англія), який вводили по 10 мг/кг у вигляді 1%-го водного розчину [163] та інгібітора синтезу

поліамінів D, L- α -Difluoromethylornithine (DFMO; «Cayman chemical») [199, 200] базувався на аналізі літературних даних. Вибір L-NAME серед інших неселективних блокаторів NOS базувався на тому, що він, завдяки ліпофільній структурі, добре проникає через мембрани [201]. У середині клітини L-NAME піддається деестерифікації і стає еквівалентом L-нітро-L-аргініну – потужного інгібітора всіх ізоформ NOS з преференцією до cNOS [202].

2.2 Визначення показників цитолізу та холестазу

Визначення активності аланін амінотрансферази, аспартат амінотрансферази, лужної фосфатази, гама-глутамілтранспептидази проводили у сироватці крові.

2.2.1 Визначення активності аланінамінотрансферази

Визначення активності АлАТ (КФ 2.6.1.2.) проводили, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб» за методом Райтмана–Френкеля.

Принцип методу: в результаті амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією АлАТ, утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідразону піровиноградної кислоти, який в лужному середовищі дає коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти.

Активність АлАТ у сироватці крові виражали у Од/л.

2.2.2 Визначення активності аспартатамінотрансферази

Визначення активності АсАТ (КФ 2.6.1.1.) проводили за методом Райтмана–Френкеля, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб».

Принцип методу. В результаті амінування 2-оксоглутарової кислоти

L-аспарагіноювою кислотою, яке відбувається під дією АсАТ, утворюються L-глутамінова та щавелевооцтова кислоти, остання самовільно декарбоксілюється з утворенням піровиноградної кислоти. Визначення ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-динітрофенілгідрозону піровиноградної кислоти, який в лужному середовищі дає коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого пропорційна кількості утвореної піровиноградної кислоти. Активність АсАТ у сироватці крові виражали у Од/л.

2.2.3 Визначення активності лужної фосфатази

Для визначення активності (КФ 3.1.3.1) ЛФ використовували стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб».

Принцип методу. Лужна фосфатаза розщеплює 4-нітрофенілфосфат з утворенням 4-нітрофенолу. Окисне сполучення фенолу з 4-амінофеназоном утворює червоний барвник, інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна активності ферменту та визначається фотометрично. Активності ЛФ у сироватці крові виражали у Од/л.

2.2.4 Визначення активності гамма-глутамілтранспептидази

Для визначення активності ГГТ (КФ3 2.3.2.2.) використовували стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб».

Принцип методу. Гама-глутамілтрансфераза (ГГТ) каталізує перенесення γ -глутаміл групи від γ -глутаміл-3-карбоксі-4-нітроаніліду до гліцилгліцину, звільняючи 3-карбоксі-4-нітроанілін. Зміна абсорбції, вимірюної при довжині хвилі 405 (± 10) nm, пропорційна активності ГГТ. Активності ГГТ у сироватці крові виражали у Од/л.

2.2.5 Визначення вмісту загального білірубіну

Визначення вмісту загального білірубіну (ЗБ) у сироватці крові проводили, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб»

Принцип методу. Загальний білірубін перетворюється у кольоровий комплекс азобілірубину під впливом діазотованої сульфанілової кислоти у кислому середовищі. Інтенсивність кольору пропорційна концентрації білірубину у зразку. Вміст загального білірубину у сироватці крові виражали у мкмоль/л.

2.2.6 Визначення вмісту холестеролу

Визначення вмісту загального холестеролу (ЗХ) проводили, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб» за методом Ілька.

Принцип методу. Холестерол, при наявності оцтового ангідриду і суміші оцтової і сірчаної кислот, утворює сполуку зеленого кольору. Кількість холестеролу визначають за інтенсивністю забарвлення методом колориметрії. Вміст загального білірубину у сироватці крові виражали у мкмоль/л

2.3 Дослідження процесів вільнорадикального окиснення та стану антиоксидантної системи

Активність процесів пероксидного окиснення ліпідів досліджували у тканині печінки (вміст ТБК-активних продуктів та гідроперекисів ліпідів).

Відомо, що стан антиоксидантної системи відображає ступінь активності патологічного процесу в органах і може бути критерієм ефективності фармакокорекції. У тканині печінки визначали активність супероксиддисмутази (загальну, Cu-залежну та Mn-залежну фракції), каталази та глутатіон-S-трансферази, вміст відновленого глутатіону, у сироватці крові – загальну антиоксидантну активність, активність каталази, вміст церулоплазміну.

2.3.1 Метод визначення концентрації ТБК-активних продуктів у печінці

Принцип методу полягає у здатності ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) у реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [203]. Вважається, що за умов

стресу ці продукти, що містять альдегідну групу, здебільшого представлені малоновим диальдегідом, хоча глюкоза та інші відновні вуглеводи також дають цю реакцію. Для визначення 2 мл надосаду переносили в пробірки, додавали по 1,5 мл 0.7 мМ розчину ТБК у 0.1 М НСІ і поміщали проби на 20 хв в киплячу водяну баню. В якості контролю використовували проби, що містили замість надосадової речовини буферний розчин (рН 7,4).

Утворення ТБК-активних продуктів обчислювали за інтенсивністю поглинання забарвленого у рожевий колір комплексу при 532 нм проти контролю на реактиви за молярним коефіцієнтом екстинції комплексу $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Вміст виражали в гомогенаті печінки в мкмоль/кг.

2.3.2 Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів

Вміст ГПЛ визначали за методом [204], який ґрунтується на тому, що екстраговані гептан-ізопропіловою сумішшю гідропероксиди мають відповідний максимум поглинання при $\lambda = 232 \text{ нм}$.

До 0,2 мл 10 % гомогенату додавали 4 мл суміші гептан-ізопропанолу (1:1) і струшували 15 хв на лабораторному струшувачі АВ-30 с. Потім у пробірки додавали по 1 мл розчину НСІ (рН=2,0) і 2 мл гептану, інтенсивно струшували і після відстоювання та розшарування суміші (через 30 хв) відбирали гептановий шар і вимірювали його оптичну щільність на спектрофотометрі СФ-46 при $\lambda = 232 \text{ нм}$. Як контроль використовували пробу, яка містила 0,2 мл дистильованої води замість досліджуваного матеріалу. Розрахунок вмісту ГПЛ проводили у відносних одиницях за формулою:

$$C = 10 \times E \times V_1 / V_2, \quad (2.1)$$

де E – оптична щільність гептанового шару проби,

V_1 – кінцевий об'єм гептанового екстракту (4 мл),

V_2 – об'єм досліджуваного матеріалу (2 мл).

Вміст ГПЛ виражали в умовних одиницях екстинкції (ум.од.): в гомогенаті печінки –од./г печінки.

2.3.3 Визначення активності супероксиддисмутази

Супероксиддисмутазну (СОД) активність (КФ 1.15.1.1) вимірювали спектрофотометрично за зниженням швидкості фотовідновлення нітротетразолію синього у присутності феназинметасульфату і рибофлавіну (у якості відновника) [205]. Нітротетразолій синій конкурує з СОД за супероксид-аніон, тому в присутності СОД у системі утворюється менша кількість кольорового комплексного продукту. Інкубаційна суміш містила 0.2 mM НТЗС, 0.2 mM EDTA, 0.03 mM рибофлавіну, 200 μ L TEMED/100 мл розчину). Інкубація здійснювалася при 37°C 15 хв. Фотоіндукцію реакції здійснювали у блоці, вистеленому алюмінієвою фольгою за допомогою флуоресцентної лампи 15 W. Для визначення активності Mn-СОД супернатант витримували попередньо 60 хв при 0 оС в присутності 5 mM KCN, чим досягали повного пригнічення активності Cu,Zn-СОД.

Розрахунок СОД активності.

$$A = (D_k - D_d) \times 2 \times d / D_k / C \text{ prot (ум. од./}\cdot\text{мг}^{-1} \text{ протеїнів)}, \quad (2.2)$$

де $(D_k - D_d)$ – різниця світлопоглинання між холостою і дослідною пробами,
 d – (600) розведення біологічного матеріалу.

Активність ензиму виражали в умовних одиницях (у.о.). За у.о. приймали активність ензиму, яка здатна викликати зниження оптичної густини в процесі відновлення нітротетразолію синього в дослідній пробі на 50 % в розрахунку на 1 мг розчинних протеїнів (Од / мг протеїнів).

2.3.4 Визначення активності каталази

Визначення активності каталази в сироватці крові. Каталазну активність (КФ 1.11.1.6) в крові визначали за методом [206]. Принцип методу базується на

здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс.

Реакцію розпочинали додаванням 0,1 мл плазми до 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню. Паралельно готували холосту пробу, в яку замість досліджуваного матеріалу вносили 0,1 мл дистильованої води. Через 10 хв реакцію зупиняли додаванням 1 мл 4 % молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при 410 нм проти контрольної проби, в яку замість пероксиду водню додавали 2 мл води. Каталазну активність виражали в каталах (кат) і розраховували за формулою:

$$A=(E_x-E_d)/V_{tk}, \quad (2.3)$$

де A – активність каталази у мкат/л (кг);

E_x і E_d – екстинкції холостої і дослідної проб;

V – об'єм внесеної проби (0,1 мл); t – час інкубації (600 с);

k – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, який дорівнює $22,2 \cdot 10^3 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Визначення активності каталази в печінці. Активність каталази (КФ 1.11.1.6) визначали у розчинній фазі гомогенату за методом Аєбі [207], який ґрунтується на зменшенні оптичної густини при 240 нм при розпаді H_2O_2 за впливу КАТ. Досліджувана суміш містила 15 мМ H_2O_2 , 50 мкг протеїну у 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 7,0 в загальному об'ємі 3,0 мл. Реакцію ініціювали додаванням супернатанту і вимірювали поглинання на спектрофотометрі при 240 нм з 60-секундним інтервалом. Каталазну активність обчислювали за мілімолярним коефіцієнтом світлопоглинання H_2O_2 при 240 нм ($\epsilon=0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) і виражали в мкмоль/(мг розчинного протеїну · хв).

2.3.5 Визначення концентрації церулоплазміну в плазмі крові

Концентрацію церулоплазміну визначали за методом, описаним у роботі [208]. Принцип методу: окиснення п-фенілендіаміну в присутності

церулоплазмину призводить до утворення забарвлених продуктів. Кількість церулоплазмину прямо пропорційна інтенсивності забарвлення.

Досліджували плазму крові без слідів гемолізу. В пробірки вносили по 0,1 мл плазми. В контрольну пробірку додавали 1 мл 0,5 % розчину гідроксиламіну солянокислого з метою інактивації ферменту. У всі пробірки додавали по 8 мл 0,4 М розчину ацетатного буферу (рН = 5,5) і по 1 мл п-фенілендіаміну. Пробірки закривали корками і витримували в термостаті при 37 оС протягом 1 год. Потім у кожен пробірку, крім контролю, додавали 1 мл гідроксиламіну солянокислого. Проби витримували 30 хв при 4 оС після чого визначали їх оптичну щільність проти контролю на спектрофотометрі СФ-46 при 530 нм. Розрахунок проводили за формулою:

$$C = E \times 875, \quad (2.4),$$

де С – концентрація церулоплазмину в мг/л плазми;

Е – екстинкція проби.

Концентрацію ЦП виражали в мг/л.

2.3.6 Визначення вмісту відновленого глутатіону

Принцип методу полягає у тому, що при взаємодії 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної) кислоти (реактив Елмана) з вільними SH-групами відновленого глутатіону відбувається утворення тіонітрофенільного аніону, кількість якого прямо пропорційна вмісту GSH [209].

До 0,5 мл 10 % гомогенату печінки додавали 1,3 мл дистильованої води, 0,2 мл 25 % сульфосаліцилової кислоти і центрифугували при 5000 об./хв протягом 10 хв. Отриманий центрифугат (0,5 мл) при додаванні 2,5 мл трис-НСІ буферу і 0,05 мл розчину Елмана змінював колір на жовто-зелений через 10 хв при кімнатній температурі. Покази знімали на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda = 412$ нм. Вміст GSH розраховували, виходячи з коефіцієнту молярної екстинкції для тіонітрофенільного аніону, який дорівнює $11400 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$, і виражали у ммоль/кг тканини печінки.

2.3.7 Загальна антиоксидантна активність

Загальну антиоксидантну активність гомогенату оцінювали з використанням АВТС (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазоліно-6-сульфонова кислоти) у модифікації. При інкубуванні АВТС з персульфатом калію утворюється відносно стабільний катіон-радикал АВТС⁺ з максимумом поглинання 414 нм у спектрі електромагнітного випромінювання. У присутності антиоксидантів (донорів гідрогену) гальмується утворення кольору пропорційно їх кількості. Генерацію радикалів здійснювали додаванням до 1 мл 4,9 мМ персульфату калію 1 мл 14 мМ АВТС та інкубацією 16 годин в темряві. Після інкубації доводили концентрацію розчину, щоб його оптична густина при 734 нм становила 0,7-0,8 і використовували для аналізу.

До утвореного розчину АВТС (1,9 мл АВТС) додавали 0,025 мл супернатанту 10% гомогенату у 50 мМ фосфатному буфері (рН 7,4). Реєстрували поглинання при 734 нм відразу (0 хв) та через 6 хвилин проти води. Як еталонний зразок (замість супернатанту) на відміну від оригінальної методики використовували аскорбінову кислоту концентрацією 50 мкг/мл (0,1 мл аскорбінової кислоти + 1,9 мл АВТС). Загальну антиоксидантну активність гомогенату (знешкодження радикалів) виражали у $\% \cdot \mu\text{mol АВТС} \times \text{g}^{-1}$

Загальну антиоксидантну АВТС-генеровану ємність у тканинах визначають за методом Re та ін. (1999) [210].

2.4 Визначення показників метаболізму

Оскільки нітрит-аніон є стабільним метаболітом оксиду азоту, то за його кількістю можна робити висновок про утворення оксиду азоту у тканинах організму [211]. Сечовина є кінцевим метаболітом оксиду азоту нітрит-редуктазним шляхом, тому може вказувати на стан орнітинового циклу та обміну пуринів [212], окрім того, так як ця сполука синтезується в основному печінкою, то відображає її синтезуючу функцію, а також є показником білкового обміну та рівня залишкового азоту в організмі.

2.4.1 Визначення вмісту нітрит-аніонів

Вміст нітрит-аніонів (NO^{2-}) у сироватці крові, гомогенатах печінки та нирок визначали високоспецифічним спектрофотометричним методом Гріна за даними кольорової реакції з реактивом Гріса [213].

Сироватку крові, 10 % гомогенат тканини печінки та нирок депротейнізували додаванням до 0,4 мл досліджуваного розчину 0,8 мл 0,5 н. розчину NaOH і 0,8 мл 10 % розчину сульфату цинку. Вміст пробірки перемішували протягом 30 с і центрифугували протягом 15 хв при 9000 об./хв. Після цього 1,5 мл надосадової рідини змішували з однаковим об'ємом реактиву Гріса (складається із суміші розчинів: 1 % сульфаніламід, 0,1 % нафтилендіаміну, 2,5 % фосфорної кислоти) і інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Абсорбцію розчину вимірювали при довжині хвилі 546 нм на спектрофотометрі. За стандарт використовували натрію нітрит.

Вміст нітрит-аніонів розраховували за формулою (2.5) :

$$C = C_{\text{ст}} \times D_1 / D_2, \quad (2.5)$$

де C – вміст нітрит-аніонів, мкмоль/л чи мкмоль/кг;

$C_{\text{ст}}$ – вміст нітрит-аніонів в стандартному розчині, мкмоль/л;

D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

D_2 – оптична густина стандартного розчину.

2.4.2 Визначення вмісту сечовини у сироватці крові

Рівень сечовини в сироватці крові визначали діацетилмонооксимним методом, використовуючи стандартний набір реактивів ТОВ «Спайнлаб».

Принцип методу полягає в тому, що сечовина утворює з діацетилмонооксимом у присутності іонів заліза і тіосемікарбазиду комплекс червоного кольору, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту сечовини в сироватці крові. Концентрацію сечовини в сироватці крові виражали у ммоль/л.

2.5 Визначення показників білкового обміну

2.5.1 Визначення вмісту загального білка у сироватці крові та печінці

Визначення вмісту загального білка у сироватці крові та гомогенатах печінки проводили за методом Лоурі [214].

Принцип методу. У лужному середовищі іони Cu^{2+} утворюють комплекс із пептидними зв'язками, переходячи у Cu^+ . Одновалентні іони міді реагують з реактивом Фоліна (фосфомолібденова кислота з фенолом), утворюючи нестабільний продукт, що переходить у синь молібдену, з максимумом поглинання при 750 нм. Збільшення поглинання при 750 нм пропорційно концентрації білка.

Вміст загального білка виражали у г/л та мг/г.

2.5.2 Визначення вмісту путресцину в печінці

Визначення вмісту концентрації путресцину гомогенатах печінки проводили спектрофотометричним методом [215].

Принцип методу. При взаємодії 2,4-динітро-1-фторбензолу з путресцином утворюється сполука жовтого кольору [216]. Вміст путресцину визначали за міною забарвлення при довжині хвилі 410 нм і виражали в нмоль/г.

2.6 Визначення показників окислювальних процесів у мітохондріях

2.6.1 Виділення мітохондрій печінки

Мітохондрії виділяли методом диференціального центрифугування 10 % гомогенату печінки, приготовленого у середовищі з 250 мМ сахарози, 10 мМ тріс-НСІ буферу та 10 мМ ЕДТА (рН = 7,4) [217].

Мітохондріальну фракцію отримували, центрифугуючи без'ядерний супернатант протягом 10 хв при 6500 g. Отриманий осад мітохондрій ресуспендували у середовищі виділення. Всі операції проводили на холоді. Для приготування розчинів використовували тільки бідистильовану воду.

2.6.2 Визначення активності сукцинатдегідрогенази

Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.99.1) – фермент класу оксидоредуктаз, є одним із важливих ферментів енергетичного обміну: у циклі трикарбонових кислот каталізує оборотне окислення бурштинової кислоти (сукцинату) до fumarової кислоти. Окислення 1 моля бурштинової кислоти призводить до синтезу 2 молей аденозинтрифосфату (АТФ). При цьому електрони від С₂ передаються в дихальний ланцюг на кофермент Q, що забезпечує окисне фосфорилування. Принцип методу визначення активності фермента полягає у відновленні фериціаніду калію, розчин якого має жовте забарвлення, до безбарвного фероціаніду калію сукцинатом під дією СДГ. Активність ферменту пропорційна кількості відновленого фериціаніду [218].

До 1 мл 0,1 М фосфатного буферу додавали по 0,1 мл розчинів бурштинової кислоти, ЕДТА, азиду натрію, дистильованої води і 0,5 мл суспензії мітохондрій. Проби інкубували 5 хв за кімнатної температури. Реакцію запускали додаванням 0,1 мл розчину фериціаніду калію. Проби знову інкубували за температури +30 °С протягом 15 хв. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 20 % трихлороцтової кислоти. У контрольні проби ТХО кислоту додавали перед внесенням суспензії мітохондрій. Після центрифугування надосадову рідину фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при 420 нм проти контролю. Активність ферменту розраховували, виходячи з коефіцієнту молярної екстинції для фериціаніду калію і виражали в ммольях сукцинату/кг білка за хв.

2.6.3 Визначення активності цитохромоксидази

Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1) є найважливішим ферментом, що каталізує відновлення кисню в ланцюзі окисного фосфорилування.

Принцип методу визначення активності ферменту полягає в тому, що у результаті окислення диметил-п-фенілендіаміну за його інкубації з мітохондріями і цитохромом С утворюється сполука з пігментом червоного

кольору з максимумом поглинання при 510 нм. Кількість пігменту пропорційна цитохромоксидазній активності мітохондрій [219].

До 0,3 мл суспензії мітохондрій додавали 0,2 мл 0,04 % розчину цитохрому С і 0,5 мл дистильованої води. Проби інкубували при 37 °С протягом 2 хв, додавали по 0,1 мл 0,4 % розчину диметил-п-фенілендіаміну і інкубували протягом 3 хв, потім охолоджували і додавали чотирьохкратний об'єм суміші етилового спирту з тетрахлорметаном (3:1). Після центрифугування надосадову рідину фотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при 510 нм проти контролю. Розрахунок проводили за калібрувальним графіком, цитохромоксидазу активність виражали у ммоль диметил-п-фенілендіаміну/кг білка.

2.7 Дослідження стану ендогенної інтоксикації

Враховуючи, що у період відновлення після гіпоксії чи ішемії відбувається накопичення не знешкоджених печінкою токсичних продуктів катаболізму білків, ендо- та екзотоксинів, ми визначали рівень середньо-молекулярних пептидів у сироватці.

2.7.1 Визначення вмісту молекул середньої маси

Принцип методу полягає в осадженні білків під впливом трихлороцтової кислоти. У надосадовій рідині залишаються білки, які, в залежності від будови, визначаються при різній довжині хвилі. Визначення вмісту молекул середньої маси проводили згідно методики [220], в модифікації [221]. З сироватки крові виділяють кислоторозчинну фракцію, яку отримували шляхом додавання до 0,2 мл сироватки 1,8 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти. Наступне центрифугування проводили при 3000 об/хв упродовж 30 хв. Виділену фракцію в об'ємі 0,5 мл розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:10 і визначали оптичну густину при довжині хвилі 254 нм (визначаються ланцюгові амінокислоти) та 280 нм (визначаються ароматичні амінокислоти) проти

дистильованої води на СФ-26; результати виражали в одиницях, що чисельно дорівнювали показникам екстинкції.

2.7.2 Визначення активності глутатіон-S- трансферази

Глутатіон-S-трансферазу (GST) – активність [КФ 2.5.1.18] визначали спектрофотометрично методом Habig et al.,1974 [222] з використанням 1-хлоро-2,4-динітробензолу як субстрату. Реакційна суміш містила 2,1 мл 100 мМ Тріс буферу рН 7,4, 0,1 мл 1 мМ GSH (розчиненого безпосередньо перед дослідом в тріс буфері) та 0,05 мл 10 % гомогенату тканини. Реакцію ініціювали додаванням 0,1 мл 1 мМ 1-хлоро-2,4-динітробензолу в етанолі. Кінцевий вміст етанолу в пробі не повинен перевищувати 5 %. Утворення адукту S-2,4-динітрофеніл глутатіону реєстрували через 2 хв за збільшенням інтенсивності світлопоглинання при 340 нм проти контролю на реактиви, замість гомогенату вносили відповідний об'єм буферу. Активність ензиму обраховували за коефіцієнтом екстинкції комплексу ($9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) і виражали в нмоль (комплексу) / хв \times мг протеїну.

$$A = (D_{340} \times d \times E) / C \text{ протеїну}, \quad (2.6)$$

де D_{340} – показник світлопоглинання проби при 340 нм

E – мілімолярний коефіцієнт світлопоглинання ($\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d – розведення проби.

2.8 Морфологічні дослідження

2.8.1 Гістологічне дослідження печінки

Проводили гістологічне дослідження печінки кожної тварин усіх піддослідних груп. З печінки вирізали 2 – 3 шматочки для морфологічного аналізу та одразу фіксували у 10 % розчині формаліну. Процесинг тканини здійснювався в гістопроесорі закритого вакуумного типу Logos ONE. Готовий матеріал заливали в парафінові блоки. Гістологічні зрізи готували на мікротомі

Amos AMR-400 товщиною 4–5 мкм (не менше двох зрізів на кожне гістологічне скло), забарвлювали гематоксиліном та еозином [223].

Дослідження мікропрепаратів та фотореєстрацію проводили за допомогою мікроскопа Eclipse Si-E (Японія) з цифровою фотокамерою Sigeta M3CMOS 14000 при різних збільшеннях: $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$. При вивченні морфологічної організації печінки звертали увагу на зміни паренхіми та основних структурних елементів. Для ідентифікації еластичних (колагенових) волокон на гістологічних зрізах використовували забарвлення за Вейгертом та ван Гізон резорцин фуксином (за Вейгертом) [223].

2.8.2 Імуногістохімічне дослідження TNF- α , TGF- β

Для детекції фактору некрозу пухлин TNF- α використовували мишачі моноклональні первинні антитіла Anti-TNF alpha (Cat. No. ab220210, Abcam, США) та полімерну систему детекції Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США).

Для детекції трансформуючого фактору росту TGF- β використовували рекомбінантні кролячі моноклональні первинні антитіла Anti-TGF beta 1 antibody (Cat. No. ab215715, Abcam, США) та полімерну систему детекції Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США).

2.9 Статистичний аналіз результатів дослідження

Для статистичної обробки результатів застосовували загальноприйняті методи варіаційного аналізу із використанням програм Origin 7.5 (OriginLab Corporation, USA), Statistica 10 (StatSoft, USA) та Microsoft Excel XP (USA), оцінюючи достовірність на рівні значущості не більше 5 % ($p \leq 0,05$). Для визначення нормальності та гомогенності дисперсії використовували критерій Шапіро-Уїлка та тест Левайна. За умови підтвердження нормального розподілу та гомоскедастичності вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. Дані представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середня величина, а

m – стандартне відхилення середньої величини. Відмінності між середніми величинами вважали достовірними за вірогідності альтернативної гіпотези не менше, ніж 0,95. В інших випадках використовувався аналіз Краскела-Уолеса з апостеріорними попарними тестами Манна-Уїтні. У рисунках і таблицях основної частини дисертації рівень значимості вказували тільки для достовірних результатів.

РОЗДІЛ 3
ВИВЧЕННЯ РОЛІ СИСТЕМИ NO ТА СИНТЕЗУ ПОЛІАМІНІВ
У МЕХАНІЗМІ ДІЇ L-АРГІНІНУ L-АСПАРТАТУ ПРИ
ГОСТРОМУ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ

3.1 Вивчення ефективності L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті

3.1.1 Зміни морфофункціонального стану печінки при гострому токсичному гепатиті

Експериментальна модель із застосуванням CCl_4 , яку ми використовували для моделювання гепатиту у щурів, відтворює основні біохімічні й гістопатологічні зміни, характерні для гострого ураження печінки в людей [224].

У таблиці 3.1 наведені дані вимірювання маси тіла та активності амінотрансфераз у щурів з токсичним гепатитом без та з лікуванням LOLA на 3 та 7 доби дослідження.

Таблиця 3.1 – Маса печінки та активність АЛТ і АСТ у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
Маса печінки	0,028 ± 0,001	0,047 ± 0,002***	0,033 ± 0,0004\$\$\$	0,028 ± 0,001	0,046 ± 0,002***	0,038 ± 0,001§
АЛТ (ОД/л)	81,88 ± 1,79	149,67 ± 4,09***	110,65 ± 5,76§§	75,75 ± 1,84	129,00 ± 2,14***	98,02 ± 2,73\$\$\$
АСТ (ОД/л)	105,83 ± 2,24	440,83 ± 9,40***	216,78 ± 12,64\$\$\$	105,35 ± 2,02	417,15 ± 6,12***	205,00 ± 7,05\$\$\$
Примітка 1. ***p<0,001 проти групи контролю; §p<0,05, §§p<0,01, \$\$\$p<0,001 проти групи гепатиту.						
Примітка 2. АЛТ – аланінамінотрансфераза, АСТ – аспаратамінотрансфераза						

Через 3 доби після моделювання токсичного гепатиту спостерігалось суттєве збільшення маси печінки у щурів на 67,46 % із $(0,028 \pm 0,001)$ г у контрольній групі до $(0,047 \pm 0,002)$ г у тварин з гепатитом. Через 7 діб маса печінки у щурів з гепатитом залишалася достовірно вищою на 66,67 % – $(0,046 \pm 0,002)$ г у групі тварин з гепатитом проти $(0,028 \pm 0,001)$ г у контрольній групі.

При лікуванні тварин за допомогою LOLA маса печінки була вірогідно нижчою на 30,74 % і на 18,18 % через 3 і 7 діб, відповідно, у порівнянні з нелікованими щурами з гепатитом.

При ушкодженні печінки збільшується гепатоцелюлярна проникність, тому АЛТ і АСТ вивільняються і проникають у плазму [225], у зв'язку із чим підвищена активність цих ферментів вважається одним із маркерів розвитку синдрому печінкового цитолізу. У щурів із змодельованим гепатитом активність амінотрансфераз значно зросла через 3 доби: активність ферменту АЛТ вірогідно збільшилася на 82,78 % із $(81,88 \pm 1,79)$ ОД/л у контрольній групі до $(149,67 \pm 4,09)$ ОД/л у групі гепатиту, а активність АСТ перевищувала показники щурів із контрольної групи у більш, ніж 4 рази: $(440,83 \pm 9,40)$ ОД/л проти $(105,83 \pm 2,24)$ ОД/л.

Через 7 діб після моделювання токсичного гепатиту активність аміно-трансфераз залишалася суттєво вищою: АЛТ – на 70,30 %: $(129,00 \pm 2,14)$ ОД/л у групі гепатиту проти $(75,75 \pm 1,84)$ ОД/л у контрольній групі, і АСТ – у 4 рази: $(417,15 \pm 6,12)$ ОД/л у групі гепатиту проти $(105,35 \pm 2,02)$ ОД/л у контрольній групі.

Однак, фармакологічна корекція за допомогою LOLA достовірно запобігала зростанню активності амінотрансфераз як на 3 добу токсичного гепатиту, так і через 7 діб після його моделювання, що свідчить про здатність препарату запобігати цитолізу. Таким чином, при застосуванні LOLA показники АЛТ та АСТ залишалися на 26,07 % та 50,82 % нижчими у порівнянні із показниками тварин з нелікованим гепатитом через 3 доби: $(110,65 \pm 5,76)$ ОД/л та $(216,78 \pm 12,64)$ ОД/л, відповідно.

На 7 добу експерименту у пролікованих тварин активність АЛТ ($98,02 \pm 2,73$) ОД/л та АСТ ($205,00 \pm 7,05$) ОД/л була нижчою на 24,02 % і 50,86 %, відповідно, у порівнянні із щурами, яким не вводили препарат.

Отже, препарат LOLA проявляє протективні властивості у гепатоцитах, які піддаються ураженню тетрахлорметаном, зберігаючи їх цілісність та попереджаючи вивільнення амінотрансфераз, запобігаючи, таким чином, їхній надмірній активності у плазмі, і відповідно, розвитку синдрому цитолізу.

Внаслідок запалення, що виникає в результаті токсичного ураження печінки, відбувається набрякання гепатоцитів, що призводить до оклюзії жовчних проток та, як наслідок, перевантаження гепатоцитів речовинами, екскреція яких стає неможливою, у зв'язку із чим вони потрапляють у системний кровотік. В результаті цих патологічних процесів розвивається внутрішньопечінковий холестаза [226].

Зміни показників холестазау, таких як активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ, у щурів із CCl_4 -індукованим гепатитом без та з лікуванням LOLA на 3 та 7 доби дослідження відображені у таблиці 3.2.

Моделювання тетрахлорметанового гепатиту сприяло розвитку вираженого холестазау, внаслідок чого уже через 3 доби різко зростала активність ЛФ з ($197,20 \pm 10,93$) ОД/л у групі контролю до ($662,45 \pm 18,19$) ОД/л у групі гепатиту (у понад 3 рази) та ГГТ з ($1,00 \pm 0,09$) ОД/л у групі контролю до ($5,15 \pm 0,38$) ОД/л у групі гепатиту – у понад 5 разів. На 7 добу після індукування патології активність ЛФ ($336,17 \pm 10,09$) ОД/л і ГГТ ($3,3 \pm 0,16$) ОД/л все ще залишалася підвищеною на 72,63 % і у 3 рази, відповідно. Лікування за допомогою LOLA через 3 доби сприяло зниженню ЛФ у 2,79 рази та ГГТ – у 2,67 рази. Висока ефективність препарату спостерігалася і через 7 діб експерименту, оскільки активність ферментів залишалася достовірно нижчою на 21,86 % для ЛФ і на 44,95 % – для ГГТ порівняно із тваринами, що не отримували лікування.

Холестаза сприяє зростанню концентрації всіх складових жовчі, в тому числі, холестеролу і білірубину [226]. На третю добу тетрахлорметанового

ураження печінки рівень ЗБ зростав у 4 рази з $(2,98 \pm 0,22)$ ммоль/л у групі контролю до $(12,77 \pm 1,01)$ ммоль/л у тварин з гепатитом, а ЗХ – на 82,65 % до $(2,09 \pm 0,10)$ мкмоль/л порівняно із контрольною групою $(1,14 \pm 0,03)$ мкмоль/л.

Таблиця 3.2 – Активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при застосуванні LOLA

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
ЛФ (ОД/л)	$197,2 \pm 10,93$	$662,45 \pm 8,19^{***}$	$237,32 \pm ,17^{§§§}$	$194,73 \pm 5,88$	$336,17 \pm 10,09^{***}$	$262,68 \pm 0,06^{§§}$
ГГТ (ОД/л)	$1,00 \pm 0,09$	$5,15 \pm 0,38^{***}$	$1,93 \pm 0,31^{§§§}$	$1,03 \pm 0,08$	$3,3 \pm 0,16^{***}$	$1,82 \pm 0,19^{§§}$
ЗБ (ммоль/л)	$2,98 \pm 0,22$	$12,77 \pm 1,01^{***}$	$5,84 \pm 0,47^{§§§}$	$2,50 \pm 0,31$	$6,83 \pm 0,18^{***}$	$4,06 \pm 0,34^{§§§}$
ЗХ (мкмоль/л)	$1,14 \pm 0,03$	$2,09 \pm 0,10^{***}$	$1,85 \pm 0,19^{NS§}$	$1,09 \pm 0,04$	$1,89 \pm 0,05^{***}$	$1,42 \pm 0,07^{§§}$
Примітка 1. ***P<0,001 проти групи контролю; §§P<0,01, §§§P<0,001, NS§P>0,05 проти групи гепатиту.						
Примітка 2. ЛФ – лужна фосфатаза, ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза, ЗБ – загальний білірубін, ЗХ – загальний холестерол.						

Дослідження рівнів цих показників на 7 добу гепатиту свідчить про підвищення ЗБ на 173,55 %, а ЗХ – на 73,70 % порівняно з контролем.

Лікування, яке здійснювали за допомогою LOLA, сприяло зниженню концентрації ЗБ на 54,30 % до $(5,84 \pm 0,47)$ ммоль/л та на 40,51 % до $(4,06 \pm 0,34)$ ммоль/л через 3 і 7 діб, відповідно. У той же час достовірного зниження ЗХ під впливом LOLA на 3 добу не виникало, однак, на 7 добу його рівень $(1,42 \pm 0,07)$ мкмоль/л був достовірно нижчим на 24,82 %, у порівнянні з нелікованими щурами.

Отже, при гострому токсичному гепатиті лікування за допомогою LOLA сприяє кращому відновленню морфофункціонального стану печінки, запобігаючи розвитку таких патологічних станів як синдром цитолізу та синдром внутрішньопечінкового холестазу.

3.1.2 Стан системи ліпопероксидації та метаболічних процесів у печінці при гострому токсичному гепатиті

Печінка виконує численні біохімічні функції. Вона є місцем метаболізму вуглеводів, жирів і білків, де відбувається їх синтез та розпад. Метаболізм у печінці зазвичай призводить до детоксикації потенційно шкідливих сполук, що потрапляють в організм або утворюються в результаті біотрансформації різноманітних речовин [227].

При гострому ураженні печінки її детоксикаційна функція різко знижується внаслідок масивного некрозу гепатоцитів, що робить неможливою елімінацію токсичних іонів амонію з наступним розвитком гіперамоніємії та розвитком енцефалопатії [1].

У таблиці 3.3 наведені показники метаболічної та синтезуючої функції печінки, а саме: концентрація сечовини, загального білка у крові і печінці та NO₂- у сироватці і печінці у щурів з токсичним гепатитом та за умови корекції на 3 та 7 доби дослідження.

На 3 добу після моделювання токсичного гепатиту рівень сечовини у щурів був достовірно знижений майже вдвічі із $(6,45 \pm 0,10)$ ммоль/л у групі контролю до $(3,25 \pm 0,20)$ ммоль/л.

На 7 добу експерименту концентрація сечовини у щурів із CCl₄-індуковним гепатитом залишалася суттєво нижчою на 33,94 % порівняно із контролем.

Лікування LOLA сприяло підвищенню рівня сечовини у більш, ніж вдвічі, до $(7,15 \pm 0,11)$ ммоль/л на 3 добу дослідження, порівнюючи із нелікованими тваринами, та на 56,66 % на 7 добу до $(6,59 \pm 0,25)$ ммоль/л. Оскільки препарат посилює синтез сечовини у печінці, він може слугувати потужним засобом для попередженні розвитку печінкової енцефалопатії [228].

Майже всі білки сироватки крові синтезуються гепатоцитами в фізіологічних умовах. При пошкодженні печінки цей процес може бути порушений [226]. Індукування токсичного гепатиту викликало пригнічення

білоксинтезуючої функції печінки, виклакаючи зниження концентрації загального білка на 24,01 % у крові та 25,14 % у печінці на 3 добу експерименту. На 7 добу з моменту ураження печінки її синтетична функція залишалася порушеною, оскільки рівні загального білка були нижчими на 13,50 % у крові та на 20,33 % у печінці порівняно з контролем.

Застосування LOLA виявилось ефективним у відновленні білоксинтезуючої функції печінки та сприяло збільшенню концентрації загального білка на 3 добу дослідження і в крові на 26,20 % до $(61,9 \pm 0,69)$ г/л, і в печінці на 17,47 % до $(118,98 \pm 2,85)$ мг/г. Свою виражену фармакологічну активність препарат проявляв і через 7 діб після початку експерименту, зберігаючи вищими концентрації білка і в крові на 20,27 % – $(63,68 \pm 1,38)$ г/л, і в печінці на 23,49 % – $(131,46 \pm 3,28)$ мг/г порівняно з нелікованими щурами.

З метою вивчення ролі поліамінів визначали вміст путресцину у печінці (табл. 3.3), який є попередником спермідину та сперміну, та синтезується в організмі за участі ферменту орнітиндекарбоксілази [181]. Застосування LOLA сприяло зростанню рівня путресцину в печінці на 16,3 % та 23,3 % відповідно до термінів експерименту та порівняно з нелікованими тваринами. Отже, при CCl₄-індукованому гепатиті метаболізм у печінці різко пригнічується, що призводить до зниження вмісту загального білка в крові та печінці, а також зменшення концентрації сечовини. Введення LOLA сприяло збереженню синтезуючої функції печінки.

Оскільки NO₂⁻ існує як стабільний метаболіт оксиду азоту, його вміст може відображати NO-синтезуючу здатність тканин організму. При ураженнях печінки вміст NO₂⁻ часто зазнає суттєвих змін [229]. У зв'язку із цим нами було досліджено вміст аніона у тканинах печінки та у сироватці крові (табл. 3.3). Після моделювання гепатиту у щурів спостерігалось підвищення сироваткового вмісту нітрит-аніона (NO₂⁻) на 168 % з $(1,23 \pm 0,06)$ мкг/л до $(3,29 \pm 0,24)$ мкг/л через 3 доби та на 164,35 % з $(1,21 \pm 0,05)$ мкг/л до $(3,19 \pm 0,04)$ мкг/л – через 7 діб експерименту, порівняно з контролем. У той же час печінковий вміст NO₂⁻ був знижений на 13,5% із $(2,14 \pm 0,07)$ мг/л до

(1,85 ± 0,09) мг/л та на 30,95% із (1,95 ± 0,07) мг/л до (1,35 ± 0,03) мг/л на 3 і 7 добу, відповідно. Лікування препаратом LOLA підсилювало синтез NO₂- у сироватці на 23 % до (4,05 ± 0,23) мкг/л, і на 26,51 % до (2,35 ± 0,17) мг/л у печінці на 3 добу експерименту, проте на 7 добу – продукція NO₂- у сироватці зменшилася на 23,64 % до (2,43 ± 0,16) мкг/л, хоча його вміст у печінці підвищився на 21,99 % до (1,64 ± 0,05) мг/л.

Таблиця 3.3 – Зміни показників синтезуючої функції печінки у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при лікуванні LOLA на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
Сечовина (ммоль/л)	6,45 ± 0,10	3,25 ± 0,20 ^{***}	7,15 ± 0,11 ^{§§§}	6,36 ± 0,04	4,20 ± 0,13 ^{***}	6,59 ± 0,25 ^{§§}
Загальний білок у крові (г/л)	64,55 ± 1,37	49,05 ± 1,66 ^{***}	61,9 ± 0,69 ^{§§§}	61,22 ± 0,84	52,95 ± 1,12 ^{**}	63,68 ± 1,38 ^{§§§}
Загальний білок у печінці (мг/г)	135,30 ± 2,54	101,29 ± 4,92 ^{***}	118,98 ± 2,85 [§]	133,63 ± 2,37	106,46 ± 4,30 ^{**}	131,46 ± 3,28 ^{§§}
Путресцин у печінці (нмоль/мг)	180,01 ± 3,14	141,28 ± 4,92 ^{***}	164,38 ± 2,44 ^{§§}	178,33 ± 1,83	134,65 ± 5,56 ^{**}	166,05 ± 3,419 ^{§§}
NO ₂ - у сироват- ці (мкг/л)	1,23 ± 0,06	3,29 ± 0,24 ^{***}	4,05 ± 0,23 [§]	1,21 ± 0,05	3,19 ± 0,04 ^{***}	2,43 ± 0,16 ^{§§}
NO ₂ - у печінці (мг/л)	2,14 ± 0,07	1,85 ± 0,09 [*]	2,35 ± 0,17 [§]	1,95 ± 0,07	1,35 ± 0,03 ^{***}	1,64 ± 0,05 ^{§§}

Примітка. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001 проти групи гепатиту. NO₂- – нітрит-аніон.

Підвищення сироваткової концентрації NO₂- при її зниженні у тканинах печінки пов'язане із тим, що пригнічення активності eNOS у гепатоцитах веде до компенсаторного зростання активності iNOS у плазмі, яке, зокрема,

зумовлене і надмірним вивільненням прозапальних цитокінів, що є типовою ознакою гострого гепатиту [230].

При ураженні печінки різного генезу в організмі відбувається накопичення не знешкоджених токсичних продуктів катаболізму білків, ендотоксинів [231]. Щоб дослідити вплив LOLA на прояви ендотоксикозу, ми досліджували рівні молекул середньої маси (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Показники ендотоксикозу у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при лікуванні LOLA на 3 та 7 добу експерименту

Показник	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
MCM ₁ (Од/л)	0,28 ± 0,01	0,39 ± 0,01***	0,32 ± 0,01§§	0,28 ± 0,01	0,37 ± 0,01***	0,29 ± 0,01§§
MCM ₂ (Од/л)	0,42 ± 0,01	0,67 ± 0,02***	0,51 ± 0,01§§§	0,41 ± 0,01	0,65 ± 0,01***	0,49 ± 0,01§§§
GST (мкмоль/хв/мг)	1,81 ± 0,07	1,49 ± 0,03**	1,61 ± 0,03§	1,79 ± 0,05	1,13 ± 0,06***	1,23 ± 0,06 ^{NS§}
Примітка 1. ***P<0,001, **P<0,01***P<0,001 проти групи контролю; ^{NS§} P>0,05 §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001 проти групи гепатиту. Примітка 2. MCM – молекули середньої маси; GST – глутатіон-S-трансфераза.						

Вміст MCM₁ та MCM₂ вірогідно зростав під впливом CCl₄ на 3 добу експерименту на 38,32 та 60,65 % відповідно.

У динаміці їхня концентрація продовжувала збільшуватися і на 7 добу експерименту була вищою на 34,13 % та 59,26 %, зростаючи із (0,28 ± 0,01) Од/л у групі контролю до (0,37 ± 0,01) Од/л у групі гепатиту для MCM₁ та із (0,41 ± 0,01) Од/л у групі контролю до (0,65 ± 0,01) Од/л у групі гепатиту для MCM₂.

Лікування LOLA сприяло зниженню вмісту MCM₁ та MCM₂ на 16,88 % та 25,0 % до (0,32 ± 0,01) Од/л та (0,51 ± 0,01) Од/л на 3 день експерименту. Через

7 діб після початку експерименту утримувалася здатність препарату знижувати вміст МСМ₁ та МСМ₂, їх вміст був на 21,88 % та 23,51 % нижчим, порівняно з нелікованими щурами: (0,29 ± 0,01) Од/л та (0,49 ± 0,01) Од/л. Застосування препарату також викликало зростання активності ферменту, що приймає участь в процесах детоксикації, а саме глутатіон S-трансферази на 8,0 % до (1,61 ± 0,03) мкмоль/хв/мг на 3 добу експерименту, однак, на 7 добу достовірних змін у активності ферменту не відбувалося, і вона становила (1,23 ± 0,06) мкмоль/хв/мг.

Відомо, що вільні радикали та реактивні форми кисню відіграють вирішальну роль у розвитку та прогресуванні захворювань печінки. Оксидативний стрес разом із пригніченням антиоксидантного захисту викликають надмірне ремоделювання тканин органа [232]. Неконтрольовані реакції пероксидного окиснення ліпідів є важливим патофізіологічним механізмом виникнення ендогенної інтоксикації [232].

Показники прооксидантної системи, такі як вміст ГПЛ та реактантів ТБК у щурів з ССІ₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA відображені у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 – Показники ліпопероксидації у щурів з ССІ₄-індукованим гепатитом при лікуванні LOLA на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
ТБК у печінці (мкмоль /кг)	704,32 ± 6,36	854,06 ± 30,48**	774,99 ± 14,50 ^{NS}	637,65 ± 33,94	890,66 ± 33,81**	674,91 ± 27,64 ^{§§}
ГПЛ (Од/г)	1,77 ± 0,14	3,05 ± 0,13***	2,43 ± 0,13 [§]	1,74 ± 0,16	2,88 ± 0,13**	2,28 ± 0,06 ^{§§}

Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01, ^{NS}P>0,05 проти групи гепатиту.
Примітка 2. ТБК – активні продукти тіобарбітурової кислоти, ГПЛ – гідропероксиди ліпідів.

Вміст ГПЛ як первинних продуктів ліпопероксидації значно підвищувався із $(1,77 \pm 0,14)$ Од/г до $(3,05 \pm 0,13)$ Од/г на 72,64 % на 3 добу після моделювання гепатиту. На 7 день експерименту їх рівень залишався підвищеним на 66,35 % із $(1,74 \pm 0,16)$ Од/г до $(2,88 \pm 0,13)$ Од/г. При введенні LOLA продукція ГПЛ достовірно пригнічувалася на 20,22 % та на 20,81 % через 3 і 7 діб після початку дослідження і їх вміст становив $(2,43 \pm 0,13)$ Од/г і $(2,28 \pm 0,06)$ Од/г, відповідно.

Надмірне формування ГПЛ у щурів з гепатитом свідчить про посилену пероксидацію ліпідів та порушення антиоксидантних захисних механізмів [232]. Тому зниження рівня ГПЛ при лікуванні LOLA вказує на виражену здатність препарату пригнічувати реакції пероксидного окиснення ліпідів.

Вміст реактантів ТБК, які служать маркером пероксидації ліпідів, був значно підвищений у печінці на 21,26 % із $(704,32 \pm 6,36)$ мкмоль/кг у групі контролю до $(854,06 \pm 30,48)$ мкмоль/кг на 3 добу моделювання гепатиту. У динаміці їх концентрація продовжувала зростати, і на 7 добу експерименту вміст реактантів ТБК був на 39,68 % більшим у тварин з гепатитом порівняно з групою контролю.

При застосуванні LOLA на 3 добу спостерігалася тенденція до зниження, однак, недостовірного, формування цього маркера пероксидного окиснення ліпідів, однак, на 7 добу вміст ТБК був вірогідно знижений на 28,41 % до $(674,91 \pm 27,64)$ мкмоль/кг.

Отже, результати даного дослідження свідчать про виражену здатність LOLA пригнічувати реакції переокиснення мембранних ліпідів у щурів із тетрахлорметановим гепатитом.

При активації процесів пероксидації ліпідів забезпечення енергією більшості гепатоцитів знижується через розмежування дихання і оксидативного фосфорилування у мітохондріях, які є основними мішенями для гепатотоксичних ефектів багатьох речовин. Дисфункція цих органел викликає

порушення енергетичного метаболізму та ініціює внутрішньоклітинний оксидативний стрес [232].

Показники антиоксидантної системи, а саме: активність каталази в печінці і сироватці, вміст GSH у печінці щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA відображені у таблиці 3.6.

Таблиця 3.6 – Показники антиоксидантної системи (каталаза в печінці і сироватці, відновлений глутатіон та активність глутатіон S-трансферази) у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при лікуванні LOLA на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
Каталаза в печінці (мкмоль/хв×мг)	203,01 ± 10,02	159,96 ± 9,75*	190,01 ± 5,62 [§]	200,33 ± 9,24	169,12 ± 6,60*	212,08 ± 10,60 [§]
Каталаза сироватки (кат/л)	14,71 ± 0,46	21,08 ± 0,62***	18,05 ± 0,75 [§]	14,58 ± 0,40	18,94 ± 0,3***	15,66 ± 0,41 ^{§§§}
GSH (мкмоль/г)	2,71 ± 0,21	2,35 ± 0,22 ^{NS*}	4,15 ± 0,24 ^{§§}	2,64 ± 0,17	2,12 ± 0,11*	3,98 ± 0,23 ^{§§§}

Примітка 1. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ^{NS*}P>0,05 проти групи контролю; [§]P<0,05, ^{§§}P<0,01, ^{§§§}P<0,001 проти групи гепатиту.
Примітка 2. GSH – відновлений глутатіон.

Каталаза є одним із найважливіших антиоксидантних ферментів, який відіграє важливу роль у розщепленні перекису водню та підтримці клітинного окисно-відновного гомеостазу [233].

У щурів із змодельованим гепатитом активність каталази у печінці значно знизилася на 3 добу експерименту на 21,2 %, однак, її активність у сироватці зростала на 43,35 % порівняно з контролем.

Через 7 діб після початку моделювання токсичного гепатиту активність каталази у печінці залишалася пригніченою на 15,58 %:

(200,33 ± 9,24) мкмоль/хв×мг у контрольній групі проти (169,12 ± 6,60) мкмоль/хв×мг у групі гепатиту. У той же час, зберігалася її підвищена активність у сироватці на 29,87 %: (14,58 ± 0,40) кат/л у контрольній групі проти (18,94 ± 0,3) кат/л у групі гепатиту.

Введення LOLA з метою корекції значно підвищило активність ферменту у печінці на 18,78 % до (190,01 ± 5,62) мкмоль/хв×мг і знизило його активність у сироватці на 14,37 % (18,05 ± 0,75) кат/л на 3 добу експерименту. Такий же ефект LOLA утримувався і на 7 добу дослідження: лікування сприяло підвищенню активності ферменту у печінці на 25,40 % (212,08 ± 10,60) мкмоль/хв×мг і зниженню його активності у сироватці на 17,33 % (15,66 ± 0,41) кат/л.

Відновлений GSH є найважливішим внутрішньоклітинним поглиначем вільних радикалів, тому зниження рівня GSH може відображати виснаження антиоксидантного резерву [234]. GSH-залежна кон'югація продуктів мембранного перекисного окислення ліпідів за допомогою глутатіон S-трансферази, ферменту, який бере участь у клітинній детоксикації, вважається одним із основних клітинних механізмів захисту від токсичності [234].

На 3 добу після CCl₄-індукованого гепатиту спостерігалася тенденція до недостовірного зниження (на 13,40 %) вмісту відновленого GSH: (2,35 ± 0,22) мкмоль/г у групі гепатиту проти (2,71 ± 0,21) мкмоль/г у групі контролю, а активність глутатіон S-трансферази була пригнічена на 17,42 %: (1,49 ± 0,03) мкмоль/хв/мг у групі гепатиту проти (1,81 ± 0,07) мкмоль/хв/мг у групі контролю.

На 7 добу гепатиту вміст відновленого GSH був достовірно знижений на 19,53 %: (2,12 ± 0,11) мкмоль/г у групі гепатиту проти (2,64 ± 0,17) мкмоль/г у групі контролю, а активність глутатіон S-трансферази була пригнічена на 37,1 %: (1,13 ± 0,06) мкмоль/хв/мг у групі гепатиту проти (1,79 ± 0,05) мкмоль/хв/мг у групі контролю.

Лікування LOLA сприяло інтенсивному підвищенню концентрації відновленого GSH на 76,99 % до ($4,15 \pm 0,24$) мкмоль/г через 3 доби і на 87,43 % до ($3,98 \pm 0,23$) мкмоль/г через 7 діб.

Активність сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази, які також служать маркерами стану мітохондріального дихання [235], а також вміст церулоплазмину – мідьвмісного білка антиоксидантної системи, наведено у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7 – Активність сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази у печінці та вміст церулоплазмину у крові щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при лікуванні LOLA

Показник	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Конт- роль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
СДГ (мкмоль/хв/кг)	$8,85 \pm 0,1$	$6,78 \pm 0,11^{***}$	$7,14 \pm 0,08^{\$}$	$8,05 \pm 0,14$	$7,1 \pm 0,09^{**}$	$7,57 \pm 0,11^{\$}$
ЦХО (ммоль/кг)	$8,8 \pm 0,27$	$6,6 \pm 0,17^{***}$	$7,18 \pm 0,16^{\$}$	$8,73 \pm 0,24$	$6,88 \pm 0,14^{***}$	$7,84 \pm 0,17^{\$\$}$
Церулоплазмін (мг/л)	$244,27 \pm 4,18$	$322,29 \pm 10,10^{***}$	$275,63 \pm 10,13^{\$}$	$226,04 \pm 4,57$	$278,54 \pm 7,99^{**}$	$250,94 \pm 4,22^{\$}$

Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; \$P<0,05, \$\$P<0,01 проти групи гепатиту.
Примітка 2. СДГ – сукцинатдегідрогеназа, ЦХО – цитохромоксидаза.

СДГ відіграє важливу роль у функції електрон-транспортного ланцюга, тому будь-яке порушення у активності ферменту може негативно впливати на потік електронів, що призводить до утворення шкідливих активних форм кисню, особливо за патологічних обставин

Активність СДГ була знижена на 23,46 % із ($8,85 \pm 0,1$) мкмоль/хв/кг у групі контролю до ($6,78 \pm 0,11$) мкмоль/хв/кг у щурів через 3 доби після введення CCl₄. На 7 добу дослідження активність ферменту була знижена на

11,79 % і становила $(7,1 \pm 0,09)$ мкмоль/хв/кг у щурів з гепатитом проти $(8,05 \pm 0,14)$ мкмоль/хв/кг у групі контролю.

Застосування LOLA сприяло підвищенню активності фермента на 5,42 % до $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг через 3 доби і на 6,6 % до $(7,57 \pm 0,11)$ мкмоль/хв/кг через 7 діб експерименту.

ЦХО вважається кінцевим ферментом у мітохондріальному електрон-транспортному ланцюгу і служить для переносу електронів, а її знижена активність відображає порушення енергетичного метаболізму [235].

На 3 добу після моделювання гепатиту активність ЦХО пригнічувалася на 25 % із $(8,8 \pm 0,27)$ ммоль/кг у групі контролю до $(6,6 \pm 0,17)$ ммоль/кг у групі гепатиту. На 7 добу експерименту активність ферменту у щурів з ураженням печінки була на 21,26 % нижчою, у порівнянні із здоровими тваринами: $(6,88 \pm 0,14)$ ммоль/кг у групі гепатиту проти $(8,73 \pm 0,24)$ ммоль/кг у групі контролю.

Препарат LOLA проявив свою ефективність у відновленні активності фермента, викликаючи підвищення його функції на 8,85 % через 3 доби і на 14 % через 7 діб до $(7,18 \pm 0,16)$ ммоль/кг та $(7,84 \pm 0,17)$ ммоль/кг.

Зниження активності СДГ і ЦХО, зумовлене CCl_4 -індукованим гепатитом, свідчить про порушення функції електрон-транспортного ланцюга, що веде до зниженої утилізації кисню тканинами. Це, у свою чергу, може підвищувати потребу гепатоцитів у енергії та посилювати пошкодження печінки [235]. Тому той факт, що LOLA підвищує активність ЦХО при ураженні печінки, дає можливість припустити його потенційну ефективність у відновленні мітохондріального дихання.

ЦП є глікопротеїном, що продукується гепатоцитами та проявляє виражену антиоксидантну дію, пригнічуючи пероксидацію ліпідів через елімінацію супероксид-аніонів. При гострому гепатиті рівень ЦП підвищується, що прямо корелює із інтенсивністю запального процесу [236] Через 3 доби після моделювання гострого токсичного гепатиту вміст церулоплазміну у щурів підвищувався у групі гепатиту на 31,94 % до $(322,29 \pm 10,10)$ мг/л проти

(244,27 ± 4,18) мг/л у групі контролю. На 7 добу дослідження його концентрація залишалася на 23,23 % вищою у тварин з гепатитом – (278,54 ± 7,99) мг/л проти (226,04 ± 4,57) мг/л у групі контролю.

Лікування LOLA викликало зниження вмісту ЦП на 14,48 % до (275,63 ± 10,13) мг/л та на 9,91 % до (250,94 ± 4,22) мг/л на 3 і 7 доби експерименту, відповідно. Зростання концентрації ЦП при гострому гепатиті можна пояснити вивільненням вмісту гепатоцитів внаслідок цитолізу, а також активацією протеїнів гострої фази запалення [236]. Тому зниження ЦП під впливом LOLA свідчить як про пригнічення цитолізу, так і про потенційну протизапальну дію.

Супероксиддисмутаза – фермент антиоксидантного захисту, що каталізує дисмутацію радикалів O_2 та перешкоджає перетворенню супероксидного аніон-радикала в гідроксильний високотоксичний радикал, а також служить акцептором вільних кисневих радикалів, уповільнюючи перокисне окислення ліпідів та білків [237]. Два типи СОД виявлені в клітинах еукаріотів: Cu/Zn-СОД, що знаходиться в цитозолі, і Mn-СОД, яка знаходиться в мітохондріях. Вони можуть ефективно усувати активні форми кисню (ROS) і підтримувати окисно-відновний баланс [238].

У щурів із CCl_4 -індукованим ураженням печінки через 3 доби активність Mn-СОД була недостовірно знижена на 4,74 % із (5,24 ± 0,20) ОД/мг у групі контролю до (4,99 ± 0,10) ОД/мг у групі гепатиту, Cu,Zn-СОД – вдвічі із (5,21 ± 0,20) ОД/мг у групі контролю до (2,54 ± 0,21) ОД/мг у групі гепатиту, а СОД загальної – на 26,52 % із (10,25 ± 0,25) ОД/мг у групі контролю до (7,53 ± 0,11) ОД/мг у групі гепатиту (табл. 3.8).

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA через 3 доби сприяла вираженому зростанню активності Mn-СОД на 19,75 % порівняно з цирозом. Активність Cu,Zn-СОД зростала не достовірно, а СОД загальної – на 21,8 % до (9,17 ± 0,05) ОД/мг, порівнюючи з групою нелікованих щурів.

Таблиця 3.8 – Показники активності супероксиддисмутази у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при лікуванні LOLA на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA
	3 доба			7 доба		
Mn-SOD (ОД/мг)	5,24 ± 0,20	4,99 ± 0,10 ^{NS*}	5,97 ± 0,30 [§]	6,32 ± 0,12	5,26 ± 0,18 ^{**}	6,28 ± 0,18 ^{§§}
Cu,Zn-SOD (ОД/мг)	5,21 ± 0,20	2,54 ± 0,21 ^{***}	3,17 ± 0,28 ^{NS§}	4,57 ± 0,20	2,07 ± 0,06 ^{***}	3,24 ± 0,36 [§]
СОД загальна у печінці (ОД/мг)	10,25 ± 0,25	7,53 ± 0,11 ^{***}	9,17 ± 0,05 ^{§§§}	10,89 ± 0,08	7,35 ± 0,11 ^{***}	8,3 ± 0,25 [§]
ЗАА (мкмоль ABTS × г ⁻¹)	55,20 ± 0,80	46,03 ± 2,08 ^{**}	57,70 ± 2,53 ^{§§}	61,43 ± 0,37	53,92 ± 1,18 ^{***}	58,37 ± 1,19 [§]
Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001, ^{NS*} P>0,05 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001, ^{NS§} P>0,05 проти групи гепатиту. Примітка 2. СОД – супероксиддисмутаза, ЗАА – загальна антиоксидантна активність, ABTS-2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазоліно-6-сульфонова кислота.						

На 7 добу після моделювання гепатиту активність Mn-COD у печінці була знижена на 16,8 % із $(6,32 \pm 0,12)$ ОД/мг у групі контролю до $(5,26 \pm 0,18)$ ОД/мг у групі гепатиту, активність Cu, Zn-COD – на 54,72 % із $(4,57 \pm 0,20)$ ОД/мг у групі контролю до $(2,07 \pm 0,06)$ ОД/мг у групі гепатиту, а COD загальної – на 32,52 % із $(10,89 \pm 0,08)$ ОД/мг у групі контролю до $(7,35 \pm 0,11)$ ОД/мг у групі гепатиту.

Введення LOLA запобігало інгібуванню цих ферментів: активність Mn-COD, Cu, Zn-COD та COD загальної підвищувалася на 19,53 % до $(6,28 \pm 0,18)$ ОД/мг, на 56,52 % до $(3,24 \pm 0,36)$ ОД/мг і на 12,87 % до $(8,3 \pm 0,25)$ ОД/мг, відповідно.

Показник загальної антиоксидантної активності враховує кумулятивну дію всіх антиоксидантів, присутніх у плазмі та рідинах організму. Низька ЗАА може свідчити про оксидантний стрес або підвищену сприйнятливість до окисного пошкодження [239].

Загальна антиоксидантна активність (ЗАА) була пригнічена на 16,6 % і складала $(46,03 \pm 2,08)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ у щурів з гепатитом проти $(55,20 \pm 0,80)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ у здорових щурів на 3 добу дослідження. На 7 добу цей показник залишався зниженим на 12,24 % до $(53,92 \pm 1,18)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ у щурів з гепатитом проти $(61,43 \pm 0,37)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ у контрольних щурів.

Застосування препарату LOLA призводило до значного підвищення ЗАА на 25,34 % до $(57,70 \pm 2,53)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ через 3 доби після індукування гепатиту та на 8,25 % до $(58,37 \pm 1,19)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ через 7 діб.

Отже, результати наших досліджень свідчать про виражені протективні ефекти препарату LOLA при гострому токсичному гепатиті, зумовленому тетрахлорметаном як у гострій фазі (на 3 добу дослідження), так і у динаміці (на 7 добу експерименту). Про це свідчить його здатність запобігати розвитку синдромів цитолізу та внутрішньопечінкового холестазу, покращувати метаболічну функцію гепатоцитів, зменшувати прояви ендотоксикозу, пригнічувати прооксидантні процеси, посилюючи при цьому антиоксидантні функції організму.

3.2 Вивчення NO – залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату за умов гепатиту

3.2.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови блокади NOS та введення L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті

Щоб дослідити NO-залежні механізми реалізації гепатопротективних ефектів LOLA, ми порівнювали дію препарату при функціонуючій та заблокованій активності NOS. З діагностичною та лікувальною метою для пригнічення синтезу нітроген оксиду використовують аналоги L-аргініну, які є конкурентними інгібіторами NO-синтази. Для неселективного інгібування NOS було застосовано L-NAME (N-нітро-L-аргінін метиловий ефір). Завдяки своїй ліпофільній структурі він добре проникає через мембрани. У середині клітини L-NAME, який є проліком, піддається деестерифікації і стає еквівалентом L-нітро-L-аргініну, потужному інгібітору всіх ізоформ NOS з преференцією до cNOS [202].

На рисунку 3.1 зображено зміни структури печінки, що виникли на третю добу моделювання гепатиту без та з корекцією LOLA при нормальній та заблокованій функції NOS.

При гістологічному дослідженні структурного стану печінки було встановлено, що при впливі CCl₄ уже через 3 доби архітектура часточок порушувалася. Виявлено значне розширення порталних трактів за рахунок вираженої лімфо-гістіоцитарної інфільтрації та помірного кровонаповнення судин. Гепатоцити централобулярних зон зазнали значного токсичного впливу, що проявлялось розвитком великокрапельної жирової дистрофії та розвитком фокальних некрозів. Різко порушувалась балкова організація гепатоцитів, втрачались міжклітинні контакти.

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA призвела до суттєвого відновлення структури печінки. У ділянці порталних трактів спостерігалися лише поодинокі залишкові ознаки ураження печінки у вигляді окремих клітин з вакуолярними включеннями.

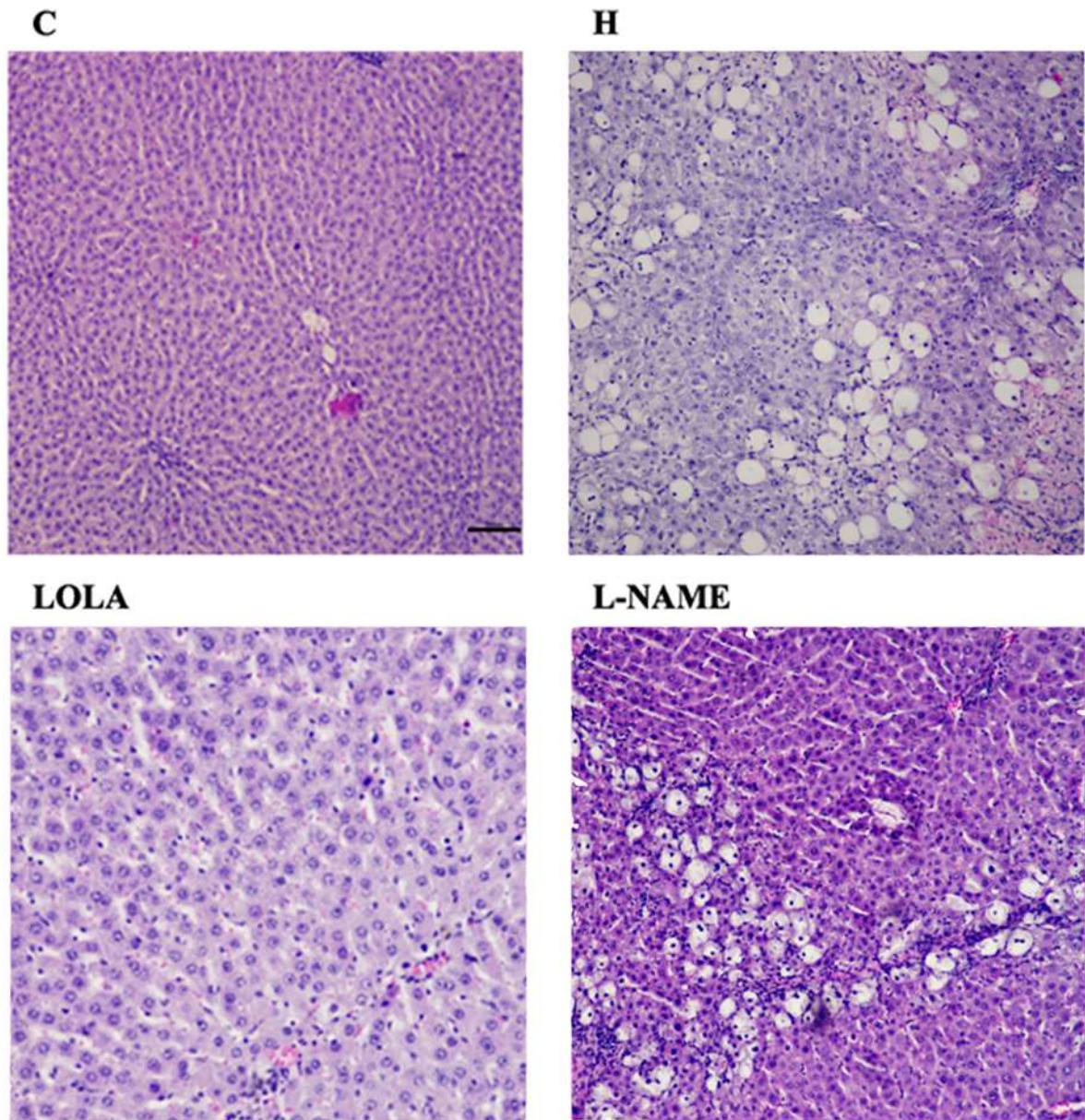


Рисунок 3.1 – Морфологічні зміни у печінці тварин за введення LOLA та L-NAME при гострому токсичному гепатиті на 3 добу експерименту (зabarвлення гематоксиліном та еозином). С – печінка інтактних тварин $\times 100$; Н – печінка тварин на 3 добу після моделювання токсичного гепатиту $\times 200$; LOLA – печінка тварин на 3 добу після моделювання токсичного гепатиту та корекції LOLA $\times 200$; L-NAME – печінка тварин на 3 добу після моделювання токсичного гепатиту та корекції із LOLA у поєднанні з L-NAME $\times 200$.

Судини триад не розширені, в просвітах поодинокі еритроцити, периваскулярного набряку портальних трактів не спостерігалось. Часточкова

структура печінки зберігалася, добре проглядалася трабекулярна організація гепатоцитів. Вздовж всієї часточки візуалізувалися синусоїди, які містили поодинокі еритроцити та макрофаги. Лише в окремих гепатоцитах візуалізувались незначні ознаки дистрофічних змін, ядра виявлялись у всіх клітинах, міжклітинні контакти були збережені.

У щурів, яким вводили LOLA у комбінації із L-NAME, структура печінки зазнавала помірних змін. На фоні відновленої трабекулярної організації гепатоцитів централобулярно візуалізувалась значна кількість гепатоцитів із проявами великокрапельної жирової дистрофії. В середній третині часточки цитоплазма клітин мала усі ознаки білкової дистрофії. Міжклітинні контакти частково пошкоджувались. У більшості гепатоцитів візуалізувались ядра. Судини залишалися дещо розширеними і повнокровними.

На рисунку 3.2 зображено зміни структури печінки, що виникли на 7 добу після моделювання гепатиту без та з корекцією LOLA при нормальній та заблокованій функції NOS.

На 7 добу моделювання токсичного гепатиту в печінці часточкова структура залишалась порушеною. Центральні вени незначно розширювались, проте не містили еритроцитів. Балкова організація дещо збережена, проте просвіти синусоїдів визначались лише за наявності макрофагів в місцях їх ймовірної локалізації. Цитоплазма гепатоцитів по всій величині часточки із ознаками вираженої переважно білкової дистрофії, про що свідчить зростання площі клітин та зменшення просвітів синусоїдів. Ядра, дещо гіперхромні, візуалізувались у переважній більшості клітин. Міжклітинні контакти залишалися частково збереженими. В портальних трактах спостерігалась помірно виражена лімфо-гістіоцитарна інфільтрація.

На фоні корекції LOLA часточкова будова відновлювалась. Центральні вени не візуалізувались. Балкова організація гепатоцитів залишалась збереженою, просвіти синусоїдів визначались по всій величині часточки, в окремих ділянках вони дещо більше розширювались і містили незначну кількість еритроцитів та поодинокі макрофаги. Розміри гепатоцитів

зменшувались, цитоплазма ставала більш однорідною, різко знижувались дистрофічні прояви, ядра набували звичайного вигляду, міжклітинні контакти відновлювались.

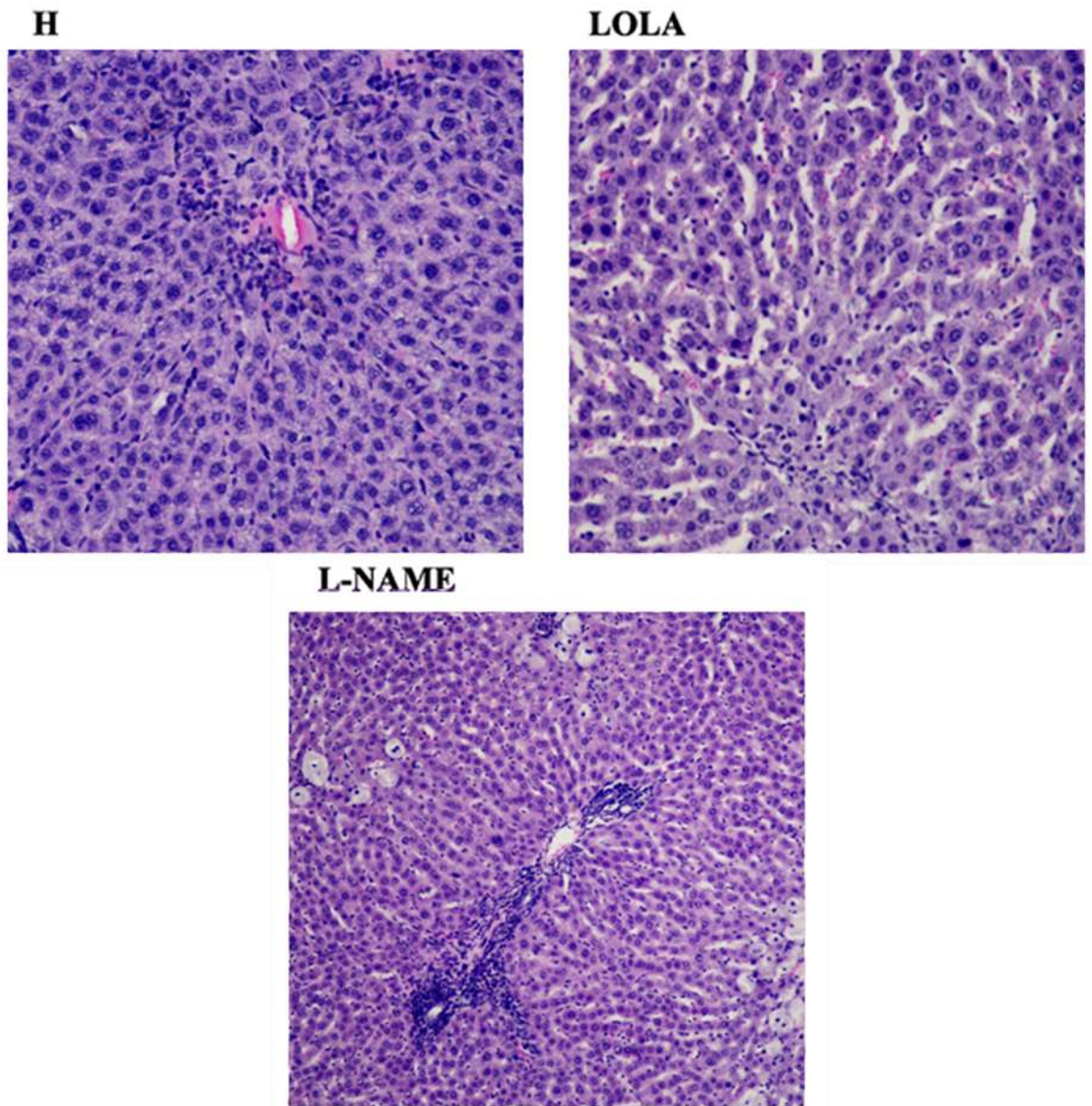


Рисунок 3.2 – Морфологічні зміни у печінці тварин за введення LOLA та L-NAME при гострому токсичному гепатиті на 7 добу експерименту (забарвлення гематоксилином та еозином). H – печінка на 7 добу після моделювання токсичного гепатиту $\times 200$; LOLA – печінка на 7 добу після моделювання токсичного гепатиту та корекції LOLA $\times 200$; L-NAME – печінка на 7 добу після моделювання токсичного гепатиту та корекції із LOLA у поєднанні з L-NAME $\times 100$.

Збільшувалась кількість двоядерних гепатоцитів. В портальних трактах спостерігалась незначна, переважно вогнищева лімфо-гістіоцитарна інфільтрація.

У нашому дослідженні препарат LOLA проявив високу ефективність у попередженні синдромів цитолізу та холестазу, які були викликані тетрахлорметановим ураженням печінки. Щоб встановити, чи такі властивості препарату є залежними від синтезу NO, ми дослідили ефективність препарату за умов блокування NOS.

Динаміка змін маси тіла щурів та активності амінотрансфераз у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням L-NAME на 3 та 7 доби дослідження продемонстрована у таблиці 3.9.

Через 3 і 7 діб після моделювання токсичного гепатиту спостерігалось суттєве збільшення маси печінки у щурів, що було попереджено за допомогою LOLA. Введення L-NAME не змінювало ефект LOLA, і маса печінки залишалася нижчою, у порівнянні із нелікованими тваринами як на 3 добу експерименту.

У щурів зі змодельованим токсичним гепатитом спостерігалось виражене зростання активності амінотрансфераз. Застосування LOLA достовірно запобігало розвитку синдрому цитолізу, попереджуючи підвищення активності ферментів АЛТ та АСТ.

Одночасне введення L-NAME пригнітило ефективність LOLA щодо зниження АЛТ, тому активність ферменту залишалася підвищеною на 3 добу експерименту: $(110,65 \pm 5,76)$ ОД/л у щурів з гепатитом, пролікованих LOLA, проти $(130,67 \pm 3,87)$ ОД/л при паралельному застосуванні L-NAME. Такий же ефект спостерігався і на 7 добу дослідження.

Отже, спостерігається висока активність L-NAME у блокуванні ефектів препарату LOLA щодо зменшення активності амінотрансфераз. Це свідчить про NO-залежний механізм дії LOLA у попередженні синдрому цитолізу.

Таблиця 3.9 – Вплив LOLA на активність АЛТ і АСТ у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при одночасному застосуванні L-NAME на 3 і 7 добу експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L- NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L- NAME
	3 доба				7 доба			
АЛТ (ОД/л)	81,88 ± 1,79	149,67 ± 4,09***	110,65 ± 5,76 ^{§§}	130,67 ± 3,87 [†]	75,75 ± 1,84	129,00 ± 2,14***	98,02 ± 2,73 ^{§§§}	116,83 ± 4,19 ^{††}
АСТ (ОД/л)	105,83 ± 2,24	440,83 ± 9,40***	216,78 ± 12,64 ^{§§§}	382,5 ± 20,00 ^{†††}	105,35 ± 2,02	417,15 ± 6,12***	205,00 ± 7,05 ^{§§§}	314,83 ± 19,76 ^{††}
Примітка 1. ***p<0,001 проти групи контролю; §p<0,05, §§p<0,01, §§§p<0,001 проти групи гепатиту; ††p <0,01, †††p<0,001, NSp>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. АЛТ – аланінамінотрансфераза, АСТ – аспаратамінотрансфераза.								

У таблиці 3.10 наведено показники активності ЛФ та ГГТ, а також вміст ЗБ і ЗХ у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням L-NAME на 3 та 7 доби дослідження.

Моделювання тетрахлорметанового гепатиту викликало зростання активності ЛФ та ГГТ, що свідчило про провокування холестазу, проте лікування за допомогою LOLA сприяло вірогідному зниженню активності цих ферментів.

У той же час, застосування L-NAME пригнітило здатність LOLA інгібувати активність ЛФ та ГГТ. На 3 добу після розвитку гепатиту активність ЛФ складала ($237,32 \pm 9,17$) ОД/л, а ГГТ – ($1,93 \pm 0,31$) ОД/л у щурів, пролікованих LOLA, а при паралельному застосуванні L-NAME їхня активність залишалася достовірно вищою: ($320,42 \pm 23,39$) ОД/л та ($3,03 \pm 0,24$) ОД/л, відповідно.

Такий же ефект спостерігався і на 7 добу дослідження. Активність ЛФ та ГГТ залишалася достовірно підвищеною при введенні L-NAME: ($291,63 \pm 6,33$) ОД/л та ($2,4 \pm 0,14$) ОД/л, порівнюючи із застосуванням LOLA при нормальній активності NOS: ($262,68 \pm 10,06$) ОД/л та ($1,82 \pm 0,19$) ОД/л.

Рівні ЗБ та ЗХ, які різко зростали у щурів з гепатитом на 3 добу дослідження і залишалися високими у динаміці на 7 добу, зазнавали суттєвого зниження при застосуванні LOLA (за винятком ЗХ на 3 добу, коли зниження не було статистично вірогідним). При блокуванні активності NOS не відбувалося пригнічення здатності LOLA знижувати вміст ЗБ та ЗХ ні у гострому періоді, ні в динаміці, і ці показники все ж зазнавали зниження, порівнюючи із нелікованими тваринами з ураженням печінки: рівень ЗБ складав ($5,73 \pm 0,18$) ммоль/л у групі LOLA + L-NAME проти ($5,84 \pm 0,47$) ммоль/л у групі LOLA на 3 добу та ($5,07 \pm 0,27$) ммоль/л проти ($4,06 \pm 0,34$) ммоль/л, відповідно, на 7 добу.

Вміст ЗХ також залишався практично на однакових рівнях при лікуванні LOLA за нормальної та пригніченої активності системи синтезу NO: ($1,85 \pm 0,19$) мкмоль/л у групі LOLA проти ($1,79 \pm 0,14$) мкмоль/л у групі LOLA + L-NAME на 3 день та ($1,42 \pm 0,07$) мкмоль/л у групі LOLA проти ($1,48 \pm 0,04$) мкмоль/л у групі LOLA + L-NAME на 7 добу.

Таблиця 3.10 – Активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA + L- NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA + L- NAME
	3 доба				7 доба			
ЛФ (ОД/л)	197,2 ± 10,93	662,45 ± 18,19 ^{***}	237,32 ± 9,17 ^{§§§}	320,42 ± 23,39 [†]	194,73 ± 5,88	336,17 ± 10,09 ^{***}	262,68 ± 10,06 ^{§§}	291,63 ± 6,33 [†]
ГГТ (ОД/л)	1,00 ± 0,09	5,15 ± 0,38 ^{***}	1,93 ± 0,31 ^{§§§}	3,03 ± 0,24 [†]	1,03 ± 0,08	3,3 ± 0,16 ^{***}	1,82 ± 0,19 ^{§§}	2,4 ± 0,14 [†]
ЗБ (ммоль/л)	2,98 ± 0,22	12,77 ± 1,01 ^{***}	5,84 ± 0,47 ^{§§§}	5,73 ± 0,18 ^{NS}	2,50 ± 0,31	6,83 ± 0,18 ^{***}	4,06 ± 0,34 ^{§§§}	5,07 ± 0,27 NS
ЗХ (мкмоль/л)	1,14 ± 0,03	2,09 ± 0,10 ^{***}	1,85 ± 0,19 NS§	1,79 ± 0,14 ^{NS}	1,09 ± 0,04	1,89 ± 0,05 ^{***}	1,42 ± 0,07 ^{§§}	1,48 ± 0,04 ^{NS}

Примітка 1. ^{***}P<0,001 проти групи контролю; ^{§§}P<0,01, ^{§§§}P<0,001, ^{NS§}P>0,05 проти групи гепатиту; [†]P<0,05, ^{NS}P>0,05 проти лікування LOLA.
Примітка 2. ЛФ – лужна фосфатаза, ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза, ЗБ – загальний білірубін, ЗХ – загальний холестерол.

У наступній серії експериментів було досліджено, чи відбувається покращення синтезуючої функції печінки у щурів з гострим гепатитом під впливом LOLA через NO – залежний механізм. У таблиці 3.11 наведені такі показники як концентрація сечовини та загального білка у крові і печінці у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні LOLA з одночасним застосуванням L-NAME на 3 та 7 доби дослідження.

На 3 добу після моделювання токсичного гепатиту рівень сечовини у щурів був зменшений майже вдвічі і через 7 діб залишався на 33.94 % нижчим, порівняно із контролем. Лікування LOLA сприяло підвищенню рівня сечовини у більш, ніж вдвічі, до $(7,15 \pm 0,11)$ ммоль/л на 3 добу дослідження, порівняно із нелікованими тваринами, та на 56,66 % на 7 добу до $(6,59 \pm 0,25)$ ммоль/л, і одночасне застосування L-NAME не реверсувало ефективності LOLA у збереженні здатності печінки синтезувати сечовину ні на 3 добу, ні на 7 добу дослідження.

Індукування токсичного гепатиту викликало пригнічення білковосинтезуючої функції печінки, сприяючи зниженню концентрації загального білка у крові та в печінці на 3 і 7 доби експерименту. Лікування препаратом LOLA викликало відновлення білковосинтезуючої функції печінки та призвело до збільшення концентрації загального білка на 3 та 7 доби дослідження і в крові, і в печінці.

Однак, блокування синтезу NO при введенні L-NAME інгібувало здатність препарату LOLA підтримувати нормальний вміст білка у крові, і його рівень був знижений до $(56,12 \pm 1,14)$ г/л у групі LOLA + L-NAME проти $(61,9 \pm 0,69)$ г/л у групі LOLA на 3 день експерименту та до $(57,27 \pm 0,99)$ г/л у групі LOLA + L-NAME проти $(63,68 \pm 1,38)$ г/л у групі LOLA на 7 добу. У той же час введення L-NAME не вплинуло на ефективність LOLA щодо підтримання вмісту загального білка у печінці, що свідчить про NO-незалежний механізм виникнення такого ефекту. Рівень путресцину в печінці достовірних змін також не зазнавав за блокади NOS (табл. 3.11).

Таблиця 3.11 – Концентрація сечовини, загального білка у крові і печінці та NO₂⁻ у сироватці і печінці у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA + L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA + L-NAME
	3 доба				7 доба			
Сечовина (ммоль/л)	6,45 ± 0,10	3,25 ± 0,20 ^{***}	7,15 ± 0,11 ^{§§§}	6,70 ± 0,15 ^{NS}	6,36 ± 0,04	4,20 ± 0,13 ^{***}	6,59 ± 0,25 ^{§§}	6,26 ± 0,40 ^{NS}
Загальний білок у крові (г/л)	64,55 ± 1,37	49,05 ± 1,66 ^{***}	61,9 ± 0,69 ^{§§§}	56,12 ± 1,14 ^{††}	61,22 ± 0,84	52,95 ± 1,12 ^{**}	63,68 ± 1,38 ^{§§§}	57,27 ± 0,99 ^{††}
Загальний білок у печінці (мг/г)	135,30 ± 2,54	101,29 ± 4,92 ^{***}	118,98 ± 2,85 [§]	127,00 ± 2,22 ^{NS}	133,63 ± 2,37	106,46 ± 4,30 ^{**}	131,46 ± 3,28 ^{§§}	122,58 ± 4,07 ^{NS}
Путресцин у печінці (нмоль/мг)	180,01 ± 3,14	141,28 ± 4,92 ^{***}	164,38 ± 2,44 ^{§§}	163,5 ± 2,90 ^{NS}	178,33 ± 1,83	134,65 ± 5,56 ^{**}	166,05 ± 3,419 ^{§§}	164,33 ± 2,46 ^{NS}
Примітка. ^{**} P<0,01, ^{***} P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01, ^{§§§} P<0,001 проти групи гепатиту; ^{††} P<0,01, ^{NS} P>0,05 проти лікування LOLA.								

У таблиці 3.12 наведено зміни показників MCM_1 та MCM_2 як маркерів ендотоксикозу у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при застосуванні LOLA за нормальної та заблокованої активності NOS на 3 і 7 доби експерименту.

Вміст MCM_1 та MCM_2 вірогідно зростав під впливом CCl_4 на 3 добу і утримувався на високому рівні на 7 добу експерименту. Лікування LOLA сприяло зниженню вмісту MCM_1 та MCM_2 на 16,88 % та 25,0 % через 3 доби експерименту та на 21,88 % та 23,51 % через 7 днів після початку експерименту.

У щурів із заблокованою активністю NOS втрачалася здатність препарату знижувати вміст MCM_1 та MCM_2 , тому їх рівень залишався значно вищим, порівнюючи із щурами із нормальною функцією системи синтезу азоту. Так, на 3 добу показники MCM_1 та MCM_2 зростали на 25,8 % та 35,3 %, а на 7 добу на 72,5 та 69,0 % відповідно. Активність ферменту глутатіон S-трансферази достовірно пригнічувалася при блокуванні синтезу оксиду азоту через 3 доби дослідження: $(1,36 \pm 0,02)$ мкмоль/хв/мг у групі LOLA+L-NAME проти $(1,61 \pm 0,03)$ мкмоль/хв/мг у групі LOLA.

Отже, пригнічення ендотоксикозу під впливом LOLA відбувається через NO-залежний механізм.

3.2.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за умови блокади NO – залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при гострому токсичному гепатиті

Стан системи оксиду азоту при блокуванні NOS оцінювали за вмістом нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів, що служить маркером NO-синтезуючої здатності тканин організму (табл. 3.13).

Після моделювання гепатиту у щурів спостерігалася підвищення сироваткового вмісту NO_2^- на 168 % через 3 доби та на 164,35 % через 7 днів експерименту порівняно з контролем. У той же час печінковий вміст NO_2^- був знижений на 13,5% та на 30,95% на 3 і 7 добу, відповідно.

Таблиця 3.12 – Показники ендотоксикозу у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA + L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA + L-NAME
	3 доба				7 доба			
MCM ₁ (Од/л)	0,28 ± 0,01	0,39 ± 0,01 ^{***}	0,32 ± 0,01 ^{§§}	0,39 ± 0,02 [†]	0,28 ± 0,01	0,37 ± 0,01 ^{***}	0,29 ± 0,01 ^{§§}	0,40 ± 0,01 ^{†††}
MCM ₂ (Од/л)	0,42 ± 0,01	0,67 ± 0,02 ^{***}	0,51 ± 0,01 ^{§§§}	0,69 ± 0,02 ^{†††}	0,41 ± 0,01	0,65 ± 0,01 ^{***}	0,49 ± 0,01 ^{§§§}	0,69 ± 0,15 ^{†††}
GST (МКМОЛЬ/ХВ/МГ)	1,81 ± 0,07	1,49 ± 0,03 ^{***}	1,61 ± 0,03 [§]	1,36 ± 0,02 ^{†††}	1,79 ± 0,05	1,13 ± 0,06 ^{***}	1,23 ± 0,06 ^{NS§}	1,47 ± 0,04 ^{NS}
Примітка 1. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; ^{§§} P<0,01, ^{§§§} P<0,001, ^{NS§} P>0,05 проти групи гепатиту; ^{NS} P>0,05, [†] P<0,05, ^{†††} P<0,001 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. MCM – молекули середньої маси, GST – глутатіон-S-трансфераза.								

Таблиця 3.13 – Концентрація нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME
	3 доба				7 доба			
NO ₂ ⁻ у сироватці (мкг/л)	1,23 ± 0,06	3,29 ± 0,24 ^{***}	4,05 ± 0,23 [§]	2,07 ± 0,20 ^{†††}	1,21 ± 0,05	3,19 ± 0,04 ^{***}	2,43 ± 0,16 ^{§§}	0,66 ± 0,06 ^{†††}
NO ₂ ⁻ у печінці (мг/л)	2,14 ± 0,07	1,85 ± 0,09 [*]	2,35 ± 0,17 [§]	1,24 ± 0,08 ^{††}	1,95 ± 0,07	1,35 ± 0,03 ^{***}	1,64 ± 0,05 ^{§§}	0,80 ± 0,03 ^{†††}

Примітка 1. *P<0,05, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01 проти групи гепатиту; ††P<0,01, †††P<0,001 проти лікування LOLA.
Примітка 2. NO₂⁻ – нітрит-аніон.

Лікування препаратом LOLA підсилювало синтез NO_2^- у сироватці на 23 % до $(4,05 \pm 0,23)$ мкг/л, і на 26,51 % до $(2,35 \pm 0,17)$ мг/л у печінці на 3 добу експерименту, проте на 7 добу – продукція NO_2^- у сироватці зменшилася на 23,64 % до $(2,43 \pm 0,16)$ мкг/л, хоча його вміст у печінці підвищився на 21,99 % до $(1,64 \pm 0,05)$ мг/л.

При паралельному введенні L-NAME у тварин з гепатитом пригнічувалася здатність LOLA посилювати продукцію NO_2^- як у сироватці, так і в печінці на 3 добу дослідження. На 7 добу гепатиту застосування L-NAME різко потенціювало здатність LOLA до зниження концентрації NO_2^- у сироватці, але заблокувало зумовлене LOLA зростання вмісту NO_2^- у печінці.

Отже, вплив LOLA на вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з гепатитом є критично залежним від активності ферменту NO-синтази, а його блокування чинить великий вплив на ефекти препарату.

Зміни таких показників ліпопероксидації як вміст ГПЛ та ТБК у печінці у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при лікуванні LOLA та L-NAME наведено у таблиці 3.14.

Вміст ГПЛ значно зростав на 72,64 % на 3 добу після моделювання гепатиту і залишався підвищеним на 66,35 % на 7 добу експерименту. При введенні LOLA продукція ГПЛ достовірно пригнічувалася на 20,22 % та на 20,81 % через 3 і 7 діб, відповідно.

При застосуванні L-NAME препарат LOLA втратив свою здатність пригнічувати продукцію ГПЛ, і їхній вміст був значно вищим, порівнюючи із показниками щурів, пролікованих LOLA при нормальній активності NOS: $(3,2 \pm 0,13)$ Од/г у групі LOLA + L-NAME проти $(2,43 \pm 0,13)$ Од/г у групі LOLA на 3 добу дослідження. Через 7 діб ці показники склали $(3,35 \pm 0,08)$ Од/г у групі LOLA + L-NAME проти $(2,28 \pm 0,06)$ Од/г у групі LOLA. Це свідчить про те, що LOLA реалізує свій ефект щодо пригнічення формування ГПЛ через NO-залежний механізм.

Таблиця 3.14 – Показники прооксидантної системи у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME
	3 доба				7 доба			
ТБК у печінці (мкмоль /кг)	704,32 ± 6,36	854,06 ± 30,48**	774,99 ± 14,50 ^{§§}	744,25 ± 8,45 ^{NS}	637,65 ± 33,94	890,66 ± 33,81**	674,91 ± 27,64 ^{§§}	677,59 ± 33,43 ^{NS}
ГПЛ (Од/г)	1,77 ± 0,14	3,05 ± 0,13***	2,43 ± 0,13 [§]	3,2 ± 0,13 ^{††}	1,74 ± 0,16	2,88 ± 0,13**	2,28 ± 0,06 ^{§§}	3,35 ± 0,08 ^{†††}
Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01 проти групи гепатиту; ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001, ^{NS} P>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. ТБК – активні продукти тіобарбітурової кислоти, ГПЛ – гідропероксиди ліпідів.								

Вміст реактантів ТБК був значно підвищений у печінці на 21,26 % на 3 добу після введення CCl_4 . На 7 добу експерименту вміст реактантів ТБК був на 39,68 % більшим у тварин з гепатитом. При застосуванні LOLA на 3 добу спостерігалася тенденція до зниженого формування ТБК при ураженні печінки, однак, на 7 добу їх вміст був достовірно менший, ніж у нелікованих тварин з гепатитом.

Введення L-NAME з метою блокування синтезу NO не реверсувало ефективності LOLA у пригніченні формування ТБК. На 3 добу експерименту їх вміст складав $(744,25 \pm 8,45)$ мкмоль/кг у групі LOLA + L-NAME проти $(774,99 \pm 14,50)$ мкмоль/кг у групі LOLA, а на 7 добу – $(677,59 \pm 33,43)$ мкмоль/кг у групі LOLA + L-NAME проти $(674,91 \pm 27,64)$ мкмоль/кг у групі LOLA. Отже, LOLA пригнічує формування ТБК через механізм, незалежний від активності NOS.

Активність каталази у печінці та сироватці, глутатіон-S-трансферази та вміст GSH як показників антиоксидантної системи у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту відображено у таблиці 3.15.

У щурів із змодельованим гепатитом активність каталази у печінці значно знизилася на 3 добу експерименту, проте її активність у сироватці зростала. Через 7 діб після моделювання токсичного гепатиту активність каталази у печінці залишалася пригніченою, а у сироватці – підвищеною. Введення LOLA з метою корекції значно підвищило активність ферменту у печінці на 18,78 % і знизило його активність у сироватці на 14,37 % 3 добу експерименту. Такий же ефект LOLA утримувався і на 7 добу дослідження: лікування сприяло підвищенню активності ферменту у печінці на 25,40 % і зниженню його активності у сироватці на 17,33 %.

Застосування L-NAME заблокувало всі вищеперелічені ефекти LOLA. На 3 добу експерименту активність каталази у печінці була зниженою до $(147,44 \pm 7,40)$ мкмоль/хв×мг у групі LOLA + L-NAME проти $(190,01 \pm 5,62)$ мкмоль/хв×мг у групі LOLA, а у сироватці – підвищеною до $(28,03 \pm 0,91)$ кат/л у групі LOLA + L-NAME проти $(18,05 \pm 0,75)$ кат/л у групі LOLA. На 7 добу дослідження

активність каталази у печінці була зниженою до $(161,48 \pm 3,73)$ мкмоль/хв×мг у групі LOLA + L-NAME проти $(212,08 \pm 10,60)$ мкмоль/хв×мг у групі LOLA, а у сироватці – підвищеною до $(20,2 \pm 0,46)$ кат/л у групі LOLA + L-NAME проти $(15,66 \pm 0,41)$ кат/л у групі LOLA.

При токсичному гепатиті вміст GSH знижувався, однак при лікуванні LOLA рівень його достовірно зростав в обидва терміни дослідження. Ефекти LOLA щодо відновленого GSH були реалізовані через NO-залежний механізм, оскільки при заблокованій активності NO-синтази його вміст залишався зниженим на 3 і 7 доби дослідження при застосуванні препарату: $(2,85 \pm 0,28)$ мкмоль/г у групі LOLA+L-NAME проти $(4,15 \pm 0,24)$ мкмоль/г у групі LOLA на 3 добу і $(2,98 \pm 0,19)$ мкмоль/г у групі LOLA+L-NAME проти $(3,98 \pm 0,23)$ мкмоль/г у групі LOLA на 7 добу.

У таблиці 3.16 наведені показники активності сукцинатдегідрогенази, супероксиддисмутази та вмісту цитохромоксидази у щурів з токсичним гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту. Активність СДГ була знижена на 23,46 % у щурів через 3 доби після введення CCl_4 та на 11,79 % на 7 добу дослідження. Застосування LOLA сприяло достовірному підвищенню активності фермента на 5,42 % через 3 дні і на 6,6 % через 7 днів експерименту. Такий ефект був реалізований через NO-залежний механізм, оскільки активність СДГ, яка становила $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг у щурів з гепатитом при лікуванні LOLA на 3 добу і $(7,57 \pm 0,11)$ мкмоль/хв/кг на 7 добу, достовірно зменшилася під впливом L-NAME до $(6,51 \pm 0,23)$ мкмоль/хв/кг та до $(6,57 \pm 0,13)$ мкмоль/хв/кг, відповідно.

Після моделювання гепатиту активність ЦХО знижувалася достовірно. Препарат LOLA проявив свою ефективність у відновленні активності фермента, викликаючи підвищення його функції на 8,85 % на 3 добу і на 14 % на 7 добу експерименту. Заблокувавши синтез оксиду азоту, ці властивості LOLA нівелювалися, і активність фермента залишалася такою ж низькою. При токсичному ураженні печінки вміст церулоплазміну у щурів підвищувався, а лікування LOLA викликало його зниження.

Таблиця 3.15 – Активність каталази у печінці та сироватці та вміст GSH у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME
	3 доба				7 доба			
Каталаза в печінці (мкмоль/хв×мг)	203,01 ± 10,02	159,96 ± 9,75*	190,01 ± 5,62 [§]	147,44 ± 7,40 ^{††}	200,33 ± 9,24	169,12 ± 6,60*	212,08 ± 10,60 [§]	161,48 ± 3,73 ^{††}
Каталаза сироватки (кат/л)	14,71 ± 0,46	21,08 ± 0,62 ^{***}	18,05 ± 0,75 [§]	28,03 ± 0,91 ^{†††}	14,58 ± 0,40	18,94 ± 0,3 ^{***}	15,66 ± 0,41 ^{§§§}	20,2 ± 0,46 ^{†††}
GSH (мкмоль/г)	2,71 ± 0,21	2,35 ± 0,22 ^{NS*}	4,15 ± 0,24 ^{§§}	2,85 ± 0,28 [†]	2,64 ± 0,17	2,12 ± 0,11*	3,98 ± 0,23 ^{§§§}	2,98 ± 0,19 [†]
Примітка 1. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ^{NS} P>0,05 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01, ^{§§§} P<0,001, проти групи гепатиту; [†] P<0,05, ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001 ^{NS} P>0,05 проти лікування LOLA. Примітка 2. GSH – відновлений глутатіон.								

Таблиця 3.16 – Показники активності сукцинатдегідрогенази, супероксиддисмутази та вмісту цитохромоксидази у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L- NAME
	3 доба				7 доба			
СДГ (мкмоль/хв/кг)	8,85 ± 0,1	6,78 ± 0,11***	7,14 ± 0,08 [§]	6,51 ± 0,23 [†]	8,05 ± 0,14	7,1 ± 0,09**	7,57 ± 0,11 [§]	6,57 ± 0,13 ^{††}
ЦХО (ммоль/кг)	8,8 ± 0,27	6,6 ± 0,17***	7,18 ± 0,16 [§]	6,63 ± 0,12 [†]	8,73 ± 0,24	6,88 ± 0,14***	7,84 ± 0,17 ^{§§}	6,53 ± 0,1 ^{†††}
Церулоплазмін (мг/л)	244,27 ± 4,18	322,29 ± 10,10***	275,63 ± 10,13 [§]	317,92 ± 12,29 [†]	226,04 ± 4,57	278,54 ± 7,99**	250,94 ± 4,22 [§]	325,21 ± 10,91 ^{†††}
Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01 проти групи гепатиту; [†] P<0,05, ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. СДГ – сукцинатдегідрогеназа, ЦХО – цитохромоксидаза.								

Застосування L-NAME поряд із LOLA пригнітило здатність препарату запобігати зростанню цього мідьвмісного білка, і його вміст залишався значно підвищеним, особливо на пізніх термінах експерименту, що вказує на роль нітроген оксиду в регуляції активності мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО та продукції і вивільнення антиоксидантного білка церулоплазміну (табл. 3.16).

У таблиці 3.17 наведені показники антиоксидантної системи (активність Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn-супероксиддисмутази, супероксиддисмутази загальної та загальна антиоксидантної активність) у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту. У щурів із CCl₄-індукованим ураженням печінки через 3 доби активність Mn-СОД була недостовірно знижена на 4,74 %, Cu,Zn-СОД – вдвічі, а СОД загальної – на 26,52 %. На 7 добу після моделювання гепатиту активність Mn-СОД у печінці була знижена на 16,8 %, активність Cu, Zn-СОД – на 54,72 %, а СОД загальної – на 32,52 %.

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA через 3 доби сприяла вираженому зростанню активності Mn-СОД на 19,75 %, Cu,Zn-СОД – 25,12 %, а СОД загальної – на 21,8 %, порівнюючи з групою нелікованих щурів. На 7 добу дослідження введення LOLA запобігало інгібуванню цих ферментів: активність Mn-СОД, Cu,Zn-СОД та СОД загальної підвищувалася на 19,53 %, на 56,52 % і на 12,87 %, відповідно. Введення L-NAME не спричинило достовірних змін у ефектах LOLA щодо впливу на активність ферментів Mn-СОД і Cu,Zn-СОД. Однак, активність СОД загальної, пригнічення якої внаслідок гепатиту було попереджене лікуванням LOLA, зменшилася на фоні застосування L-NAME до $(8,17 \pm 0,05)$ ОД/мг проти $(9,17 \pm 0,05)$ ОД/мг у групі LOLA на 3 добу експерименту, однак на 7 добу спостерігали протилежне – зростання активності СОД загальної до $(10,03 \pm 0,16)$ ОД/мг при блокуванні NO-синтази проти $(8,3 \pm 0,25)$ ОД/мг при її нормальній функції.

Таблиця 3.17 – Показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn- супероксиддисмутази, супероксиддисмутази загальної та загальної антиоксидантної активності у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та L-NAME на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME	Контроль	Гепатит	Гепатит + LOLA	Гепатит + LOLA+ L-NAME
	3 доба				7 доба			
Mn-СОД (ОД/мг)	5,24 ± 0,20	4,99 ± 0,10 ^{NS*}	5,97 ± 0,30 [§]	5,55 ± 0,18 ^{NS}	6,32 ± 0,12	5,26 ± 0,18 ^{**}	6,28 ± 0,18 ^{§§}	6,84 ± 0,47 ^{NS}
Cu,Zn-СОД (ОД/мг)	5,21 ± 0,20	2,54 ± 0,21 ^{***}	3,17 ± 0,28 ^{NS§}	2,62 ± 0,30 ^{NS}	4,57 ± 0,20	2,07 ± 0,06 ^{***}	3,24 ± 0,36 [§]	3,19 ± 0,11 ^{NS}
СОД загальна у печінці (ОД/мг)	10,25 ± 0,25	7,53 ± 0,11 ^{***}	9,17 ± 0,05 ^{§§§}	8,17 ± 0,05 ^{†††}	10,89 ± 0,08	7,35 ± 0,11 ^{***}	8,3 ± 0,25 [§]	10,03 ± 0,16 ^{††}
ЗАА (мкмоль АВТS× г ⁻¹)	55,20 ± 0,80	46,03 ± 2,08 ^{**}	57,70 ± 2,53 ^{§§}	61,63 ± 0,15 ^{NS}	61,43 ± 0,37	53,92 ± 1,18 ^{***}	58,37 ± 1,19 [§]	57,03 ± 1,27 ^{NS}
Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001, NS*P>0,05 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001, NS§P>0,05 проти групи гепатиту; ††P<0,01, †††P<0,001 NSP>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. СОД – супероксиддисмутаза, ЗАА – загальна антиоксидантна активність, АВТS-2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазоліно-6-сульфонова кислота.								

Загальна антиоксидантна активність при моделюванні токсичного гепатиту була пригнічена на 16,6 % на 3 добу дослідження і на 7 добу залишалася зниженою на 12,24 %, порівняно зі здоровими тваринами. Застосування препарату LOLA призводило до значного підвищення ЗАА на 25,34 % через 3 доби після індукування гепатиту та на 8,25 % через 7 діб.

Блокування синтази оксиду азоту не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, тому ЗАА залишалася на такому ж рівні, як і при нормальній активності NO-синтази: $(58,37 \pm 1,19)$ мкмоль АВТС \times г⁻¹.

Таким чином, лікування за допомогою LOLA в дозі 200 мг/кг сприяло значному відновленню структури печінки як на 3, так і на 7 добу експерименту.

Застосування L-NAME у щурів із токсичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA сповільнило відновлення гепатоцитів в ділянці портальних трактів, що свідчить про залежність гепатопротективної дії препарату від синтезу оксиду азоту. Лікування LOLA призвело до попередження основних синдромів, які супроводжують гостре ураження печінки, зокрема, цитолізу і холестазу, сприяло зниженню процесів ендотоксикозу. Можна припустити, що ці ефекти були реалізовані через NO-опосередкований механізм, оскільки використання L-NAME знижувало такі властивості LOLA впливати на зазначені процеси. Щодо впливу на процеси ліпопероксидації та стан антиоксидантної системи, то нами встановлено, щодо ці ефекти LOLA реалізує не тільки через систему L-аргінін-NO. Блокування синтезу NO не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, активність ізоформ СОД, рівень ТБК-активних продуктів, можна припустити взаємозв'язок між рівнем продукції NO та синтезом ГПЛ, відновленого глутатіону, активності каталази.

Таким чином можна стверджувати, що гепатопротективний ефект LOLA при гострому гепатиті в значній мірі реалізується через NO-залежний механізм.

3.3 Вивчення поліамін-залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату за умов гепатиту

3.3.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови застосування L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при гострому токсичному гепатиті

Динаміка змін маси тіла щурів та активності амінотрансфераз у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням DFMO на 3 та 7 доби дослідження продемонстрована у таблиці 3.18.

Через 3 і 7 діб після моделювання токсичного гепатиту спостерігалось виражене збільшення маси печінки у щурів, що було попереджено за допомогою LOLA. Введення DFMO інгібувало здатність LOLA попереджувати зростання маси печінки при гепатиті, і на 3 добу дослідження її показник сягав $(0,042 \pm 0,001)$ г і був на 28 % вищим, порівняно із $(0,033 \pm 0,0004)$ г при лікуванні LOLA за нормального синтезу поліамінів. На 7 добу: $(0,046 \pm 0,002)$ г у групі гепатиту, $(0,038 \pm 0,001)$ г при лікуванні LOLA і $(0,033 \pm 0,002)$ г при застосуванні LOLA та DFMO $(0,040 \pm 0,003)$.

На 3 добу після індукування токсичного гепатиту виникало виражене зростання активності амінотрансфераз, що було попереджено при застосуванні LOLA. У динаміці активність АЛТ та АСТ залишалася все ще значно вищою, порівнюючи із контролем, однак, препарат сприяв її зниженню і на 7 добу експерименту.

Одночасне введення DFMO інгібувало здатність LOLA знижувати активність амінотрансфераз, що свідчить про поліамін-залежний механізм дії препарату у попередженні цитолізу. Так, на 3 добу активність АЛТ залишалася підвищеною до $(141,82 \pm 1,37)$ ОД/л у групі LOLA + DFMO проти $(110,65 \pm 5,76)$ ОД/л у групі LOLA, а активність АСТ – до $(389,03 \pm 6,26)$ ОД/л у групі LOLA + DFMO проти $(216,78 \pm 12,66)$ ОД/л у групі LOLA.

Таблиця 3.18 – Вплив LOLA на масу печінки, вміст путресцину в печінці та активність АЛТ і АСТ у крові щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при одночасному застосуванні DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
Маса печінки	0,028 ± 0,001	0,047 ± 0,002***	0,033 ± 0,0004§§§	0,042 ± 0,001†††	0,028 ± 0,001	0,046 ± 0,002***	0,038 ± 0,001§	0,040 ± 0,003 ^{NS}
АЛТ (ОД/л)	81,88 ± 1,79	149,67 ± 4,09***	110,65 ± 5,76§§	141,82 ± 1,37††	75,75 ± 1,84	129,00 ± 2,14***	98,02 ± 2,73§§§	124,28 ± 1,19†††
АСТ (ОД/л)	105,83 ± 2,24	440,83 ± 9,40***	216,78 ± 12,64§§§	389,03 ± 6,26†††	105,35 ± 2,02	417,15 ± 6,12***	205,00 ± 7,05§§§	397,83 ± 3,6†††
Примітка 1. *** p<0,001 проти групи контролю; §p<0,05, §§p<0,01, §§§p<0,001 проти групи гепатиту; ††p <0,01, †††p<0,001, ^{NS} p>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. АЛТ – аланінамінотрансфераза, АСТ – аспаратамінотрансфераза.								

Такий же ефект спостерігався і на 7 добу дослідження. Активність АЛТ залишалася достовірно підвищеною до $(124,28 \pm 1,19)$ ОД/л при введенні DFMO, порівнюючи із застосуванням лише LOLA $(98,02 \pm 2,73)$ ОД/л, а активність АСТ зростала до $(397,83 \pm 3,6)$ ОД/л групі LOLA + DFMO проти $(205,00 \pm 7,05)$ ОД/л у групі LOLA.

У таблиці 3.19 наведено показники активності ЛФ та ГГТ, а також вміст ЗБ і ЗХ у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням DFMO на 3 та 7 доби дослідження.

Введення тетрахлорметану щурам провокувало розвиток вираженого синдрому внутрішньопечінкового холестазу, про що свідчило значне зростання активності ЛФ та ГГТ. Лікування за допомогою LOLA проявило високу активність у зниженні активності цих ферментів, пригнітивши їх на 64,2 % і 41,2 % на 3 добу та на 21,9 % і 44,9 % на 7 добу, відповідно.

У той же час, застосування DFMO заблокувало здатність LOLA зменшувати активність ЛФ та ГГТ. На 3 добу після розвитку гепатиту активність ЛФ складала $(237,32 \pm 9,17)$ ОД/л, а ГГТ – $(1,93 \pm 0,31)$ ОД/л у щурів, пролікованих LOLA, а при паралельному застосуванні DFMO їхня активність залишалася достовірно вищою: $(350,92 \pm 26,76)$ ОД/л та $(3,91 \pm 0,07)$ ОД/л, відповідно.

Такий же ефект спостерігався і на 7 добу дослідження. Активність ЛФ та ГГТ залишалася достовірно підвищеною при введенні DFMO: $(314,25 \pm 7,47)$ ОД/л та $(3,07 \pm 0,14)$ ОД/л, порівнюючи із застосуванням LOLA при фізіологічному синтезі поліамінів: $(262,68 \pm 10,06)$ ОД/л та $(1,82 \pm 0,19)$ ОД/л.

У щурів із токсичним гепатитом на 3 добу дослідження спостерігалася виражене зростання вмісту ЗБ та ЗХ, який залишався підвищеним і на 7 добу. Однак, застосування LOLA попереджало CCl_4 -індуковане збільшення концентрації цих показників, що підтверджує здатність препарату запобігати холестазу.

Таблиця 3.19 – Активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
ЛФ (ОД/л)	197,2 ± 10,93	662,45 ± 18,19 ^{***}	237,32 ± 9,17 ^{\$\$\$}	350,92 ± 26,76 ^{††}	194,73 ± 5,88	336,17 ± 10,09 ^{***}	262,68 ± 10,06 ^{\$\$}	314,25 ± 7,47 ^{††}
ГГТ (ОД/л)	1,00 ± 0,09	5,15 ± 0,38 ^{***}	1,93 ± 0,31 ^{\$\$\$}	3,91 ± 0,07 ^{†††}	1,03 ± 0,08	3,3 ± 0,16 ^{***}	1,82 ± 0,19 ^{\$\$}	3,07 ± 0,14 ^{††}
ЗБ (ммоль/л)	2,98 ± 0,22	12,77 ± 1,01 ^{***}	5,84 ± 0,47 ^{\$\$\$}	10,37 ± 0,24 ^{†††}	2,50 ± 0,31	6,83 ± 0,18 ^{***}	4,06 ± 0,34 ^{\$\$\$}	6,13 ± 0,21 ^{††}
ЗХ (мкмоль/л)	1,14 ± 0,03	2,09 ± 0,10 ^{***}	1,85 ± 0,19 ^{NS\$}	1,71 ± 0,14 ^{NS}	1,09 ± 0,04	1,89 ± 0,05 ^{***}	1,42 ± 0,07 ^{\$\$}	1,82 ± 0,07 ^{††}
Примітка 1. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; ^{\$\$} P<0,01, ^{\$\$\$} P<0,001, ^{NS\$} P>0,05 проти групи гепатиту; ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001, ^{NSP} P>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. ЛФ – лужна фосфатаза, ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза, ЗБ – загальний білірубін, ЗХ – загальний холестерол.								

При блокуванні синтезу поліамінів пригнітилася здатність LOLA знижувати вміст ЗБ і в гострому, і в підгострому періодах гепатиту. На 3 добу експерименту рівень ЗБ складав $(10,37 \pm 0,24)$ ммоль/л у групі LOLA + DFMO проти $(5,84 \pm 0,47)$ ммоль/л у групі LOLA на 3 добу та $(6,13 \pm 0,21)$ ммоль/л проти $(4,06 \pm 0,34)$ ммоль/л, відповідно, на 7 добу.

Блокування синтезу поліамінів при введенні DFMO на 3 добу не вплинуло на дію LOLA щодо зниження вмісту ЗХ, яке, однак, було недостовірним: $(1,85 \pm 0,19)$ мкмоль/л у групі LOLA проти $(1,71 \pm 0,14)$ мкмоль/л у групі LOLA + DFMO. Проте у динаміці препарат ефективніше проявив свої властивості, і на 7 добу його дія була заблокована при застосуванні DFMO, а показники ЗХ склали $(1,42 \pm 0,07)$ мкмоль/л у групі LOLA проти $(1,82 \pm 0,07)$ мкмоль/л у групі LOLA + DFMO.

Отже, при блокуванні синтезу поліамінів втрачається здатність препарату LOLA попереджувати більшість симптомів, характерних для синдромів цитолізу та внутрішньопечінкового холестазу при гострому токсичному гепатиті.

У таблиці 3.20 наведені такі показники як концентрація сечовини та загального білка у крові і печінці у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні LOLA з одночасним застосуванням DFMO на 3 та 7 доби дослідження.

На 3 добу після моделювання токсичного гепатиту рівень сечовини у щурів був зменшений майже вдвічі і через 7 діб залишався на 33,94 % нижчим, порівняно із контролем.

Лікування LOLA сприяло підвищенню рівня сечовини у більш, ніж вдвічі, на 3 добу дослідження та на 56.66 % на 7 добу. Одночасне застосування DFMO пригнітило здатність LOLA зберігати здатність печінки синтезувати сечовину на 3 добу: $(7,15 \pm 0,11)$ ммоль/л у групі LOLA проти $(6,23 \pm 0,12)$ ммоль/л у групі LOLA+DFMO. Однак на 7 добу дослідження блокування синтезу поліамінів не чинило впливу на здатність LOLA регулювати синтез сечовини, що був пригнічений внаслідок гепатиту: $(6,59 \pm 0,25)$ ммоль/л у групі LOLA проти $(6,1 \pm 0,18)$ ммоль/л у групі LOLA+DFMO.

Таблиця 3.20 – Концентрація сечовини, загального білка у крові і печінці у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
Сечовина (ммоль/л)	6,45 ± 0,10	3,25 ± 0,20 ^{***}	7,15 ± 0,11 ^{§§§}	6,23 ± 0,12 ^{††}	6,36 ± 0,04	4,20 ± 0,13 ^{***}	6,59 ± 0,25 ^{§§}	6,1 ± 0,18 ^{NS}
Загальний білок у крові (г/л)	64,55 ± 1,37	49,05 ± 1,66 ^{***}	61,9 ± 0,69 ^{§§§}	44,83 ± 1,24 ^{†††}	61,22 ± 0,84	52,95 ± 1,12 ^{**}	63,68 ± 1,38 ^{§§§}	44,65 ± 1,87 ^{†††}
Загальний білок у печінці (мг/г)	135,30 ± 2,54	101,29 ± 4,92 ^{***}	118,98 ± 2,85 [§]	104,20 ± 2,69 ^{††}	133,63 ± 2,37	106,46 ± 4,30 ^{**}	131,46 ± 3,28 ^{§§}	95,98 ± 1,16 ^{†††}
Путресцин у печінці (нмоль/мг)	180,01 ± 3,14	141,28 ± 4,92 ^{***}	164,38 ± 2,44 ^{§§}	104,68 ± 5,63 ^{†††}	178,33 ± 1,83	134,65 ± 5,56 ^{**}	166,05 ± 3,419 ^{§§}	91,68 ± 2,65 ^{†††}
Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001 проти групи гепатиту; ††P<0,01, †††P<0,001, NSP>0,05 проти лікування LOLA.								

Індукування токсичного гепатиту викликало пригнічення білковосинтезуючої функції печінки, сприяючи зниженню концентрації загального білка у крові та в печінці на 3 і 7 доби експерименту. Лікування препаратом LOLA сприяло покращенню білковосинтезуючої функції печінки та призвело до збільшення концентрації загального білка на 3 та 7 доби дослідження і в крові, і в печінці.

Однак, блокування синтезу поліамінів при введенні DFMO інгібувало здатність препарату LOLA підтримувати нормальний рівень білка у крові, і його рівень був знижений до $(44,83 \pm 1,24)$ г/л у групі LOLA + DFMO проти $(61,9 \pm 0,69)$ г/л у групі LOLA на 3 добу експерименту та до $(44,65 \pm 1,87)$ г/л у групі LOLA + DFMO проти $(63,68 \pm 1,38)$ г/л у групі LOLA на 7 добу, що свідчить про поліамін-залежний механізм реалізації цього ефекту.

Підтвердження пригнічення синтезу поліамінів під впливом LOLA+DFMO свідчить зменшення вмісту у гомогенатах печінки попередника синтезу поліамінів путресцину на 36,3 та 31,9 % відповідно на 3 та 7 доби експерименту порівняно з гепатитом, та на 41,8 та 44,8 % порівняно з LOLA.

Введення DFMO суттєво пригнітило здатність LOLA підтримувати вміст загального білка у печінці. На 3 добу дослідження його рівень знижувався на 12,4%, а на 7 добу на 27,0 %, що свідчить про асоційований із синтезом поліамінів механізм виникнення такого ефекту.

У таблиці 3.21 продемонстровані показники MCM_1 та MCM_2 у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при застосуванні LOLA за нормального та заблокованого синтезу поліамінів на 3 і 7 доби експерименту. Вміст MCM_1 та MCM_2 вірогідно зростав під впливом CCl_4 на 3 добу і утримувався на високому рівні на 7 добу експерименту. Лікування LOLA сприяло зниженню вмісту MCM_1 та MCM_2 . При паралельному застосуванні DFMO на 3 добу гепатиту не виникало порушення здатності LOLA пригнічувати продукцію MCM_1 : їх вміст складав $(0,34 \pm 0,01)$ Од/л у групі LOLA + DFMO проти $(0,32 \pm 0,01)$ Од/л у групі LOLA. Проте у динаміці блокування синтезу поліамінів набувало все більшого значення у механізмі дії LOLA, тому реверсувало ефект препарату, і

на 7 добу дослідження концентрація MCM_1 була достовірно вищою у групі LOLA + DFMO – $(0,34 \pm 0,01)$ Од/л проти $(0,29 \pm 0,01)$ Од/л у групі LOLA. У здатності LOLA пригнічувати продукцію MCM_2 , зумовлену ендотоксикозом, поліамін-залежний механізм дії проявлявся уже на ранніх термінах ендотоксикозу, тому їх вміст також залишався значно вищим на 3 та 7 доби дослідження (табл. 3.21). Активність глутатіон S-трансферази також пригнічувалася на 29,8 % при блокуванні синтезу поліамінів на 3 добу після розвитку гепатиту. Такі ж ефекти спостерігалися і на 7 добу експерименту, і активність ферменту достовірно знижувалася на 24,4 %.

Таким чином, ефекти LOLA щодо збереження активності глутатіон-S-трансферази при тетрахлорметановому гепатиті були реалізовані через механізм, асоційований із процесом синтезу поліамінів.

Гістологічно на 3 добу експерименту при корекції токсичного гепатиту LOLA у комбінації із DFMO в печінці візуалізувалось прогресування дистрофічно-некротичних змін порівняно не тільки з групою LOLA, а й зі змодельованим гепатитом. Часточкова структура порушувалась, балкова організація гепатоцитів не прослідковувалась. В клітинах централобулярних зон наростали прояви жирової та білкової гіаліново-крапельної дистрофії (рис. 3.3 DFMO (C)). В значній частині ядер проявлявся каріопікноз та каріорексис. В просвітах синусоїдів збільшувалась кількість еритроцитів, що свідчило про застійні явища. Судини залишались частково розширеними, деякі повнокровними. Периваскулярно візуалізувалась виражена лімфо-гістіоцитарна інфільтрація.

На 7 добу експериментального токсичного гепатиту у печінці тварин, яким вводили LOLA у комбінації з DFMO спостерігали глибокі деструктивні ураження. Центральні вени та судини портальних трактів залишались малокровними, просвіти синусоїдів не візуалізувались. Значна частина гепатоцитів централобулярних зон із дистрофічно-некротичними змінами.

Таблиця 3.21 – Показники ендотоксикозу у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
MCM ₁ (Од/л)	0,28 ± 0,01	0,39 ± 0,01 ^{***}	0,32 ± 0,01 ^{§§}	0,34 ± 0,01 ^{NS†}	0,28 ± 0,01	0,37 ± 0,01 ^{***}	0,29 ± 0,01 ^{§§}	0,34 ± 0,01 ^{††}
MCM ₂ (Од/л)	0,42 ± 0,01	0,67 ± 0,02 ^{***}	0,51 ± 0,01 ^{§§§}	0,70 ± 0,02 ^{†††}	0,41 ± 0,01	0,65 ± 0,01 ^{***}	0,49 ± 0,01 ^{§§§}	0,55 ± 0,01 ^{††}
GST (мкмоль/хв/мг)	1,81 ± 0,07	1,49 ± 0,03 ^{***}	1,61 ± 0,03 [§]	1,13 ± 0,06 ^{†††}	1,79 ± 0,05	1,13 ± 0,06 ^{***}	1,23 ± 0,06 ^{NS§}	0,93 ± 0,06 ^{††}
Примітка 1. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; ^{NS} P>0,05, [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01, ^{§§§} P<0,001 проти групи гепатиту; ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001, ^{NS†} P>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. MCM – молекули середньої маси, GST – глутатіон-S-трансфераза.								

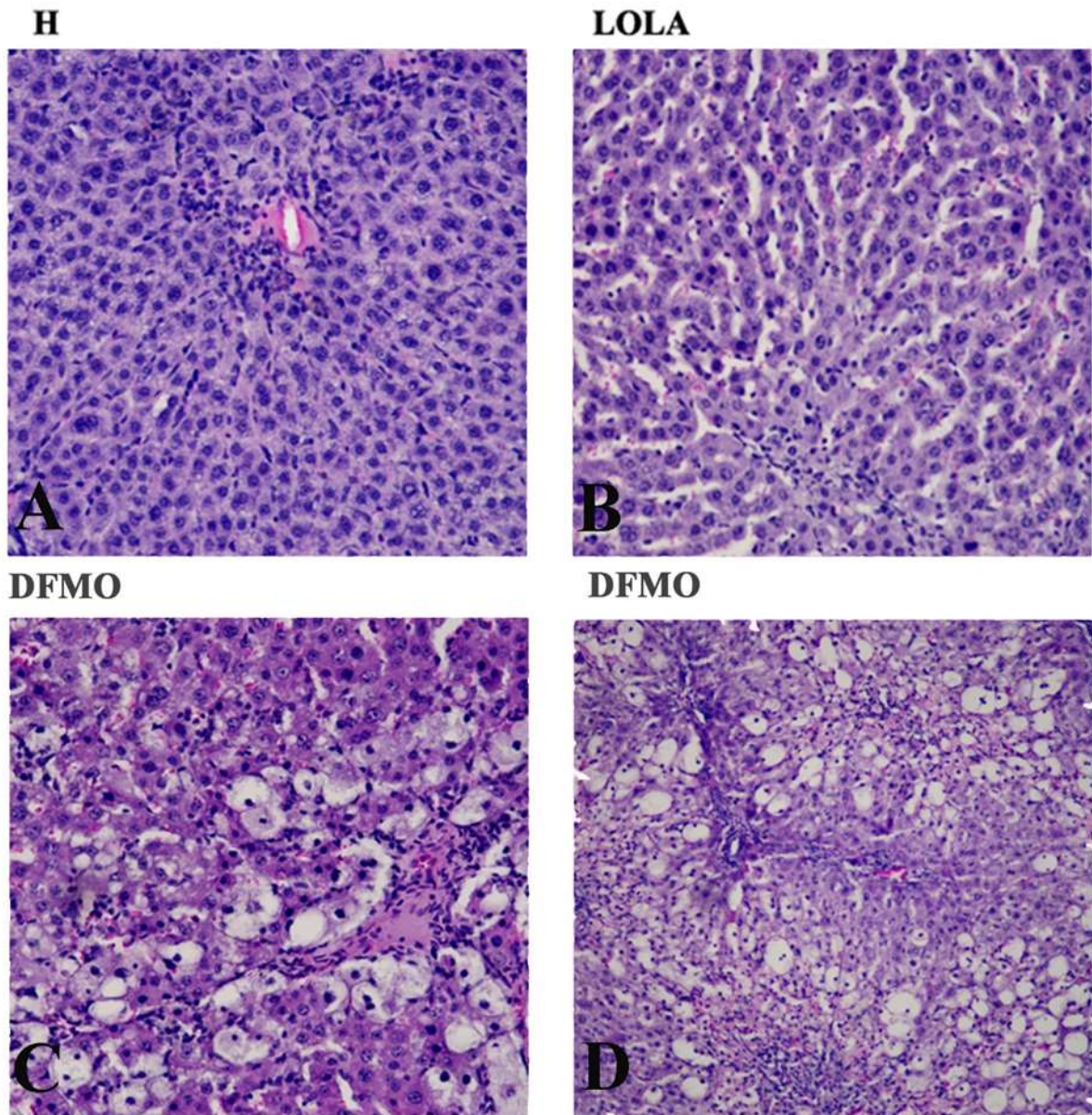


Рисунок 3.3 – Морфологічні зміни у печінці тварин при введенні LOLA у комбінації з DFMO при гострому токсичному гепатиті на 3 та 7 доби експерименту. Забарвлення гематоксиліном та еозином. **Н** – печінка на 7 добу після моделювання токсичного гепатиту тетрахлоретаном $\times 200$; **LOLA** – печінка на 7 добу після моделювання токсичного гепатиту та введенні LOLA $\times 200$; **DFMO (C)** – печінка на 3 добу після моделювання токсичного гепатиту та введенні LOLA у поєднанні з DFMO $\times 400$; **DFMO (D)** – печінка на 7 добу після моделювання токсичного гепатиту та введенні LOLA у поєднанні з DFMO $\times 100$.

Периваскулярно візуалізується лімфо-гістіоцитарна та вогнищева лейкоцитарна інфільтрація, поодинокі еритроцити (див. рис. 3.3 DFMO (D)). В портальних зонах клітини із переважанням жирової дистрофії та помірною периваскулярною лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією. У мізерній кількості відносно збережених гепатоцитів візуалізувались прояви переважно білкової дистрофії із вираженим порушенням міжклітинних контактів.

Отже, блокування синтезу поліамінів за введення LOLA при гепатиті веде до погіршення структури органу порівняно і з групою тварин, яким вводили LOLA, що підтверджується вираженою великокрапельною та дрібнокрапельною жировою дистрофією, гіаліново- крапельною білковою дистрофією гепатоцитів перипортальних трактів та помірною лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією на 3 добу експерименту, а на 7 добу відмічаються глибокі дистрофічно-некротичні зміни гепатоцитів у поєднанні із вираженою лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією стромі.

3.3.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за застосування L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при гострому токсичному гепатиті

Вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 діб експерименту наведено у таблиці 3.22. Після моделювання гепатиту у щурів спостерігалось підвищення сироваткового вмісту NO_2^- на 168 % через 3 доби та на 164,35 % через 7 діб експерименту, порівняно з контролем. У той же час печінковий вміст NO_2^- був знижений на 13,5 % та на 30,95 % на 3 і 7 добу, відповідно.

Лікування препаратом LOLA підсилювало синтез NO_2^- у сироватці на 23,0 % і на 26,51 % у печінці на 3 добу експерименту, проте на 7 добу – продукція NO_2^- у сироватці зменшилася на 23,64 %, хоча його вміст у печінці підвищився на 21,99 %.

При паралельному введенні DFMO у тварин з гепатитом на 3 добу дослідження пригнічувалася здатність LOLA посилювати продукцію NO_2^- як у

сироватці: $(2,55 \pm 0,07)$ мкг/л у групі LOLA+DFMO проти $(4,05 \pm 0,23)$ мкг/л у групі LOLA, так і в печінці: $(1,52 \pm 0,09)$ мкг/л у групі LOLA+DFMO проти $(2,35 \pm 0,17)$ мкг/л у групі LOLA. На 7 добу гепатиту застосування DFMO пригнітило здатність LOLA зменшувати вміст NO_2^- у сироватці: $(3,45 \pm 0,08)$ мкг/л у групі LOLA+DFMO проти $(2,43 \pm 0,16)$ мкг/л у групі LOLA, але заблокувало зумовлене LOLA зростання вмісту NO_2^- у печінці: $(0,91 \pm 0,04)$ мг/л у групі LOLA+DFMO проти $(1,64 \pm 0,05)$ мг/л у групі LOLA.

Отже, застосування DFMO призвело до блокування усіх властивостей LOLA щодо впливу на вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з гепатитом, що свідчить про критичну роль синтезу поліамінів у механізмі реалізації цих ефектів.

Динаміку змін вмісту ГПЛ та ТБК у печінці у щурів з CCl_4 -індукованим гепатитом при лікуванні LOLA та DFMO наведено у таблиці 3.23. Вміст ГПЛ значно зростав на 72,64 % на 3 добу після моделювання гепатиту і залишався підвищеним на 66,35 % на 7 добу експерименту. При введенні LOLA продукція ГПЛ достовірно пригнічувалася на 20,22 % та на 20,81 % через 3 і 7 діб, відповідно. При застосуванні DFMO препарат LOLA втратив свою здатність пригнічувати продукцію ГПЛ, і їхній вміст був значно вищим, порівнюючи із показниками щурів, пролікованих LOLA при заблокованому синтезі поліамінів: $(3,38 \pm 0,18)$ Од/г у групі LOLA + DFMO проти $(2,43 \pm 0,13)$ Од/г у групі LOLA на 3 добу дослідження. Через 7 діб ці показники склали $(3,57 \pm 0,18)$ Од/г у групі LOLA + DFMO проти $(2,28 \pm 0,06)$ Од/г у групі LOLA. Це свідчить асоційований із синтезом поліамінів механізм дії LOLA щодо пригнічення формування ГПЛ.

Вміст реактантів ТБК був значно підвищений у печінці на 21,26 % на 3 добу після введення CCl_4 . На 7 добу експерименту вміст реактантів ТБК був на 39,68 % більшим у тварин з гепатитом. При застосуванні LOLA на 3 добу спостерігалася тенденція до зниженого формування ТБК при ураженні печінки, однак, на 7 добу їх вміст був достовірно менший, ніж у нелікованих тварин з гепатитом.

Таблиця 3.22 – Концентрація нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
NO ₂ ⁻ у сироватці (мкг/л)	1,23 ± 0,06	3,29 ± 0,24 ^{***}	4,05 ± 0,23 [§]	2,55 ± 0,07 ^{†††}	1,21 ± 0,05	3,19 ± 0,04 ^{***}	2,43 ± 0,16 ^{§§}	3,45 ± 0,08 ^{††}
NO ₂ ⁻ у печінці (мг/л)	2,14 ± 0,07	1,85 ± 0,09 [*]	2,35 ± 0,17 [§]	1,52 ± 0,09 ^{††}	1,95 ± 0,07	1,35 ± 0,03 ^{***}	1,64 ± 0,05 ^{§§}	0,91 ± 0,04 ^{†††}
Примітка. *P<0,05, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01 проти групи гепатиту; ††P<0,01, †††P<0,001, NSP>0,05 проти лікування LOLA.								

Таблиця 3.23 – Показники прооксидантної системи у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Конт- роль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
ТБК у печінці (мкмоль /кг)	704,32 ± 6,36	854,06 ± 30,48 ^{**}	774,99 ± 14,50 ^{§§}	979,55 ± 24,24 ^{†††}	637,65 ± 33,94	890,66 ± 33,81 ^{**}	674,91 ± 27,64 ^{§§}	987,11 ± 23,6 ^{†††}
ГПЛ (Од/г)	1,77 ± 0,14	3,05 ± 0,13 ^{***}	2,43 ± 0,13 [§]	3,38 ± 0,18 ^{††}	1,74 ± 0,16	2,88 ± 0,13 ^{**}	2,28 ± 0,06 ^{§§}	3,57 ± 0,18 ^{†††}
Примітка 1. Примітка. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01 проти групи гепатиту; ††P<0,01, †††P<0,001 проти лікування LOLA. Примітка 2. ТБК – активні продукти тіобарбітурової кислоти, ГПЛ – гідропероксили ліпідів.								

Введення DFMO реверсувало індуковане LOLA пригнічення формування ТБК. На 3 день експерименту їх вміст складав ($979,55 \pm 24,24$) мкмоль/кг у групі LOLA + DFMO проти ($774,99 \pm 14,50$) мкмоль/кг у групі LOLA, а на 7 день – ($987,11 \pm 23,6$) мкмоль/кг у групі LOLA + DFMO проти ($674,91 \pm 27,64$) мкмоль/кг у групі LOLA. Отже, LOLA пригнічує формування ТБК через механізм, пов'язаний із синтезом поліамінів.

Активність каталази у печінці та сироватці та вміст відновленого GSH у щурів з тетрахлорметановим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту відображено у таблиці 3.24.

У щурів із змодельованим гепатитом активність каталази у печінці значно знизилася на 3 добу експерименту, проте її активність у сироватці зростала. Через 7 діб після моделювання токсичного гепатиту активність каталази у печінці залишалася пригніченою, а у сироватці – підвищеною. Лікування LOLA сприяло зростанню активності ферменту у печінці на 18,78 % і знизило його активність у сироватці на 14,37 % на 3 добу експерименту, а на 7 добу дослідження активність ферменту у печінці зросла на 25,40 % і у сироватці зменшилась на 17,33 %.

Застосування DFMO заблокувало всі вищеперелічені ефекти LOLA. На 3 добу експерименту активність каталази у печінці була зниженою до ($142,6 \pm 2,19$) мкмоль/хв×мг у групі LOLA + DFMO проти ($190,01 \pm 5,62$) мкмоль/хв×мг у групі LOLA, а у сироватці – підвищеною до ($20,45 \pm 0,71$) кат/л у групі LOLA + DFMO проти ($18,05 \pm 0,75$) кат/л у групі LOLA. На 7 день дослідження активність каталази у печінці була зниженою до ($150,1 \pm 4,45$) мкмоль/хв×мг у групі LOLA + DFMO проти ($212,08 \pm 10,60$) мкмоль/хв×мг у групі LOLA, а у сироватці – підвищеною до ($20,33 \pm 0,72$) кат/л у групі LOLA + DFMO проти ($15,66 \pm 0,41$) кат/л у групі LOLA.

При гепатиті рівень відновленого глутатіону знижувався. Лікування LOLA сприяло інтенсивному підвищенню концентрації GSH.

Ефекти LOLA щодо відновленого GSH були реалізовані через механізм, асоційований із синтезом поліамінів, блокування продукції яких призводило до зменшення його вмісту на 3 і 7 доби дослідження: $(1,93 \pm 0,04)$ мкмоль/г у групі LOLA+DFMO проти $(4,15 \pm 0,24)$ мкмоль/г у групі LOLA на 3 добу і $(1,8 \pm 0,09)$ мкмоль/г у групі LOLA+DFMO проти $(3,98 \pm 0,23)$ мкмоль/г у групі LOLA на 7 добу.

У таблиці 3.25 наведені показники активності сукцинатдегідрогенази, супероксиддисмутази та вмісту цитохромоксидази у щурів з токсичним гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту.

Активність СДГ була знижена на 23,46 % у щурів через 3 доби після введення CCl_4 та на 11,79 % на 7 добу дослідження. Застосування LOLA сприяло достовірному підвищенню активності фермента на 5,42 % через 3 доби і на 6,60 % через 7 діб експерименту. При блокуванні синтезу поліамінів активність СДГ, яка становила $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг у щурів з гепатитом при лікуванні LOLA на 3 добу і $(7,57 \pm 0,11)$ мкмоль/хв/кг на 7 добу, достовірно зменшилася під впливом DFMO до $(6,29 \pm 0,09)$ мкмоль/хв/кг та до $(6,18 \pm 0,14)$ мкмоль/хв/кг, відповідно.

Після моделювання гепатиту активність ЦХО пригнічувалася на 25 % і на 21,26 % на 3 і 7 доби експерименту. Препарат LOLA проявив свою ефективність у відновленні активності фермента, викликаючи підвищення його функції на 8,85 % на 3 добу і на 14 % на 7 добу експерименту. Заблокувавши продукцію поліамінів, ці властивості LOLA втрапилися, і активність фермента залишалася такою ж низькою, як у тварин з гепатитом: $(6,12 \pm 0,12)$ ммоль/кг у групі LOLA + DFMO проти $(7,18 \pm 0,16)$ ммоль/кг у групі LOLA на 3 добу дослідження, і $(6,36 \pm 0,14)$ ммоль/кг у групі LOLA + DFMO проти $(7,84 \pm 0,17)$ ммоль/кг у групі LOLA на 7 добу.

При токсичному ураженні печінки вміст церулоплазміну у щурів підвищувався на 31,94 % та на 23,23 %, а лікування LOLA викликало його зниження на 14,48 % та на 9,91 % на 3 і 7 доби дослідження.

Таблиця 3.24 – Активність каталази у печінці та сироватці, вміст GSH у печінці щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
Каталаза в печінці (мкмоль/хв×мг)	203,01 ± 10,02	159,96 ± 9,75*	190,01 ± 5,62 [§]	142,6 ± 2,19 ^{†††}	200,33 ± 9,24	169,12 ± 6,60*	212,08 ± 10,60 [§]	150,1 ± 4,45 ^{††}
Каталаза сироватки (кат/л)	14,71 ± 0,46	21,08 ± 0,62 ^{***}	18,05 ± 0,75 [§]	20,45 ± 0,71 ^{†††}	14,58 ± 0,40	18,94 ± 0,3 ^{***}	15,66 ± 0,41 ^{§§§}	20,33 ± 0,72 ^{††}
GSH (мкмоль/г)	2,71 ± 0,21	2,35 ± 0,22 ^{NS*}	4,15 ± 0,24 ^{§§}	1,93 ± 0,04 ^{†††}	2,64 ± 0,17	2,12 ± 0,11*	3,98 ± 0,23 ^{§§§}	1,8 ± 0,09 ^{†††}
Приміт *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ^{NS} P>0,05 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01, ^{§§§} P<0,001, ^{NS§} P>0,05 проти групи гепатиту; ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001 проти лікування LOLA.								

Таблиця 3.25 – Активність сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази та вміст церулоплазміну у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
СДГ (мкмоль/хв/кг)	8,85 ± 0,1	6,78 ± 0,11 ^{***}	7,14 ± 0,08 [§]	6,29 ± 0,09 ^{††}	8,05 ± 0,14	7,1 ± 0,09 ^{**}	7,57 ± 0,11 [§]	6,18 ± 0,14 ^{†††}
ЦХО (ммоль/кг)	8,8 ± 0,27	6,6 ± 0,17 ^{***}	7,18 ± 0,16 [§]	6,12 ± 0,12 ^{††}	8,73 ± 0,24	6,88 ± 0,14 ^{***}	7,84 ± 0,17 ^{§§}	6,36 ± 0,14 ^{†††}
Церулоплазмін (мг/л)	244,27 ± 4,18	322,29 ± 10,10 ^{***}	275,63 ± 10,13 [§]	286,58 ± 6,03 ^{NS}	226,04 ± 4,57	278,54 ± 7,99 ^{**}	250,94 ± 4,22 [§]	154,58 ± 8,81 ^{†††}
Примітка. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01 проти групи гепатиту; [†] P<0,05, ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001, ^{NS} P>0,05 проти лікування LOLA.								

Застосування DFMO поряд із LOLA пригнітило здатність препарату запобігати зростанню білка, і його вміст залишався високим, особливо на пізній термін (табл. 3.25). Таким чином, показники концентрації церулоплазміну сягали $(317,92 \pm 12,29)$ мг/л у групі LOLA + DFMO проти $(275,63 \pm 10,13)$ мг/л у групі LOLA на 3 добу, а на 7 добу – $(154,58 \pm 8,81)$ мг/л у групі LOLA + DFMO проти $(250,94 \pm 4,22)$ мг/л у групі LOLA.

Таке достовірне зниження вмісту церулоплазміну на 7 добу експерименту пояснюється пригніченням синтезу цього мідьвмісного білка у печінці під впливом DFMO [240], а його наростання на 3 добу експерименту виникає внаслідок вираженого цитолізу гепатоцитів.

У таблиці 3.26 наведені показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn-супероксиддисмутази, супероксиддисмутази загальної та загальної антиоксидантної активності у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту.

У щурів із ураженням печінки на 3 добу дослідження активність Mn-СОД пригнітилася на 4,74 %, Cu,Zn-СОД – вдвічі, а СОД загальної – на 26,52 %. На 7 добу після моделювання гепатиту активність Mn-СОД у печінці була знижена на 16,8 %, активність Cu, Zn-СОД – на 54,72 %, а СОД загальної – на 32,52 %.

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA через 3 доби сприяла вираженому зростанню активності Mn-СОД на 19,75 %, Cu,Zn-СОД – 25,12 %, а СОД загальної – на 21,8 %, порівнюючи з групою нелікованих щурів. На 7 добу дослідження введення LOLA запобігало інгібуванню цих ферментів: активність Mn-СОД, Cu,Zn-СОД та СОД загальної підвищувалася на 19,53 %, на 56,52 % і на 12,87 %, відповідно.

Введення DFMO реверсувало здатність LOLA підвищувати активність Mn-СОД при гепатиті на фоні заблокованого синтезу поліамінів, і її показники склали $(3,64 \pm 0,10)$ ОД/мг у групі LOLA + DFMO проти $(5,97 \pm 0,30)$ ОД/мг у групі LOLA на 3 добу експерименту та $(3,38 \pm 0,15)$ ОД/мг проти $(6,28 \pm 0,18)$ ОД/мг, відповідно, на 7 добу.

Таблиця 3.26 – Показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn- супероксиддисмутази, супероксиддисмутази загальної та загальної антиоксидантної активності у щурів з CCl₄-індукованим гепатитом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 доби експерименту

Показник	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO	Контроль	Гепатит	Гепатит +LOLA	Гепатит +LOLA + DFMO
	3 доба				7 доба			
Mn-СОД (ОД/мг)	5,24 ± 0,20	4,99 ± 0,10 ^{NS*}	5,97 ± 0,30 [§]	3,64 ± 0,10 ^{†††}	6,32 ± 0,12	5,26 ± 0,18 ^{**}	6,28 ± 0,18 ^{§§}	3,38 ± 0,15 ^{†††}
Cu,Zn-СОД (ОД/мг)	5,21 ± 0,20	2,54 ± 0,21 ^{***}	3,17 ± 0,28 ^{NS§}	2,74 ± 0,18 ^{NS}	4,57 ± 0,20	2,07 ± 0,06 ^{***}	3,24 ± 0,36 [§]	2,63 ± 0,24 ^{NS}
СОД загальна у печінці (ОД/мг)	10,25 ± 0,25	7,53 ± 0,11 ^{***}	9,17 ± 0,05 ^{§§§}	6,58 ± 0,16 ^{†††}	10,89 ± 0,08	7,35 ± 0,11 ^{***}	8,3 ± 0,25 [§]	5,78 ± 0,32 ^{††}
ЗАА (мкмоль АВТС× г ⁻¹)	55,20 ± 0,80	46,03 ± 2,08 ^{**}	57,70 ± 2,53 ^{§§}	49,08 ± 0,79 [†]	61,43 ± 0,37	53,92 ± 1,18 ^{***}	58,37 ± 1,19 [§]	55,25 ± 1,12 ^{NS}
Примітка 1. **P<0,01, ***P<0,001, NS*P>0,05 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01, §§§P<0,001, NS§P>0,05 проти групи гепатиту; †P<0,05, ††P<0,01, †††P<0,001 NSP>0,05 проти лікування LOLA.								
Примітка 2. ЗАА – загальна антиоксидантна активність, АВТС-2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазоліно-6-сульфонова кислота).								

У той же час, достовірних змін у ефектах LOLA щодо впливу на активність фермента Cu,Zn-СОД не виникло: $(2,74 \pm 0,18)$ ОД/мг у групі LOLA + DFMO проти $(3,17 \pm 0,28)$ ОД/мг у групі LOLA на 3 добу експерименту та $(2,63 \pm 0,24)$ ОД/мг проти $(3,24 \pm 0,36)$ ОД/мг на 7 добу.

Однак, активність СОД загальної, пригнічення якої внаслідок гепатиту було попереджене лікуванням LOLA, зменшилася на фоні застосування DFMO до $(6,58 \pm 0,16)$ ОД/мг проти $(9,17 \pm 0,05)$ ОД/мг у групі LOLA на 3 добу експерименту та до $(5,78 \pm 0,32)$ ОД/мг у групі LOLA + DFMO проти $(8,3 \pm 0,25)$ ОД/мг при нормальному синтезі поліамінів на 7 добу.

Загальна антиоксидантна активність при моделюванні токсичного гепатиту була пригнічена на 16,6 % на 3 добу дослідження і на 7 добу залишалася зниженою на 12,24 %, порівняно зі здоровими тваринами. Застосування препарату LOLA призводило до значного підвищення ЗАА на 25,34 % через 3 доби після індукування гепатиту та на 8,25 % через 7 діб.

Блокування синтезу поліамінів пригнітило здатність LOLA відновлювати ЗАА при гепатиті, і її показники склали: $(49,08 \pm 0,79)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ у групі LOLA + DFMO проти $(57,70 \pm 2,53)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ у групі LOLA на 3 добу дослідження. Інгібування функції LOLA під впливом DFMO відбувалося і на 7 добу, проте різниця між показниками у групах LOLA + DFMO та LOLA була недостовірною: $(55,25 \pm 1,12)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$ проти $(58,37 \pm 1,19)$ мкмоль АВТС \times г $^{-1}$.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про те, що процес синтезу поліамінів відіграє надзвичайно важливу роль у механізмі протективної дії LOLA в умовах токсичного гепатиту як у гострому періоді, так і в динаміці, оскільки застосування DFMO реверсує більшість ефектів препарату у попередженні розвитку патологічних синдромів, що супроводжують тетрахлорметан-індуковане ураження печінки.

Базуючись на результатах представлених у даному розділі можна зробити такі висновки:

1. Про розвиток гострого токсичного ураження печінки судили за гістологічними змінами, які характеризуються порушенням структури часточки, вираженими ушкодженнями цетролобулярних гепатоцитів з проявами жирової дистрофії та некрозів. Встановлено, що при гострому гепатиті спостерігається наростання активності ферментів цитолізу та холестазу, пригнічується білок- та поліамін-синтетезуюча функція печінки, наростають явища ендотоксикозу з пригніченням процесів детоксикації в органі, порушується баланс системи прооксиданти-антиоксиданти, функціонування електрон-транспортної системи мітохондрій.

2. Препарат LOLA при гострому токсичному гепатиті сприяє відновленню морфофункціонального стану печінки, а саме зменшуються дистрофічно-некротичні прояви та відновлюється балкова організація гепатоцитів. Протективні властивості біохімічно проявляються зниженням показників цитолізу та холестазу, підвищенням синтезу білка, сечовини та поліамінів, зменшенням явища ендотоксикозу, пригніченням процесів ліпопероксидації з одночасним відновленням стану антиоксидантої системи, нормалізацією функціонування системи оксиду азоту та мітохондріального дихання.

3. Блокада синтезу оксиду азоту, шляхом застосування L-NAME у щурів із токсичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA сповільнило відновлення гепатоцитів в ділянці портальних трактів, структури балкової організації, посиленням лімфо-гістіоцитарної інфільтрації портальних трактів, що свідчить про залежність гепатопротективної дії препарату від інтенсивності синтезу нітроген оксиду. Встановлено, що пригнічення цитолізу, холестазу та ендотоксикозу, активація мітохондріального дихання за введення LOLA відбувається через NO-залежний механізм. Щодо впливу на процеси ліпопероксидації та стан антиоксидантної системи, то ці ефекти LOLA реалізує не тільки через систему L-аргінін-NO. Блокування синтезу NO не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, активність ізоформ СОД, рівень ТБК-активних продуктів. Разом з

тим, встановлено залежність між рівнем продукції NO та синтезом ГПЛ, відновленого глутатіону, активності каталази.

4. Результати наших досліджень свідчать, що застосування блокатора синтезу поліамінів DFMO у щурів із токсичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA реверсує більшість ефектів препарату у попередженні розвитку патологічних синдромів, що супроводжують тетрахлорметан-індуковане ураження печінки. Зміна морфологічної будови печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичними змінами як в центролобулярних зонах, так і по всій часточці у поєднанні із запальною інфільтрацією.

Результати представлені в даному розділі опубліковано в таких працях [241, 242, 243, 244, 245, 246, 247].

РОЗДІЛ 4
ВИВЧЕННЯ РОЛІ СИСТЕМИ NO ТА СИНТЕЗУ ПОЛІАМІНІВ
У МЕХАНІЗМІ ДІЇ L-АРГІНІНУ L-АСПАРТАТУ
ПРИ ЦИРОЗІ ПЕЧІНКИ

4.1 Вивчення ефективності L-аргініну L-аспартату при цирозі

4.1.1 Зміни морфофункціонального стану печінки при цирозі та за умови корекції L-аргініном L-аспартатом

Цироз печінки у щурів моделювали шляхом введення чотирихлористого вуглецю упродовж 12 тижнів. Фармакологічна корекція із застосуванням L-аргініну L-аспартату тривала упродовж 10 діб.

Гістологічне дослідження печінки тварин із модельованим цирозом встановило пошкодження часточкової будови, що проявлялось формуванням в паренхімі значних полів фіброзу у поєднанні із вираженою лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією та появою псевдочасточок (рис. 4.1 А). В колагеновій стромі візуалізувались дрібні повнокровні судини з помірним периваскулярним набряком. В окремих часточках не візуалізувались центральні вени та синусоїди, спостерігалось нагромадження гепатоцитів у вигляді вузлів регенерації (рис. 4.1 А). Значна частина клітин зазнала виражених дистрофічних та некротичних змін із різною поширеністю. Гепатоцити мали різні розміри та форми із розмитими лініями клітинних мембран. Балкова організація не прослідковувалась.

Цитоплазма гепатоцитів слабо просвітлена, гіпохромна, часто зерниста, містить дрібні вакуолі. Багато гепатоцитів мають збережену форму, але не містять ядро. У деяких гепатоцитах ядра фрагментовані, подекуди клітини містять тільки фрагменти ядер не зв'язані один з одним. У портальних зонах візуалізується лімфоцитарна інфільтрація, із посиленою гіперплазією фібробластів та збільшенням кількості колагенових волокон у пухкій сполучній тканині.

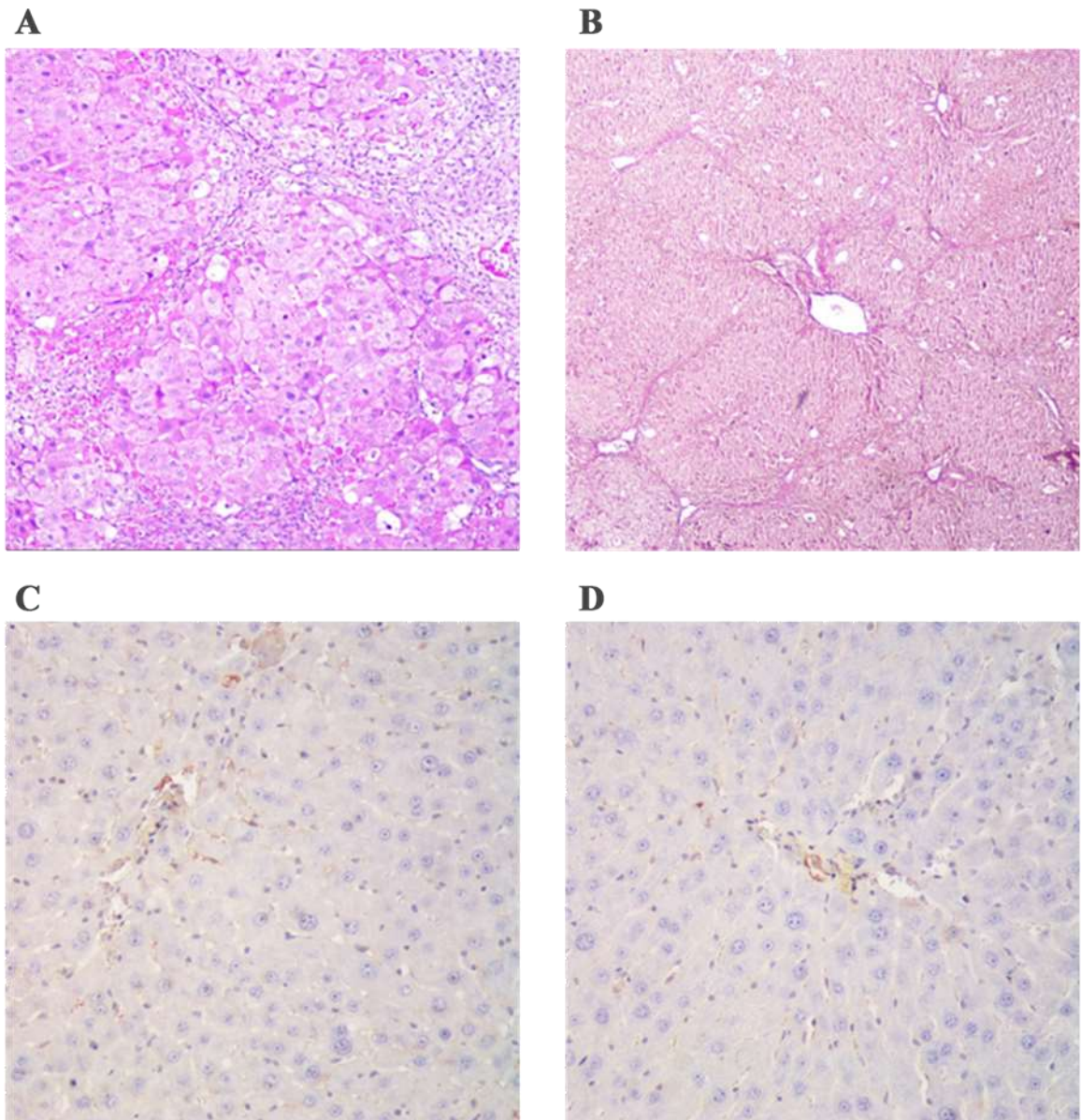


Рисунок 4.1 – Морфологічні зміни у печінці тварин із модельованим CCl_4 цирозом. А – забарвлення гематоксилином та еозином $\times 200$; В – забарвлення за Вейгертом та ван Гізоном $\times 100$; С – ІГХ дослідження. Експресія $\text{TNF-}\alpha$ на мембранах клітин Купфера в просвітах синусоїдів $\times 200$; D – ІГХ дослідження. Експресія $\text{TGF-}\beta$ в ділянках епітеліально-мезенхімальних переходів просвітів синусоїдів $\times 200$.

У перилобулярній та міжлобулярній зонах класичних печінкових часточок наявні гіпертрофовані фібробласти та пучки колагенових волокон, некротизовані гепатоцити, чисельні гепатоцити з пікнотичними ядрами.

Забарвлення за Вейгертом та ван Гізоном (рис. 4.1 В) вказує на формування полів фіброзу із ділянок портальних трактів по ходу синусоїдів. Як відповідь на хронічне токсичне ураження печінки в просвітах синусоїдів зростає кількість клітин Купфера, на мембранах яких візуалізується активація TNF- α (рис. 4.1 С), що свідчить про збільшення цитокінового профілю. Про посилення руйнації гепатоцитів із активацією печінкових зірчастих клітин та фібробластів свідчить наявність TGF- β фактора в ділянках епітеліально-мезенхімальних переходів просвітів синусоїдів та в периваскулярних зонах портальних трактів (рис. 4.1), що підтверджує появу фібробластів, стимуляцію формування колагенових волокон в позаклітинному матриксі (рис. 4.1 D).

Гістологічне дослідження печінки дослідних тварин із модельованим цирозом та корекцією LOLA протягом 10 діб виявило часткове проте суттєве відновлення структури органа. Будова часточок помірно відновлювалась, зменшувалась площа фіброзних полів, значно зменшувалась лімфо- та гістіоцитарна інфільтрація, особливо перипортальних полів. Кількість псевдочасточок залишалась незмінною, проте у збережених часточках значно відновлювалась балкова організація гепатоцитів, зменшувались прояви білкової дистрофії гепатоцитів, відповідно і некротичних проявів (рис. 4.2 А). В окремих часточках візуалізувались помірно розширені та повнокровні центральні вени та дещо повнокровні синусоїди. Портальні поля містили значну частину колагенових волокон, проте їх площа значно зменшувалась, на що вказує гістохімічне дослідження (рис. 4.2 В). Поряд із цим спостерігалось зниження периваскулярного набряку. Експресія цитокінів в просвітах синусоїдів різко зменшувалася, про що свідчить відсутність TNF- α на мембранах поодиноких клітин Купфера у просвітах синусоїдів (рис. 4.2 С). Значно знижувалась активність трансформуючого фактора росту TGF- β як на мембранах синусоїдів так і в екстрацелюлярному матриксі навколо судин портальних трактів (рис. 4.2 D).

У тварин із цирозом печінки спостерігалися різко виражені симптоми печінкового цитолізу, що проявлялося зростанням активності амінотрансфераз:

АЛТ – майже вдвічі із $(48,82 \pm 1,86)$ ОД/л у контрольній групі до $(87,45 \pm 3,68)$ ОД/л у групі цирозу і АСТ – у більш, ніж втричі, – $(321,40 \pm 3,22)$ ОД/л у щурів з патологією проти $(97,57 \pm 3,01)$ ОД/л у здорових тварин (табл. 4.1).

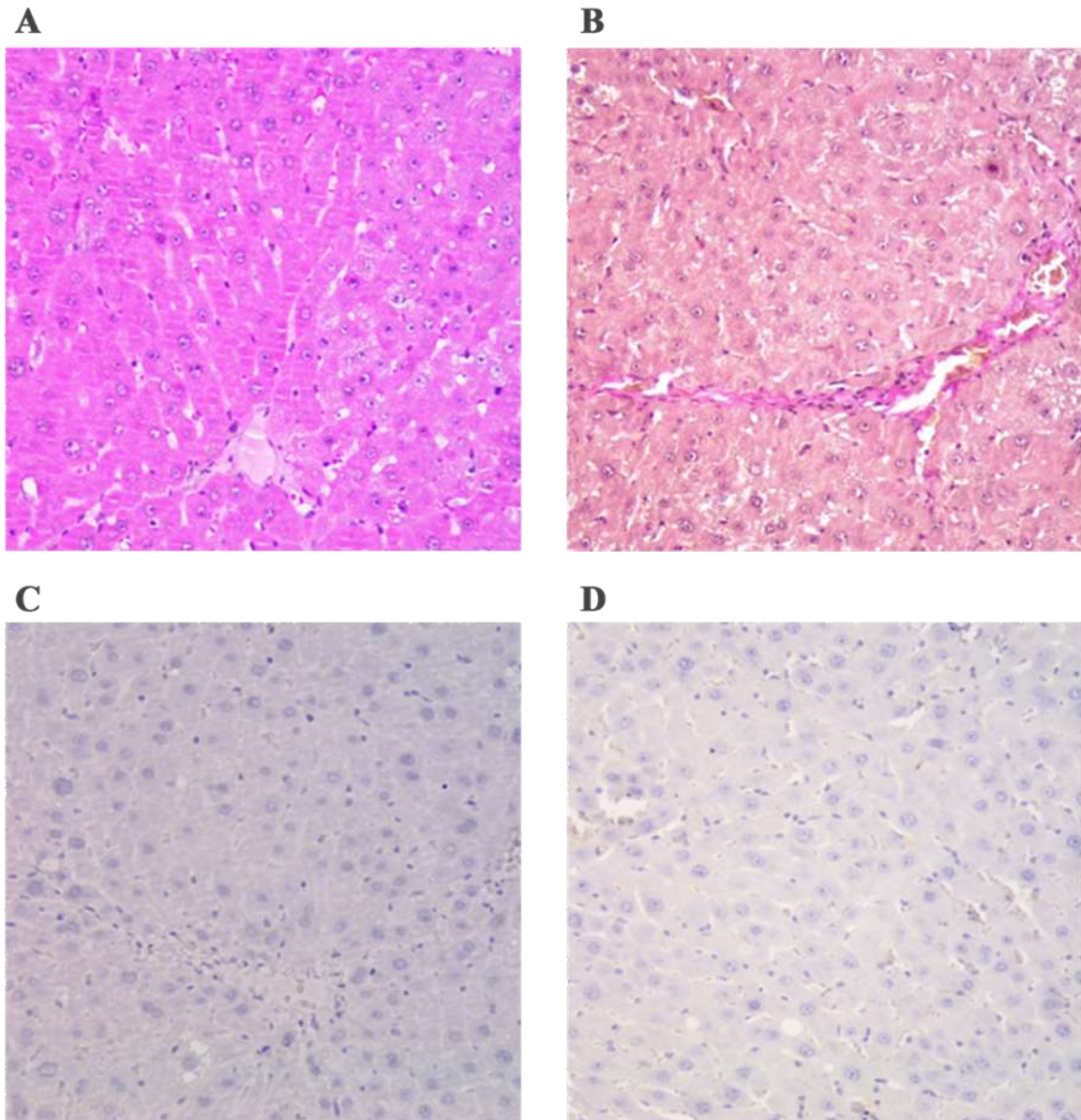


Рисунок 4.2 – Морфологічні зміни у печінці тварин із модельованим CCl_4 цирозом та при корекції LOLA. А – забарвлення гематоксиліном та еозином $\times 200$; В – забарвлення за Вейгертом та ван Гізоном $\times 200$; С – ІГХ дослідження. Експресія $\text{TNF-}\alpha$ на мембранах клітин Купфера не візуалізується $\times 200$; D – ІГХ дослідження. Поодинокі ділянки візуалізації $\text{TGF-}\beta$ в просвітах синусоїдів $\times 200$.

Таблиця 4.1 – Активність АЛТ і АСТ у щурів із цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
АЛТ (ОД/л)	48,82 ± 1,86	87,45 ± 3,68***	72,52 ± 2,90 [§]
АСТ (ОД/л)	97,57 ± 3,01	321,40 ± 3,22***	295,00 ± 7,77 [§]
Примітка 1. ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05 проти групи цирозу. Примітка 2. АЛТ – аланінамінотрансфераза, АСТ – аспартатамінотрансфераза.			

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA ефективно запобігала зростанню активності амінотрансфераз, таким чином попереджаючи розвиток синдрому цитолізу. При застосуванні препарату показники амінотрансфераз залишалися достовірно нижчими у щурів із ураженням печінки: (72,52 ± 2,90) ОД/л у групі LOLA проти (87,45 ± 3,68) ОД/л у групі цирозу для АЛТ та (295,00 ± 7,77) ОД/л у групі LOLA проти (321,40 ± 3,22) ОД/л у групі цирозу для АСТ.

Отже, при експериментальному цирозі у щурів препарат LOLA проявляє протективні властивості, зменшуючи появи синдрому цитолізу.

Моделювання цирозу сприяло розвитку вираженого холестазу, внаслідок чого активність ЛФ зросла вдвічі з (184,67 ± 9,86) ОД/л у групі контролю до (327,86 ± 18,72) ОД/л у групі цирозу, а ГГТ – у понад 4 рази з (0,85 ± 0,11) ОД/л у групі контролю до (3,57 ± 0,19) ОД/л у групі цирозу.

Лікування за допомогою LOLA сприяло зменшенню проявів холестазу, про що свідчить достовірне зниження активності ЛФ до (265,15 ± 16,40) ОД/л проти (327,86 ± 18,72) ОД/л у групі цирозу, та ГГТ – до (2,03 ± 0,18) ОД/л проти (3,57 ± 0,19) ОД/л у групі цирозу (табл. 4.2).

Рівні ЗБ та ЗХ також зазнали вираженого підвищення у щурів із цирозом, що може служити маркером холестазу. Таким чином, ми спостерігали зростання вмісту ЗБ із (6,49 ± 0,47) ммоль/л у контрольній групі до (26,55 ± 1,89) ммоль/л у групі цирозу – у 4 рази. У свою чергу, вміст ЗХ збільшився у 4 з половиною разів із (2,03 ± 0,09) мкмоль/л до (9,30 ± 0,39) мкмоль/л.

Таблиця 4.2 – Активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ у щурів з цирозом при застосуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
ЛФ (ОД/л)	184,67 ± 9,86	327,86 ± 18,72 ^{***}	265,15 ± 16,40 [§]
ГГТ (ОД/л)	0,85 ± 0,11	3,57 ± 0,19 ^{***}	2,03 ± 0,18 ^{§§}
ЗБ (ммоль/л)	6,49 ± 0,47	26,55 ± 1,89 ^{***}	18,40 ± 0,80 ^{§§}
ЗХ (мкмоль/л)	2,03 ± 0,09	9,30 ± 0,39 ^{***}	8,20 ± 0,21 [§]
Примітка 1. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01 проти групи цирозу. Примітка 2. ЛФ – лужна фосфатаза, ГГТ – гамма-глутамілтрансфераза, ЗБ – загальний білірубін, ЗХ – загальний холестерол.			

Лікування, яке здійснювали за допомогою LOLA, сприяло зниженню концентрації ЗБ до (18,40 ± 0,80) ммоль/л проти (26,55 ± 1,89) ммоль/л у групі цирозу, а рівень ЗХ зменшився до (8,20 ± 0,21) мкмоль/л проти (9,30 ± 0,39) мкмоль/л у групі нелікованих щурів.

Отже, при цирозі печінки у щурів препарат LOLA проявив виражену активність у відновленні морфофункціонального стану печінки, запобігаючи прогресуванню синдромів цитолізу та холестазу.

4.1.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за введення L-аргініну L-аспартату при цирозі печінки

У таблиці 4.3 наведені показники метаболічної та синтезуючої функції печінки, а саме: концентрація сечовини, загального білка у крові і печінці та NO₂⁻ у сироватці і печінці у щурів із цирозом на фоні корекції за допомогою LOLA.

В умовах моделювання цирозу у щурів рівень сечовини зазнав вираженого зниження із (7,50 ± 0,40) ммоль/л у групі контролю до (4,87 ± 0,24) ммоль/л, що свідчить про суттєве пригнічення синтезуючої та дезінтоксикаційної функції печінки.

Таблиця 4.3 – Зміни показників синтезуючої функції печінки у щурів із цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
Сечовина (ммоль/л)	7,50 ± 0,40	4,87 ± 0,24**	6,10 ± 0,20 ^{§§}
Загальний білок у крові (г/л)	77,82 ± 0,34	65,63 ± 1,46***	80,07 ± 3,31 ^{§§}
Загальний білок у печінці (мг/г)	135,30 ± 2,54	101,29 ± 4,92***	118,98 ± 2,85 [§]
Путресцин у печінці (нмоль/мг)	182,01 ± 5,14	120,25 ± 3,92***	155,38 ± 2,44 ^{§§}
NO ₂ ⁻ у сироватці (мкг/л)	1,18 ± 0,06	3,35 ± 0,21***	2,38 ± 0,18 [§]
NO ₂ ⁻ у печінці (мг/л)	2,28 ± 0,11	1,85 ± 0,11*	2,35 ± 0,18 [§]
Примітка. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01 проти групи цирозу.			

Фармакологічна корекція у щурів із цирозом печінки за допомогою LOLA сприяла підвищенню рівня сечовини на 25,41 % до (6,10 ± 0,20) ммоль/л проти (4,87 ± 0,24) ммоль/л у групі нелікованих тварин.

Тривале індукування ураження печінки тетрахлорметаном з розвитком цирозу зумовило інгібування її білок-синтезуючої функції, сприяючи зниженню концентрації загального білка у крові з (77,82 ± 0,34) г/л у групі контролю до (65,63 ± 1,46) г/л у групі цирозу та у печінці з (135,30 ± 2,54) мг/г у групі контролю до (101,29 ± 4,92) мг/г у групі цирозу. Однак, застосування LOLA з лікувальною метою попередило порушення метаболічної функції печінки, що призвело до збереження достовірно вищого вмісту білка у крові та печінці. Таким чином, у групі LOLA рівень білка крові склав (80,07 ± 3,31) г/л проти (65,63 ± 1,46) г/л у групі цирозу, а у печінці він становив (118,98 ± 2,85) мг/г у групі щурів із цирозом, пролікованих LOLA, проти (101,29 ± 4,92) мг/г у групі тварин, що не отримували лікування.

Після моделювання цирозу у щурів спостерігалось підвищення сироваткового вмісту нітрит-аніона (NO_2^-) майже втричі з $(1,18 \pm 0,06)$ мкг/л у здорових тварин до $(3,35 \pm 0,21)$ мкг/л при патології печінки. У той же час печінковий вміст NO_2^- був знижений із $(2,28 \pm 0,11)$ мг/л у групі контролю до $(1,85 \pm 0,11)$ мг/л у щурів із цирозом.

Лікування препаратом LOLA попередило індуковане цирозом підвищення NO_2^- у сироватці, і його вміст склав $(2,38 \pm 0,18)$ мкг/л у пролікованих щурів проти $(3,35 \pm 0,21)$ мг/л у групі цирозу. Препарат також чинив виражений вплив на вміст NO_2^- у печінці, попереджаючи зниження аніону, і його показник залишався на такому ж рівні, як у групі здорових тварин та достовірно вищим, ніж у щурів з патологією, які не отримували лікування: $(2,35 \pm 0,18)$ мг/л у групі LOLA проти $(1,85 \pm 0,11)$ мг/л у групі цирозу.

Отже, на фоні введення LOLA порушення метаболізму, зумовлене цирозом печінки у щурів, яке проявлялось вираженим зниженням вмісту загального білка в крові та печінці та зменшенням концентрації сечовини, синтезуюча функція печінки залишалася збереженою, і обмінні процеси не були пригнічені настільки ж інтенсивно, як у нелікованих тварин.

При експериментальному цирозі синтез поліамінів знижувався, на що вказує зменшення концентрації путресцину у печінці на 33,9 % порівняно з контролем. Застосування LOLA сприяло достовірному зростанню даного показника на 29,2 % порівняно з нелікованою групою тварин.

Щоб дослідити вплив LOLA на прояви ендотоксикозу у щурів із цирозом, ми досліджували концентрацію молекул середньої маси (табл. 4.4).

Вміст MCM_1 та MCM_2 вірогідно зростав при ураженні печінки на 38,32 % із $(0,28 \pm 0,01)$ Од/л у групі контролю до $(0,39 \pm 0,01)$ Од/л у групі цирозу та 60,65 % із $(0,42 \pm 0,01)$ Од/л у групі контролю до $(0,67 \pm 0,02)$ Од/л у групі цирозу, відповідно.

Таблиця 4.4 – Показники ендотоксикозу у щурів з цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
MCM ₁ (Од/л)	0,28 ± 0,01	0,39 ± 0,01 ^{***}	0,32 ± 0,01 ^{§§}
MCM ₂ (Од/л)	0,42 ± 0,01	0,67 ± 0,02 ^{***}	0,50 ± 0,01 ^{§§§}
ГСТ (мкмоль/хв/мг)	2,56 ± 0,06	1,09 ± 0,05 ^{***}	1,65 ± 0,02 ^{§§§}
Примітка 1. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; ^{§§} P<0,01, ^{§§§} P<0,001 проти групи. Примітка 2. MCM – молекули середньої маси, ГСТ – глутатіон-S-трансфераза.			

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA сприяла зниженню вмісту MCM₁ та MCM₂ на 16,88 % та 25 % до (0,32 ± 0,01) Од/л та (0,50 ± 0,01) Од/л, порівняно із групою тварин, що не отримували лікування.

Показники прооксидантної системи, такі як вміст реактантів ТБК та ГПЛ у щурів із цирозом при застосуванні LOLA відображені у таблиці 4.5.

Таблиця 4.5 – Показники ліпопероксидації у щурів з цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
ТБК у печінці (мкмоль /кг)	704,32 ± 6,36	854,06 ± 30,48 ^{**}	774,99 ± 14,50 ^{NS}
ГПЛ (Од/г)	1,83 ± 0,09	3,80 ± 0,1 ^{***}	2,62 ± 0,01 ^{§§§}
Примітка 1. ^{**} P<0,01, ^{***} P<0,001 проти групи контролю; ^{§§§} P<0,001, ^{NS†} P>0,05 проти групи цирозу. [†] P<0,05, ^{†††} P<0,001, ^{NS†} P>0,05 проти лікування LOLA. Примітка 2. ТБК – активні продукти тіобарбітурової кислоти, ГПЛ – гідропероксиди ліпідів.			

Вміст реактантів ТБК, які служать маркером пероксидації ліпідів, був значно підвищений при цирозі печінки на 21,26 % із (704,32 ± 6,36) мкмоль/кг у групі контролю до (854,06 ± 30,48) мкмоль/кг у тварин з патологією.

При застосуванні LOLA спостерігалася тенденція до зниженого формування маркерів пероксидного окиснення ліпідів, проте різниця між показниками у групі з лікуванням і у групі цирозу без фармакологічної

корекції була недостовірною – $(774,99 \pm 14,50)$ мкмоль/кг проти $(854,06 \pm 30,48)$ мкмоль/кг.

Вміст ГПЛ як первинних продуктів ліпопероксидації значно підвищувався у більш, ніж вдвічі, із $(1,83 \pm 0,09)$ Од/г до $(3,80 \pm 0,1)$ Од/г після моделювання цирозу. При введенні LOLA продукція ГПЛ достовірно пригнічувалася, і їх вміст становив $(2,62 \pm 0,01)$ Од/г. Отже, зниження продукції ГПЛ при лікуванні LOLA вказує на виражену здатність препарату пригнічувати реакції пероксидного окиснення ліпідів.

Отже, результати даного дослідження свідчать про виражену здатність LOLA пригнічувати неконтрольовані реакції пероксидного окиснення ліпідів у щурів із тетрахлорметановим цирозом.

Показники антиоксидантної системи, а саме: активність каталази в печінці і сироватці, вміст GSH та активність глутатіон S-трансферази у щурів із цирозом при застосуванні LOLA відображені у таблиці 4.6.

Таблиця 4.6 – Показники антиоксидантної системи у щурів з цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
Каталаза в печінці (кат/кг)	$3,84 \pm 0,20$	$1,89 \pm 0,27^{**}$	$2,60 \pm 0,12^{\S}$
Каталаза сироватки (кат/л)	$10,86 \pm 0,79$	$22,60 \pm 0,99^{***}$	$15,15 \pm 0,61^{\S\S\S}$
GSH (мкмоль/г)	$3,04 \pm 0,14$	$1,31 \pm 0,07^{***}$	$2,37 \pm 0,07^{\S\S\S}$
Церулоплазмін (мг/л)	$242,08 \pm 4,74$	$135,63 \pm 5,93^{***}$	$150,21 \pm 9,72^{NS\S}$
Примітка. $^{**}P < 0,01$, $^{***}P < 0,001$ проти групи контролю; $^{\S}P < 0,05$, $^{\S\S\S}P < 0,001$ проти групи цирозу.			

У щурів із змодельованим цирозом активність каталази у печінці суттєво знизилася вдвічі із $(3,84 \pm 0,20)$ кат/кг у групі контролю до $(1,89 \pm 0,27)$ кат/кг у групі цирозу, проте її активність у сироватці зростала у більш, ніж в 2 рази, із $(10,86 \pm 0,79)$ кат/л у групі контролю до $(22,60 \pm 0,99)$ кат/л у групі цирозу.

Введення LOLA з метою корекції значно підвищило активність ферменту у печінці на 37,5 % до $(2,60 \pm 0,12)$ кат/кг і знизило його активність у сироватці на 32,96 % $(15,15 \pm 0,61)$ кат/л.

В результаті цирозу печінки у щурів відбулося зниження вмісту GSH у 2,5 рази із $(3,04 \pm 0,14)$ мкмоль/г у групі контролю проти $(1,31 \pm 0,07)$ мкмоль/г у групі цирозу, а активність глутатіон S-трансферази була пригнічена на 57,52 %: $(1,09 \pm 0,05)$ мкмоль/хв/мг у групі цирозу проти $(2,56 \pm 0,06)$ мкмоль/хв/мг у групі контролю.

Лікування LOLA сприяло підвищенню концентрації GSH на 81,17 % із $(1,31 \pm 0,07)$ мкмоль/г до $(2,37 \pm 0,07)$ мкмоль/г, а активність глутатіон S-трансферази зростала на 51,72 % із $(1,09 \pm 0,05)$ мкмоль/хв/мг до $(1,65 \pm 0,02)$ мкмоль/хв/мг.

Внаслідок розвитку цирозу вміст церулоплазміну у щурів знижувався на 43,98 % до $(135,63 \pm 5,93)$ мг/л проти $(242,08 \pm 4,74)$ мг/л у групі контролю. Лікування LOLA викликало достовірне зростання вмісту ЦП до $(150,21 \pm 9,72)$ мг/л.

Активність СДГ була знижена на 23,94 % із $(8,99 \pm 0,13)$ мкмоль/хв/кг у групі контролю до $(6,84 \pm 0,09)$ мкмоль/хв/кг при цирозі у щурів. Застосування LOLA сприяло достовірному підвищенню активності фермента до $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг (табл. 4.7).

Після моделювання цирозу активність ЦХО у щурів пригнічувалася на 26,94 % порівняно з контролем. Препарат LOLA проявив свою ефективність у відновленні активності фермента, викликаючи підвищення його функції до $(7,20 \pm 0,18)$ ммоль/кг.

У таблиці 4.8 наведені показники антиоксидантної системи (активність Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn-супероксиддисмутази та супероксиддисмутази загальної) у щурів з цирозом при лікуванні LOLA.

У щурів із цирозом активність Mn-СОД була суттєво знижена на 32 % із $(4,70 \pm 0,08)$ ОД/мг у групі контролю до $(3,20 \pm 0,10)$ ОД/мг у групі цирозу, Cu,Zn-СОД – у більш, ніж вдвічі, із $(5,28 \pm 0,16)$ ОД/мг у групі контролю до

(2,40 ± 0,12) ОД/мг у групі цирозу, а СОД загальної – на 46,67 % із (10,50 ± 0,17) ОД/мг у групі контролю до (5,60 ± 0,07) ОД/мг у групі цирозу.

Таблиця 4.7 – Показники активності мітохондріальних ферментів у щурів з цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
СДГ (мкмоль/хв/кг)	8,99 ± 0,13	6,84 ± 0,09***	7,14 ± 0,08 [§]
ЦХО (ммоль/кг)	8,87 ± 0,21	6,50 ± 0,12***	7,20 ± 0,18 [§]
Примітка. ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{NS} P>0,05 проти групи цирозу.			

Таблиця 4.8 – Показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn-супероксиддисмутази та супероксиддисмутази загальної у печінці щурів з цирозом при лікуванні LOLA

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA
Mn-СОД (ОД/мг)	4,70 ± 0,08	3,20 ± 0,10***	3,64 ± 0,10 [§]
Cu,Zn-СОД (ОД/мг)	5,28 ± 0,16	2,40 ± 0,12***	3,17 ± 0,28 [§]
СОД загальна (ОД/мг)	10,50 ± 0,17	5,60 ± 0,07***	9,46 ± 0,12 ^{§§§}
Примітка. ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§§} P<0,001 проти групи цирозу.			

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA сприяла вираженому зростанню активності Mn-СОД на 13,86 % до (3,64 ± 0,10) ОД/мг. Активність Cu,Zn-СОД була підвищена на 32,34 % до (3,17 ± 0,28) ОД/мг, а СОД загальної – на 69 % до (9,46 ± 0,12) ОД/мг, порівнюючи з групою нелікованих щурів.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про виражені протективні ефекти препарату LOLA при цирозі, викликаному тетрахлорметаном. Про це свідчить його здатність запобігати прогресуванню синдромів цитолізу та холестазу, покращувати метаболічну функцію гепатоцитів, зменшувати прояви ендотоксикозу, пригнічувати прооксидантні процеси, посилюючи при цьому антиоксидантні функції організму.

4.2 Вивчення NO – залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при експериментальному цирозі печінки

4.2.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови блокади NO – залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при цирозі

Щоб дослідити NO-залежні механізми реалізації протективних ефектів LOLA при цирозі у щурів, ми порівнювали дію препарату при активній функції NOS та при її блокуванні за допомогою L-NAME.

Застосування внутрішньоочеревинного введення LOLA у поєднанні із L-NAME у тварин із модельованим цирозом проявлялось наступними структурними змінами. В ділянках сформованого склерозу візуалізувався мукоїдний набряк колагенових волокон, поряд із цим дещо зростала лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, особливо навколо розширених та повнокровних судин портальних трактів (рис. 4.3 А). Помірний периваскулярний набряк поширювався переважно по стромі. Балкова організація гепатоцитів залишалась збереженою переважно в перипортальних ділянках збережених часточок, у вузлах регенерації спостерігалось хаотичне нагромадження клітин. Центральні вени в збережених часточках залишались частково розширеними та повнокровними, візуалізувались ділянки значних дистрофічних проявів в централобулярних гепатоцитах. В середній третині часточок цитоплазма клітин зерниста, неоднорідна, міжклітинні контакти частково втрачались, ядра просвітлювались. В колагеновій стромі візуалізувались прояви мукоїдного набряку (рис. 4.3 В).

Вплив неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME призводив до зростання активності прозапальних цитокінів про що свідчить зростання фактору некрозу пухлин переважно на мембранах в просвітах синусоїдів (рис. 4.3 С) TNF- α та активація трансформуючого фактора росту TGF- β із переважанням локалізації в просвітах синусоїдів навколо портальних трактів (рис. 4.3 D).

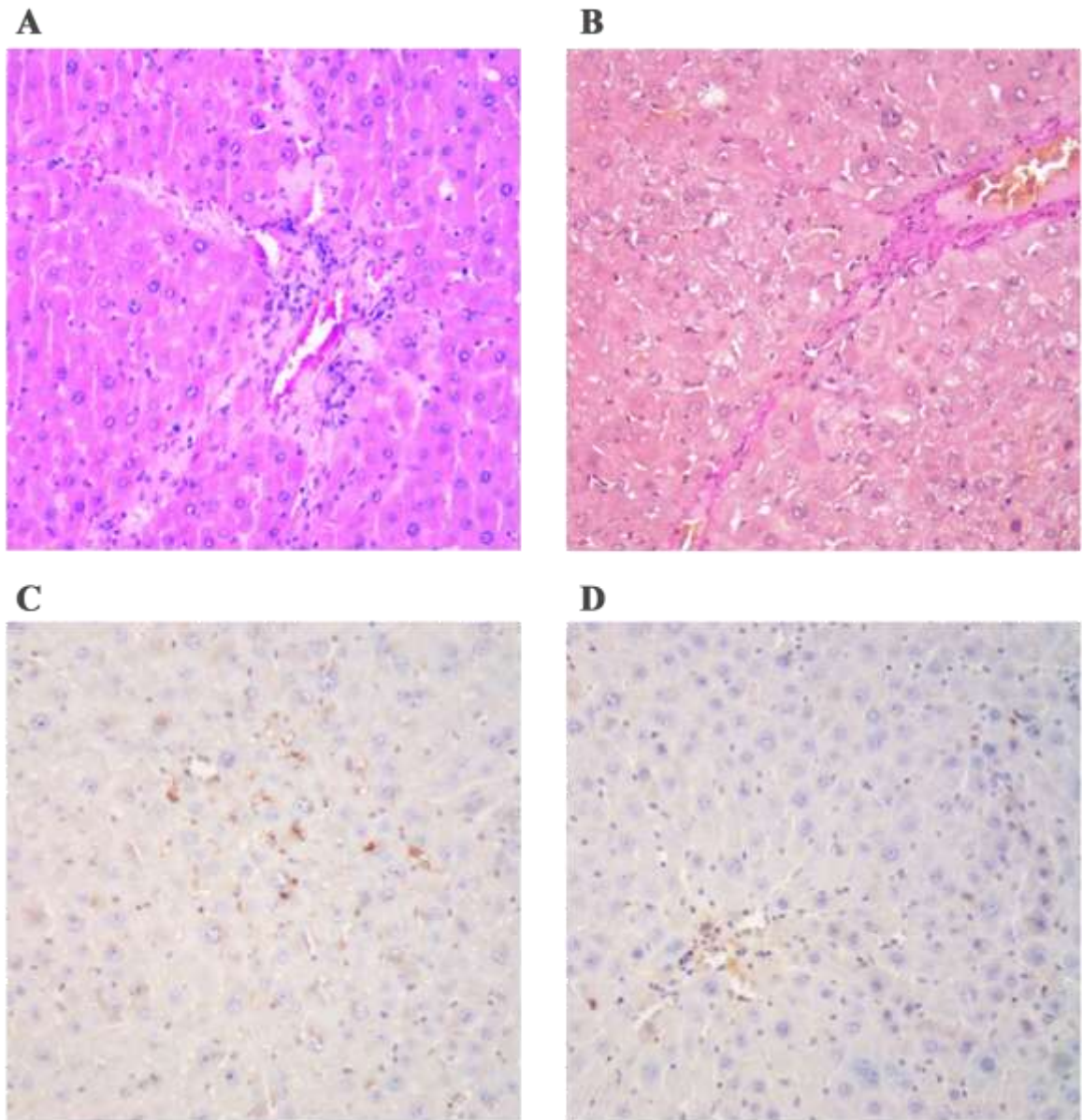


Рисунок 4.3 – Морфологічні зміни у печінці тварин із модельованим CCl_4 цирозом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням L-NAME. А – забарвлення гематоксиліном та еозином $\times 200$; В – забарвлення за Вейгертом та ван Гізоном $\times 200$; С – ІГХ дослідження. Посилення експресії TNF- α на мембранах клітин переважно в просвітах синусоїдів $\times 200$; D – ІГХ дослідження посилення. Активація TGF- β на мембранах клітин в просвітах синусоїдів навколо портальних трактів $\times 200$.

Динаміку змін активності амінотрансфераз у щурів із цирозом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням L-NAME наведено у

таблиці 4.9. У щурів із цирозом печінки спостерігалось суттєве зростання активності амінотрансфераз: АЛТ – на 79,14 % та АСТ – на 229,45 %. Застосування LOLA достовірно запобігало розвитку синдрому цитолізу, попереджуючи підвищення активності ферментів АЛТ та АСТ на 17,08 % та 8,23 %.

Таблиця 4.9 – Активність АЛТ і АСТ у щурів з цирозом за введення LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA	Цироз+LOLA +L-NAME
АЛТ (ОД/л)	48,82 ± 1,86	87,45 ± 3,68 ^{***}	72,52 ± 2,90 [§]	66,28 ± 1,25 ^{NS}
АСТ (ОД/л)	97,57 ± 3,01	321,40 ± 3,22 ^{***}	295,00 ± 7,77 [§]	216,30 ± 15,68 ^{†††}
Примітка. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05 проти групи цирозу, ^{†††} P<0,001, ^{NS} P>0,05 проти лікування LOLA.				

Одночасне введення L-NAME не реверсувало ефекти LOLA щодо зниження активності амінотрансфераз, а навпаки, потенціювало властивості препарату, сприяючи зниженню ферментів-маркерів цитолізу. Активність АЛТ достовірно не змінювалася. Активність АСТ була вірогідно нижчою при застосуванні L-NAME у комбінації з LOLA, порівнюючи із застосуванням препарату при збереженій функції системи синтезу оксиду азоту: (216,30 ± 15,68) ОД/л у групі L-NAME проти (295,00 ± 7,77) ОД/л у групі LOLA.

Таким чином, при блокуванні активності NOS препарат LOLA не зазнавав змін у здатності запобігати цитолізу, що свідчить про незалежність механізму протективної дії фармакологічного засобу у попередженні синдрому цитолізу у щурів із цирозом, зумовленим тетрахлорметаном.

У таблиці 4.10 наведено показники активності ЛФ та ГГТ, а також вміст ЗБ і ЗХ у щурів з цирозом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням L-NAME.

Таблиця 4.10 – Активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA	Цироз+LOLA +L-NAME
ЛФ (ОД/л)	184,67 ± 9,86	327,86 ± 18,72 ^{***}	265,15 ± 16,40 [§]	230,28 ± 2,14 ^{NS}
ГГТ (ОД/л)	0,85 ± 0,11	3,57 ± 0,19 ^{***}	2,03 ± 0,18 ^{§§}	1,78 ± 0,20 ^{NS}
ЗБ (ммоль/л)	6,49 ± 0,47	26,55 ± 1,89 ^{***}	18,40 ± 0,80 ^{§§}	19,91 ± 0,72 ^{NS}
ЗХ (мкмоль/л)	2,03 ± 0,09	9,30 ± 0,39 ^{***}	8,20 ± 0,21 [§]	9,10 ± 0,27 [†]
Примітка. ^{***} P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§} P<0,01 проти групи цирозу, [†] P<0,05, ^{NS} P>0,05 проти лікування LOLA.				

Моделювання тетрахлорметан-індукованого цирозу викликало суттєве зростання активності ЛФ на 77,5 % та ГГТ на 319,6 %, що свідчило про провокування холестазу, проте лікування за допомогою LOLA сприяло вірогідному зниженню активності цих ферментів на 19,13 % та 42,99 %.

Одночасне застосування L-NAME не порушило здатність LOLA інгібувати активність ЛФ та ГГТ, і їхня активність залишалася практично на однаковому рівні: (230,28 ± 2,14) ОД/л у групі L-NAME проти (265,15 ± 16,40) ОД/л у групі LOLA – показники ЛФ та (1,78 ± 0,20) ОД/л у групі L-NAME проти (2,03 ± 0,18) ОД/л у групі LOLA – показники ГГТ.

Рівні ЗБ та ЗХ, які різко зростали у щурів із цирозом на 309,3 % та 358,82 %, відповідно, зазнавали суттєвого зниження при застосуванні LOLA на 30,68 % та 11,79 %.

При блокуванні активності NOS не відбувалося пригнічення здатності LOLA знижувати вміст ЗБ, який залишався практично на тому ж рівні, що і при нормальній активності NOS: (19,91 ± 0,72) ммоль/л у групі LOLA + L-NAME проти (18,40 ± 0,80) ммоль/л у групі LOLA.

Однак, при застосуванні L-NAME ефект LOLA відносно ЗХ нівелювався, і показник його вмісту залишався достовірно підвищеним – (9,10 ± 0,27) ммоль/л у групі L-NAME проти (8,20 ± 0,21) ммоль/л у групі LOLA.

Отже, у більшості випадків LOLA сприяє пригніченню холестазу при цирозі печінки через патофізіологічні шляхи, незалежні від системи L-аргінін – нітроген оксид.

У наступній серії експериментів було досліджено, чи покращення синтезуючої функції печінки у щурів з ураженням печінки під впливом LOLA відбувається через NO – залежний механізм. У таблиці 4.11 наведені такі показники як концентрація сечовини та загального білка у крові і печінці у щурів з цирозом при лікуванні LOLA з одночасним застосуванням L-NAME.

Таблиця 4.11 – Концентрація сечовини, загального білка у крові і печінці у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз +LOLA	Цироз +LOLA +L-NAME
Сечовина (ммоль/л)	7,50 ± 0,40	4,87 ± 0,24**	6,10 ± 0,20 ^{§§}	5,60 ± 0,04 NS†
Загальний білок у крові (г/л)	77,82 ± 0,34	65,63 ± 1,46 ***	80,07 ± 3,31 ^{§§}	79,55 ± 4,35 NS†
Загальний білок у печінці (мг/г)	135,30 ± 2,54	101,29 ± 4,92 ***	118,98 ± 2,85 [§]	127,00 ± 2,22 NS†
Примітка. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01 проти групи цирозу, NS†P>0,05 проти лікування LOLA.				

У щурів із сформованим цирозом рівень сечовини був зменшений на 35,14 % до (4,87 ± 0,24) ммоль/л, порівняно із контролем – (7,15 ± 0,11) ммоль/л. Лікування LOLA сприяло збереженню підвищеного рівня сечовини на 25,41 % до (6,10 ± 0,20) ммоль/л. Одночасне застосування L-NAME не реверсувало ефективності LOLA у збереженні здатності печінки синтезувати сечовину, що свідчить про NO-незалежний механізм реалізації цього ефекту.

Індукування цирозу викликало пригнічення білок-синтезуючої функції печінки, сприяючи зниженню концентрації загального білка у крові та в печінці на 15,66 % та 25,14 %.

Лікування препаратом LOLA сприяло збереженню білок-синтезуючої функції печінки та призвело до збільшення концентрації загального білка і в крові на 21,99 % до $(80,07 \pm 3,31)$ г/л, і в печінці 17,47 % до $(118,98 \pm 2,85)$ мг/л.

Блокування синтезу NO при введенні L-NAME не реверсувало здатність препарату LOLA підтримувати нормальний вміст білка у крові, і його концентрація залишалась такою ж високою, як у групі LOLA: $(79,55 \pm 4,35)$ г/л у крові та $(127,00 \pm 2,22)$ мг/л у печінці.

У таблиці 4.12 наведено зміни показників MCM₁ та MCM₂ у щурів із цирозом при застосуванні LOLA за нормальної та заблокованої активності NOS. Вміст MCM₁ та MCM₂ вірогідно зростав при ураженні печінки на 38,32 % та на 60,64 %, що свідчить про розвиток вираженого ендотоксикозу. Лікування LOLA вірогідно сприяло зниженню вмісту MCM₁ та MCM₂ на 16,88 % та 25 %, відповідно.

Таблиця 4.12 – Показники ендотоксикозу у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз +LOLA	Цироз +LOLA +L-NAME
MCM ₁ (Од/л)	$0,28 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,01^{***}$	$0,32 \pm 0,01^{§§}$	$0,39 \pm 0,02^{\dagger}$
MCM ₂ (Од/л)	$0,42 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,02^{***}$	$0,5 \pm 0,01^{§§§}$	$0,69 \pm 0,02^{\dagger\dagger\dagger}$
GST (мкмоль/хв/мг)	$2,56 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,05^{***}$	$1,65 \pm 0,02^{§§§}$	$1,38 \pm 0,04^{\dagger\dagger\dagger}$
Примітка. ***P<0,001 проти групи контролю; §§P<0,01, §§§P<0,001 проти групи цирозу. †P<0,05, †††P<0,001 проти лікування LOLA.				

У щурів із заблокованою активністю NOS втрачалася здатність препарату знижувати вміст MCM₁ та MCM₂, тому їх рівень залишався значно вищим, порівнюючи із щурами із нормальною функцією системи синтезу азоту. Так, показники MCM₁ та MCM₂ сягали $(0,39 \pm 0,02)$ Од/л та $(0,69 \pm 0,02)$ Од/л у

групі LOLA + L-NAME проти ($0,32 \pm 0,01$) Од/л та ($0,51 \pm 0,01$) Од/л у групі LOLA, і різниця в обох випадках була достовірною.

Лікування LOLA сприяло зростанню активності GST на 51,72 %. У той же час активність ферменту зазнала достовірного пригнічення при застосуванні L-NAME, порівняно із лікуванням лише LOLA: ($1,38 \pm 0,04$) мкмоль/хв/мг у групі LOLA+L-NAME проти ($1,65 \pm 0,02$) мкмоль/хв/мг у групі LOLA.

Отже, зменшення ендотоксикозу під впливом LOLA може залежати від NO-залежного механізму дії досліджуваного препарату.

4.2.2 Стан системи прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за умови блокади NO – залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату при цирозі

Стан системи оксиду азоту при блокуванні NOS оцінювали за вмістом нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів, що служить маркером NO-синтезуючої здатності тканин організму (табл. 4.13).

Таблиця 4.13 – Концентрація нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз +LOLA	Цироз +LOLA +L-NAME
NO ₂ ⁻ у сироватці (мкг/л)	$1,18 \pm 0,06$	$3,35 \pm 0,21^{***}$	$2,38 \pm 0,18^{\$}$	$1,01 \pm 0,16^{\dagger\dagger\dagger}$
NO ₂ ⁻ у печінці (мг/л)	$2,28 \pm 0,11$	$1,85 \pm 0,11^*$	$2,35 \pm 0,18^{\$}$	$1,73 \pm 0,05^{\dagger}$
Примітка. *P<0,05, ***P<0,001 проти групи контролю; \$P<0,05 проти групи цирозу, †P<0,05, †††P<0,001, NS†P>0,05 проти лікування LOLA.				

Після моделювання цирозу у щурів спостерігалось підвищення сироваткового вмісту NO₂⁻ на 183,02 %, порівняно з контролем. У той же час печінковий вміст NO₂⁻ був знижений на 18,63 %.

Лікування препаратом LOLA пригнічувало синтез NO_2^- у сироватці, однак, викликало підвищення вмісту нітрит-аніону на 28,31 % у печінці. При комбінованому введенні L-NAME у тварин з цирозом різко потенціювалася здатність LOLA знижувати концентрацію NO_2^- у сироватці, і її показник склав $(1,01 \pm 0,16)$ мкг/л, але інгібувалося зумовлене LOLA зростання вмісту NO_2^- у печінці, який знизився до $(1,73 \pm 0,05)$ мг/л.

Отже, вплив LOLA на вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з цирозом є критично залежним від активності ферменту NO-синтази, а його блокування чинить виражений вплив на ефекти препарату.

Зміни таких показників прооксидантної системи як вмісту ГПЛ та ТБК у печінці у щурів із цирозом при лікуванні LOLA та L-NAME наведено у таблиці 4.14. Вміст реактивів ТБК був значно підвищений у печінці на 21,26 % при моделюванні цирозу. Застосування LOLA не викликало достовірних змін у концентрації ТБК при ураженні печінки ні за нормальної активності системи синтезу оксиду азоту, ні при її пригніченні, а показники склали $(744,25 \pm 8,45)$ мкмоль/кг у групі LOLA + L-NAME проти $(774,99 \pm 14,50)$ мкмоль/кг у групі LOLA.

Таблиця 4.14 – Показники прооксидантної системи (вміст гідропероксидів ліпідів та реактивів тіобарбітурової кислоти) у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA	Цироз +LOLA +L-NAME
ТБК у печінці (мкмоль /кг)	$704,32 \pm 6,36$	$854,06 \pm 30,48^{**}$	$774,99 \pm 14,50^{NS}$	$774,25 \pm 8,45^{NS\dagger}$
ГПЛ (Од/г)	$1,83 \pm 0,09$	$3,80 \pm 0,1^{***}$	$2,62 \pm 0,01^{§§§}$	$3,00 \pm 0,08^\dagger$
Примітка. $**P<0,01$, $***P<0,001$ проти групи контролю; $§§§P<0,001$, $^{NS\dagger}P>0,05$ проти групи цирозу. $^\dagger P<0,05$, $^{NS\dagger}P>0,05$ проти лікування LOLA.				

Вміст ГПЛ значно зростав на 107,27 % після моделювання цирозу. При введенні LOLA продукція ГПЛ достовірно пригнічувалася на 31,14 %. При застосуванні L-NAME паралельно із препаратом продукція ГПЛ залишалася незначно підвищеною на 14,65 %, порівняно із лікуванням за нормальної активності NOS, а показники склали $(3,00 \pm 0,08)$ Од/г у групі LOLA + L-NAME проти $(2,62 \pm 0,01)$ Од/г у групі LOLA.

Активність каталази у печінці та сироватці, вміст GSH як показників антиоксидантної системи у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME відображено у таблиці 4.15.

Таблиця 4.15 – Показники антиоксидантної системи у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+ LOLA	Цироз +LOLA +L-NAME
Каталаза в печінці (кат/кг)	$3,84 \pm 0,20$	$1,89 \pm 0,27^{**}$	$2,60 \pm 0,12^{\S}$	$2,93 \pm 0,05^{\dagger}$
Каталаза сироватки (кат/л)	$10,86 \pm 0,79$	$22,60 \pm 0,99^{***}$	$15,15 \pm 0,61^{\S\S\S}$	$18,18 \pm 1,07^{\dagger}$
GSH (мкмоль/г)	$3,04 \pm 0,14$	$1,31 \pm 0,07^{***}$	$2,37 \pm 0,07^{\S\S\S}$	$2,55 \pm 0,07^{NS\dagger}$
Примітка. $**P<0,01$, $***P<0,001$ проти групи контролю; $^{\S}P<0,05$, $^{\S\S\S}P<0,001$ проти групи цирозу. $^{\dagger}P<0,05$, $^{\dagger\dagger}P<0,001$, $^{NS\dagger}P>0,05$ проти лікування LOLA.				

У щурів із змодельованим цирозом активність каталази у печінці суттєво знизилася на 50,82 % із $(3,84 \pm 0,20)$ кат/кг у групі контролю до $(1,89 \pm 0,27)$ кат/кг у групі цирозу, проте її активність у сироватці зростала на 108,14 % із $(10,86 \pm 0,79)$ кат/л у групі контролю до $(22,60 \pm 0,99)$ кат/л у групі цирозу. Введення LOLA з метою корекції значно підвищило активність ферменту у печінці на 37,5 % до $(2,60 \pm 0,12)$ кат/кг і знизило його активність у сироватці на 32,96 % $(15,15 \pm 0,61)$ кат/л.

Застосування L-NAME не лише не реверсувало здатність LOLA підвищувати активність каталази в печінці, а й потенціювало цей ефект,

сприяючи підвищенню активності фермента до $(2,93 \pm 0,05)$ кат/кг проти $(2,60 \pm 0,12)$ кат/кг у групі LOLA.

У той же час активність каталази у сироватці при блокуванні синтезу оксиду азоту залишалася достовірно вищою і складала $(18,18 \pm 1,07)$ кат/л у групі LOLA + L-NAME проти $(15,15 \pm 0,61)$ кат/л у групі LOLA.

В результаті цирозу печінки у щурів відбулося зниження вмісту GSH на 57 % проти групи контролю, а активність глутатіон S-трансферази була пригнічена у 2,5 рази. Лікування LOLA сприяло підвищенню концентрації GSH на 81,17 % із $(1,31 \pm 0,07)$ мкмоль/г до $(2,37 \pm 0,07)$ мкмоль/г.

Ефекти LOLA щодо відновленого GSH були реалізовані через NO-незалежний механізм, оскільки при заблокованій активності NO-синтази його вміст залишався таким же, як і при збереженій функції фермента: $(2,55 \pm 0,07)$ мкмоль/г у групі L-NAME і $(2,37 \pm 0,07)$ мкмоль/г у групі LOLA.

У таблиці 4.16 наведені показники активності сукцинатдегідрогенази, вмісту цитохромоксидази та вмісту церулоплазміну у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME.

Таблиця 4.16 – Показники активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOL А	Цироз +LOLA +L-NAME
СДГ (мкмоль/хв/кг)	$8,99 \pm 0,13$	$6,84 \pm 0,09^{***}$	$7,14 \pm 0,08^{\S}$	$7,45 \pm 0,16^{NS\ddagger}$
ЦХО (ммоль/кг)	$8,87 \pm 0,21$	$6,50 \pm 0,12^{***}$	$7,20 \pm 0,18^{\S}$	$6,89 \pm 0,13^{NS\ddagger}$
Церулоплазмін (мг/л)	$242,08 \pm$ $4,74$	$135,63 \pm$ $5,93^{***}$	$150,21 \pm$ $9,72^{NS\§}$	$161,88 \pm$ $7,73^{NS\ddagger}$
Примітка. $^{***}P < 0,001$ проти групи контролю; $^{\S}P < 0,05$, $^{NS\§}P > 0,05$ проти групи цирозу. $^{\ddagger\ddagger}P < 0,01$, $^{\ddagger\ddagger\ddagger}P < 0,001$, $^{NS\ddagger}P > 0,05$ проти лікування LOLA.				

Активність СДГ була знижена на 23,94 % із $(8,99 \pm 0,13)$ мкмоль/хв/кг у групі контролю до $(6,84 \pm 0,09)$ мкмоль/хв/кг при цирозі у щурів. Застосування

LOLA сприяло достовірному підвищенню активності фермента до $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг.

Такий ефект був реалізований через NO-незалежний механізм, оскільки активність СДГ, яка становила $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг у щурів з цирозом при лікуванні LOLA, не зазнала вірогідних змін під впливом L-NAME і залишалася на рівні $(7,45 \pm 0,16)$ мкмоль/хв/кг.

Після моделювання цирозу активність ЦХО у щурів пригнічувалася на 26,94 % із $(8,87 \pm 0,21)$ ммоль/кг у групі контролю до $(6,50 \pm 0,12)$ ммоль/кг у групі цирозу. Препарат LOLA проявив свою ефективність у відновленні активності фермента, викликаючи підвищення його функції на 11,14 % до $(7,20 \pm 0,18)$ ммоль/кг.

Як і у випадку із СДГ, блокування NO-синтази не чинило вагомого впливу на активність LOLA, і активність ЦХО залишалася вищою, порівняно із групою цирозу, і достовірної різниці між показниками у групах LOLA – $(7,20 \pm 0,18)$ ммоль/кг та L-NAME – $(6,89 \pm 0,13)$ ммоль/кг не виникало.

Внаслідок розвитку цирозу вміст церулоплазміну у щурів знижувався на 43,98 % до $(135,63 \pm 5,93)$ мг/л проти $(242,08 \pm 4,74)$ мг/л у групі контролю. Лікування LOLA викликало достовірне зростання вмісту ЦП на 10,75 %. Блокування синтезу оксиду азоту не вплинуло на ефективність LOLA, і різниця між показниками вмісту ЦП у групі L-NAME – $(161,88 \pm 7,73)$ мг/л та у групі LOLA – $(150,21 \pm 9,72)$ мг/л була недостовірною.

У таблиці 4.17 наведені показники антиоксидантної системи (активність Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn- супероксиддисмутази, супероксиддисмутази загальної та загальна антиоксидантної активність) у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME.

У щурів із цирозом активність Mn-СОД була суттєво знижена на 32 % із $(4,70 \pm 0,08)$ ОД/мг у групі контролю до $(3,20 \pm 0,10)$ ОД/мг у групі цирозу, Cu,Zn-СОД – у більш, ніж вдвічі, із $(5,28 \pm 0,16)$ ОД/мг у групі контролю до $(2,40 \pm 0,12)$ ОД/мг у групі цирозу, а СОД загальної – на 46,67 % із $(10,50 \pm 0,17)$ ОД/мг у групі контролю до $(5,60 \pm 0,07)$ ОД/мг у групі цирозу.

Таблиця 4.17 – Показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn-супероксиддисмутази та супероксиддисмутази загальної у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та L-NAME

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+ LOLA	Цироз +LOLA +L-NAME
Mn-СОД (ОД/мг)	4,70 ± 0,08	3,20 ± 0,10***	3,64 ± 0,10§	3,80 ± 0,19 ^{NS†}
Cu,Zn-СОД (ОД/мг)	5,28 ± 0,16	2,40 ± 0,12***	3,17 ± 0,28§	3,79 ± 0,17 ^{NS†}
СОД загальна у печінці (ОД/мг)	10,50 ± 0,17	5,60 ± 0,07***	9,46 ± 0,12 ^{§§§}	7,59 ± 0,09 ^{†††}
Примітка. ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§§P<0,001 проти групи цирозу, ††P<0,01, †††P<0,001, ^{NS†} P>0,05 проти лікування LOLA.				

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA сприяла вираженому зростанню активності Mn-СОД на 13,86 % до (3,64 ± 0,10) ОД/мг. Активність Cu,Zn-СОД була підвищена на 32,34 % до (3,17 ± 0,28) ОД/мг, а СОД загальної – на 69 % до (9,46 ± 0,12) ОД/мг, порівнюючи з групою нелікованих щурів.

Введення L-NAME не спричинило достовірних змін у ефектах LOLA щодо впливу на активність ферментів Mn-СОД і Cu,Zn-СОД. Таким чином, показники активності становили (3,64 ± 0,10) ОД/мг у групі LOLA проти (3,80 ± 0,19) ОД/мг у групі L-NAME (P>0,05) для Mn-СОД, та (3,17 ± 0,28) ОД/мг у групі LOLA проти (3,79 ± 0,17) ОД/мг у групі L-NAME (P>0,05) для Cu,Zn-СОД.

Однак, активність СОД загальної, пригнічення якої внаслідок цирозу було попереджене лікуванням LOLA, зменшилася на 68,9 % на фоні застосування L-NAME до (7,59 ± 0,09) ОД/мг проти (9,46 ± 0,12) ОД/мг у групі LOLA.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про виражені протективні ефекти препарату LOLA при цирозі, зумовленому тетрахлорметаном. Встановлено що ефекти LOLA щодо активності аланінамінотрансферази, лужної фосфатази, гамма-глутамілтрансферази,

сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази, вмісту загального білірубину, сечовини, загального білка у крові та печінці, активних продуктів тіобарбітурової кислоти, відновленого глутатіону були реалізовані незалежно від активності NO-синтази.

При експериментальному цирозі ми встановили взаємозв'язок в механізмі дії LOLA між впливом на синтез нітроген оксиду та експресією цитокінів TNF- α та росту TGF- β , концентрацією молекул середньої маси, активністю глутатіон-S-трансферази, каталази та супероксиддисмутази.

4.3 Вивчення поліамін-залежного механізму дії L-аргініну L-аспартату за умов цирозу

4.3.1 Структурний та функціональний стан печінки за умови застосування L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при цирозі

За комбінованого введення LOLA та інгібітора метаболізму поліамінів DFMO при експериментальному цирозі в печінці виявлено такі структурні зміни.

В ділянках сформованої сполучної тканини зберігався виражений фіброз (рис. 4.4 А,В) в тому числі периваскулярний. Судини портальних трактів залишались помірно розширеними та повнокровними. Спостерігався також помірний периваскулярний набряк, який у поєднанні із лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією поширювався на колагенову строму. У колагенових волокнах проявлявся як мукоїдний так і фібриноїдний набряк. Найбільш збереженими виявлялась незначна частина гепатоцитів перипортальних трактів. Серед помірно змінених клітин візуалізувались поодинокі гепатоцити із посиленою регенераторною активністю. Загальна маса клітин як у збережених ділянках часточок так і у вузлах регенерації перебувала переважно у стадії білкової дистрофії або із переважаннями некротичних проявів. Балкова організація гепатоцитів порушувалась, міжклітинні контакти продовжували втрачатись.

Просвіти синусоїдів візуалізувались слабо, центральні вени збережених часточок залишались розширеними та повнокровними.

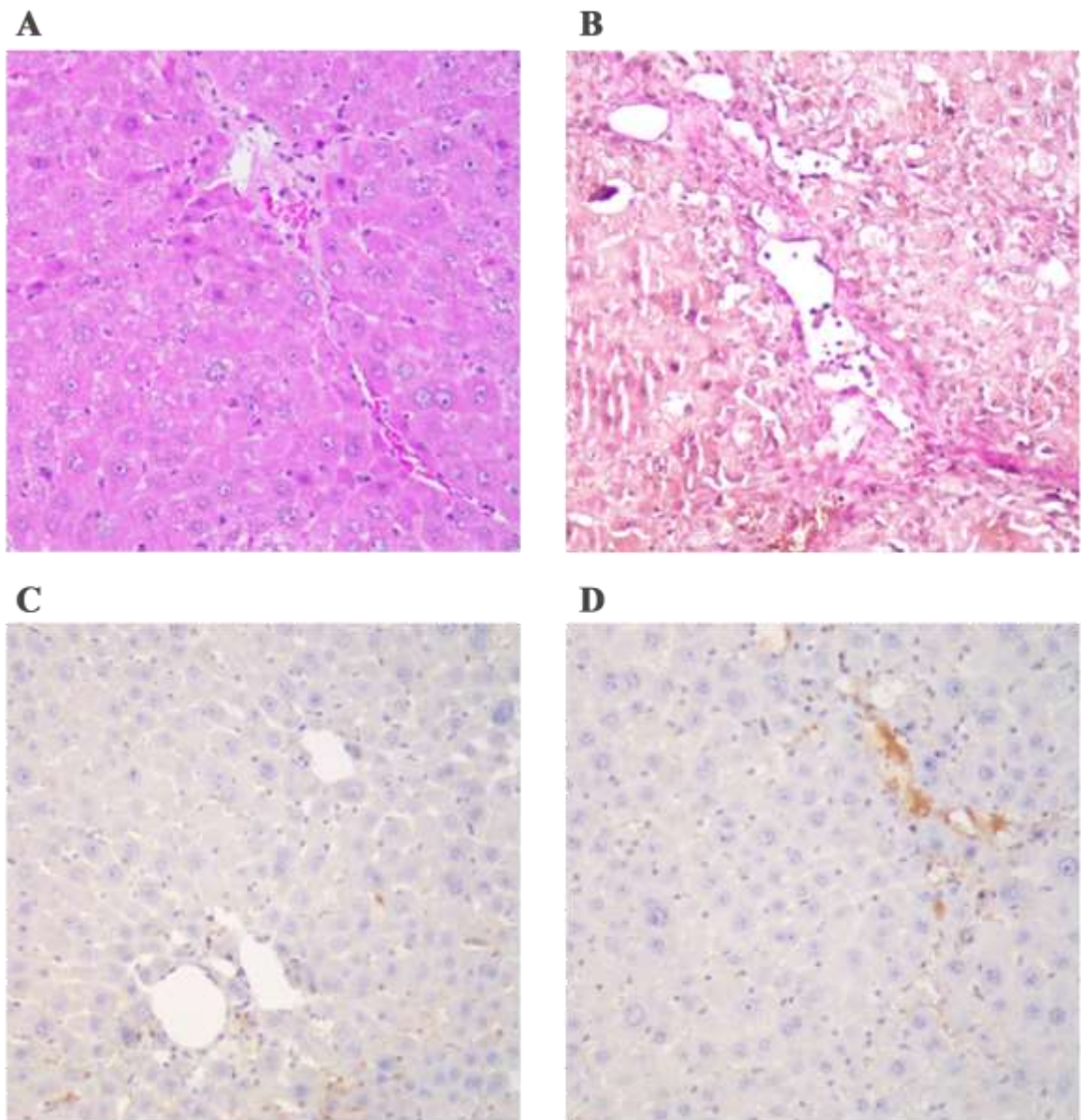


Рисунок 4.4 – Морфологічні зміни у печінці тварин із модельованим CCl_4 цирозом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням DFMO.

А – забарвлення гематоксилином та еозином $\times 200$; В – забарвлення за Вейгертом та ван Гізоном $\times 200$; С – ІГХ дослідження помірного зростання фактору некрозу пухлин із переважанням на мембранах в просвітах синусоїдів $\text{TNF-}\alpha$ $\times 200$; D – ІГХ дослідження. Посилення активації $\text{TGF-}\beta$ на мембранах клітин в просвітах синусоїдів навколо портальних трактів $\times 200$.

Вплив інгібітора метаболізму поліамінів DFMO при цирозі та корекції LOLA сприяв зростанню експресії фактора некрозу пухлин із переважанням на мембранах в просвітах синусоїдів (рис.4.4 С), що також свідчить про інтенсивність токсичного ураження печінки TNF- α . Поряд із цим візуалізується значне зростання трансформуючого фактора росту TGF- β із переважанням локалізації в просвітах синусоїдів навколо порталних трактів (рис.4.4 D).

Динаміка змін активності амінотрансфераз у щурів із цирозом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням DFMO продемонстрована у таблиці 4.18.

Таблиця 4.18 – Активність АЛТ і АСТ у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA	Цироз+ LOLA + DFMO
АЛТ (ОД/л)	48,82 \pm 1,86	87,45 \pm 3,68 ^{***}	72,52 \pm 2,90 [§]	91,92 \pm 1,49 ^{††}
АСТ (ОД/л)	97,57 \pm 3,01	321,40 \pm 3,22 ^{***}	295,00 \pm 7,77 [§]	310,70 \pm 7,60 ^{NS}
Примітка. *** p<0,001 проти групи контролю; §p<0,05 проти групи цирозу, ††P<0,01, NSP>0,05 проти лікування LOLA.				

У щурів із цирозом печінки відбулося збільшення активності амінотрансфераз, застосування LOLA достовірно запобігало розвитку синдрому цитолізу, попереджуючи підвищення активності ферментів АЛТ та АСТ.

Застосування DFMO пригнітило здатність LOLA знижувати активність АЛТ, яка склала (91,92 \pm 1,49) ОД/л у групі DFMO проти (72,52 \pm 2,90) ОД/л у групі LOLA. Активність АСТ також підвищувалася при блокуванні синтезу поліамінів до (310,70 \pm 7,60) ОД/л у групі DFMO проти (295,00 \pm 7,77) ОД/л у групі LOLA, однак різниця виявилася недостовірною.

У таблиці 4.19 наведено показники активності ЛФ та ГГТ, а також вміст ЗБ і ЗХ у щурів із цирозом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням DFMO.

Таблиця 4.19 – Активність ЛФ і ГГТ та рівні ЗБ і ЗХ у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
ЛФ (ОД/л)	184,67 ± 9,86	327,86 ± 18,72***	265,15 ± 16,40 [§]	316,19 ± 8,42 [†]
ГГТ (ОД/л)	0,85 ± 0,11	3,57 ± 0,19***	2,03 ± 0,18 ^{§§}	4,73 ± 0,28 ^{†††}
ЗБ (ммоль/л)	6,49 ± 0,47	26,55 ± 1,89***	18,40 ± 0,80 ^{§§}	39,82 ± 3,03 ^{†††}
ЗХ (мкмоль/л)	2,03 ± 0,09	9,30 ± 0,39***	8,20 ± 0,21 [§]	11,87 ± 0,70 ^{††}
Примітка. ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01 проти групи цирозу, †P<0,05, ††P<0,01, †††P<0,001 проти лікування LOLA.				

Моделювання тетрахлорметан-індукованого цирозу викликало суттєве зростання активності ЛФ та ГГТ, що свідчило про формування холестазу, проте лікування за допомогою LOLA сприяло вірогідному зниженню активності цих ферментів. Одночасне застосування DFMO нівелювало ефективність LOLA щодо пригнічення активності ЛФ та ГГТ. Активність ЛФ складала (316,19 ± 8,42) ОД/л у групі DFMO проти (265,15 ± 16,40) ОД/л у групі LOLA, а активність ГГТ була у понад 2 рази вищою у групі DFMO – (4,73 ± 0,28) ОД/л, порівняно із групою LOLA (2,03 ± 0,18) ОД/л.

Рівні ЗБ та ЗХ, які різко зростали у щурів із цирозом, відповідно, зазнавали суттєвого зниження при застосуванні LOLA. Блокування процесу синтезу поліамінів викликало виражене підвищення вмісту ЗБ і ЗХ, навіть у порівнянні із нелікованим цирозом. Так, вміст ЗБ був більш, ніж удвічі вищим у групі LOLA + DFMO та складав (39,82 ± 3,03) ммоль/л проти (18,40 ± 0,80) ммоль/л у групі LOLA. Вміст ЗХ у щурів із цирозом, пролікованих LOLA, при застосуванні DFMO також був набагато вищим – на 44,77 % і його показник сягав позначки (11,87 ± 0,70) ммоль/л проти (8,20 ± 0,21) ммоль/л у групі LOLA.

Таким чином, при цирозі печінки LOLA проявляє свої протективні властивості щодо розвитку синдрому внутрішньопечінкового холестазу через механізм, тісно пов'язаний із синтезом поліамінів.

Отже, при блокуванні синтезу поліамінів втрачається здатність препарату LOLA зменшувати явища цитолізу та холестазу при цирозі.

У таблиці 4.20 наведені такі показники як концентрація путресцину у печінці, сечовини у крові та загального білка у крові і печінці у щурів з цирозом при лікуванні LOLA з одночасним застосуванням DFMO.

Таблиця 4.20 – Концентрація сечовини, путресцину, загального білка у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз +LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
Сечовина (ммоль/л)	7,50 ± 0,40	4,87 ± 0,24**	6,10 ± 0,20 ^{§§}	4,20 ± 0,22 ^{††}
Загальний білок у крові (г/л)	77,82 ± 0,34	65,63 ± 1,46***	80,07 ± 3,31 ^{§§}	53,17 ± 0,91 ^{†††}
Загальний білок у печінці (мг/г)	135,30 ± 2,54	101,29 ± 4,92***	118,98 ± 2,85 [§]	104,20 ± 2,69 ^{††}
Путресцин у печінці (нмоль/мг)	182,01 ± 5,14	120,25 ± 3,92***	155,38 ± 2,44 ^{§§}	110,25 ± 2,93 ^{††}
Примітка. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; §P<0,05, §§P<0,01 проти групи цирозу, ††P<0,01, †††P<0,001 проти лікування LOLA.				

Введення DFMO нівелювало здатність LOLA стимулювати синтез поліамінів. Рівень путресцину знизився на 29 %за введення LOLA + DFMO у порівнянні з групою тварин із корекцією.

При моделюванні цирозу рівень сечовини у щурів був нижчим, порівняно із контролем. Лікування LOLA сприяло підвищенню рівня сечовини. Одночасне застосування LOLA та DFMO пригнітило здатність препарату синтезувати сечовину, і її показник склав (4,20 ± 0,22) ммоль/л у групі DFMO проти (6,10 ± 0,20) ммоль/л у групі LOLA.

Індукування цирозу викликало пригнічення білоксинтезуючої функції печінки, знижуючи концентрацію загального білка у крові на 15,66 % та в печінці на 25,14 %. Лікування препаратом LOLA сприяло покращенню здатності печінки синтезувати білок та призвело до збільшення його концентрації на 21,99 % в крові, і на 17,47 % в печінці.

Однак, блокування синтезу поліамінів при введенні DFMO інгібувало здатність препарату LOLA підтримувати нормальний рівень білка у крові, і його рівень був знижений до $(53,17 \pm 0,91)$ г/л у групі DFMO проти $(80,07 \pm 3,31)$ г/л у групі LOLA.

Введення DFMO суттєво пригнітило здатність LOLA підтримувати вміст загального білка у печінці, і його показник складав $(104,20 \pm 2,69)$ мг/г у групі DFMO проти $(118,98 \pm 2,85)$ мг/л у групі LOLA.

Отже, покращення синтезуючої функції печінки у щурів з цирозом при лікуванні LOLA нівелюється при одночасному введенні DFMO, що свідчить про поліамін-залежний механізм реалізації цього ефекту.

У таблиці 4.21 продемонстровані показники MCM_1 та MCM_2 у щурів з цирозом при застосуванні LOLA за нормального та заблокованого синтезу поліамінів.

Таблиця 4.21 – Показники ендотоксикозу у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз +LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
MCM_1 (Од/л)	$0,28 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,01^{***}$	$0,32 \pm 0,01^{§§}$	$0,34 \pm 0,01^{NS†}$
MCM_2 (Од/л)	$0,42 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,02^{***}$	$0,5 \pm 0,01^{§§§}$	$0,70 \pm 0,02^{†††}$
GST (мкмоль/хв/мг)	$2,56 \pm 0,06$	$1,09 \pm 0,05^{***}$	$1,65 \pm 0,02^{§§§}$	$1,08 \pm 0,06^{†††}$
Примітка. $***P < 0,001$ проти групи контролю; $§§P < 0,01$, $§§§P < 0,001$ проти групи цирозу. $†††P < 0,001$, $NS†P > 0,05$ проти лікування LOLA.				

Вміст MCM_1 та MCM_2 вірогідно зростав при цирозі на 38,32 % та на 60,64 %. Лікування LOLA сприяло зниженню вмісту MCM_1 та MCM_2 на 16,88 % та 25 %. При паралельному застосуванні DFMO не виникало порушення здатності LOLA пригнічувати продукцію MCM_1 : їх вміст складав $(0,34 \pm 0,01)$ Од/л у групі DFMO проти $(0,32 \pm 0,01)$ Од/л у групі LOLA, а вміст MCM_2 залишався значно вищим – $(0,70 \pm 0,02)$ Од/л у групі DFMO проти $(0,5 \pm 0,01)$ Од/л у групі LOLA. Активність глутатіон-S-трансферази також суттєво пригнічувалася при блокуванні синтезу поліамінів на 34,8 % до $(1,08 \pm 0,06)$ мкмоль/хв/мг у групі DFMO проти $(1,65 \pm 0,02)$ мкмоль/хв/мг у групі LOLA. Отже, здатність LOLA зменшувати явища ендотоксикозу та покращувати детоксикацію в печінці, також залежать від впливу на синтез поліамінів.

4.3.2 Стан прооксиданти-антиоксиданти та метаболічних процесів за введення L-аргініну L-аспартату та блокади синтезу поліамінів при цирозі печінки

Вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів із цирозом при застосуванні LOLA та DFMO наведено у таблиці 4.22.

Після моделювання цирозу у щурів спостерігалось підвищення сироваткового вмісту NO_2^- майже втричі, порівняно з контролем. У той же час печінковий вміст NO_2^- був знижений на 18,63 %.

Лікування препаратом LOLA пригнічувало синтез NO_2^- у сироватці на 21,67 % до $(2,38 \pm 0,18)$ мкг/л, однак, викликало підвищення вмісту аніону на 28,31 % до $(2,35 \pm 0,18)$ мг/л у печінці. При паралельному введенні DFMO у тварин з цирозом різко пригнічувалася здатність LOLA знижувати концентрацію NO_2^- у сироватці, і її показник склав $(4,78 \pm 0,23)$ мкг/л, проте суттєвих змін вмісту NO_2^- у печінці при блокуванні синтезу поліамінів не спостерігалось, і різниця між показниками $(2,81 \pm 0,07)$ мг/л у групі DFMO та $(2,35 \pm 0,18)$ мг/л у групі LOLA була недостовірною.

Таблиця 4.22 – Концентрація нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз +LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
NO ₂ ⁻ у сироватці (мкг/л)	1,18 ± 0,06	3,35 ± 0,21 ^{***}	2,38 ± 0,18 [§]	4,78 ± 0,23 ^{†††}
NO ₂ ⁻ у печінці (мг/л)	2,28 ± 0,11	1,85 ± 0,11 [*]	2,35 ± 0,18 [§]	2,81 ± 0,07 ^{NS†}
Примітка. [*] P<0,05, ^{***} P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05 проти групи цирозу, ^{†††} P<0,001, ^{NS†} P>0,05 проти лікування LOLA.				

Динаміку змін вмісту ГПЛ та ТБК у печінці у щурів із цирозом при лікуванні LOLA та DFMO наведено у таблиці 4.23.

Таблиця 4.23 – Показники ліпопероксидації у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+ LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
ТБК у печінці (мкмоль /кг)	704,32 ± 6,36	854,06 ± 30,48 ^{**}	774,99 ± 14,50 ^{NS}	979,55 ± 24,24 ^{†††}
ГПЛ (Од/г)	1,83 ± 0,09	3,80 ± 0,1 ^{***}	2,62 ± 0,01 ^{§§§}	4,53 ± 0,22 ^{†††}
Примітка. ^{**} P<0,01, ^{***} P<0,001 проти групи контролю; ^{§§§} P<0,001, ^{NS†} P>0,05 проти групи цирозу. ^{†††} P<0,001 проти лікування LOLA.				

Вміст реактантів ТБК був значно підвищений у печінці при моделюванні цирозу, а застосування LOLA викликало незначне зниження концентрації ТБК. Однак, паралельне застосування DFMO спричинило підвищення продукції на 26,4 % реактантів ТБК.

Вміст ГПЛ значно зростав у понад двічі разів після моделювання цирозу. При введенні LOLA продукція ГПЛ достовірно пригнічувалася. При застосуванні DFMO паралельно із препаратом продукція ГПЛ залишалася на 73,25 % вищою.

Отже, процес синтезу поліамінів є критично важливою ланкою у механізмі реалізації протективних ефектів LOLA при активації прооксидантної системи, індукованої цирозом.

Активність каталази у печінці та сироватці, вміст відновленого GSH у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та DFMO відображено у таблиці 4.24.

Таблиця 4.24 – Показники антиоксидантної системи у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
Каталаза в печінці (кат/кг)	3,84 ± 0,20	1,89 ± 0,27**	2,60 ± 0,12 [§]	1,76 ± 0,06 ^{†††}
Каталаза сироватки (кат/л)	10,86 ± 0,79	22,60 ± 0,99***	15,15 ± 0,61 ^{§§§}	25,50 ± 0,63 ^{†††}
GSH (мкмоль/г)	3,04 ± 0,14	1,31 ± 0,07***	2,37 ± 0,07 ^{§§§}	1,21 ± 0,10 ^{†††}
Церулоплазмін (мг/л)	242,08 ± 4,74	135,63 ± 5,93***	150,21 ± 9,72 ^{NS§}	96,25 ± 4,29 ^{†††}
Примітка. **P<0,01, ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§§} P<0,001 проти групи цирозу. ^{†††} P<0,001 проти лікування LOLA.				

У щурів із змодельованим цирозом активність каталази у печінці суттєво знизилася, проте її активність у сироватці зростала. Введення LOLA з метою корекції значно підвищило активність ферменту у печінці на 37,5 % і знизило його активність у сироватці на 32,96 %. Застосування DFMO вірогідно реверсувало здатність LOLA підвищувати активність каталази в печінці, сприяючи зниженню активності фермента до (1,76 ± 0,06) кат/кг проти (2,60 ± 0,12) кат/кг у групі LOLA. У той же час активність каталази у сироватці при блокуванні синтезу поліамінів залишалася достовірно вищою і складала (25,50 ± 0,63) кат/л у групі DFMO проти (15,15 ± 0,61) кат/л у групі LOLA.

В результаті цирозу печінки у щурів відбулося зниження вмісту GSH, а лікування LOLA сприяло підвищенню концентрації відновленого глутатіону.

Внаслідок розвитку цирозу вміст церулоплазміну у щурів знижувався на 43,98 %. Лікування LOLA викликало достовірне зростання вмісту ЦП на 10,75 %. Застосування DFMO поряд із LOLA пригнітило здатність препарату запобігати зниженню білка, і його вміст залишався значно меншим та становив $(96,25 \pm 4,29)$ мг/л у групі DFMO проти $(150,21 \pm 9,72)$ мг/л у групі LOLA.

Таким чином, ефекти LOLA щодо зростання рівня GSH та церулоплазміну при цирозі були реалізовані через механізм, асоційований із процесом синтезу поліамінів.

У таблиці 4.25 наведені показники активності сукцинатдегідрогенази, супероксиддисмутази та вмісту цитохромоксидази у щурів з токсичним цирозом при застосуванні LOLA та DFMO на 3 і 7 дні експерименту.

Таблиця 4.25 – Активність сукцинатдегідрогенази і цитохромоксидази та вміст церулоплазміну у щурів з цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+ LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
СДГ (мкмоль/хв/кг)	$8,99 \pm 0,13$	$6,84 \pm 0,09^{***}$	$7,14 \pm 0,08^{\$}$	$5,80 \pm 0,12^{\dagger\dagger}$
ЦХО (ммоль/кг)	$8,87 \pm 0,21$	$6,50 \pm 0,12^{***}$	$7,20 \pm 0,18^{\$}$	$5,64 \pm 0,26^{\dagger\dagger}$
Примітка. $^{***}P < 0,001$ проти групи контролю; $^{\$}P < 0,05$, $^{NS\$}P > 0,05$ проти групи цирозу. $^{\dagger\dagger}P < 0,01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0,001$ проти лікування LOLA.				

Активність СДГ була знижена на 23,94 % із $(8,99 \pm 0,13)$ мкмоль/хв/кг у групі контролю до $(6,84 \pm 0,09)$ мкмоль/хв/кг при цирозі у щурів. Застосування LOLA сприяло достовірному підвищенню активності фермента до $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг.

Такий ефект був реалізований через NO-незалежний механізм, оскільки активність СДГ, яка становила $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг у щурів з цирозом при лікуванні LOLA, не зазнала вірогідних змін під впливом L-NAME і залишалася на рівні $(7,45 \pm 0,16)$ мкмоль/хв/кг.

При блокуванні синтезу поліамінів активність СДГ, яка становила $(7,14 \pm 0,08)$ мкмоль/хв/кг у щурів з цирозом при лікуванні LOLA, достовірно зменшилася під впливом DFMO до $(5,80 \pm 0,12)$ мкмоль/хв/кг на 18,87 %, що свідчить про поліамін-залежний механізм реалізації цього ефекту.

Після моделювання цирозу активність ЦХО у щурів пригнічувалася на 26,94 % із $(8,87 \pm 0,21)$ ммоль/кг у групі контролю до $(6,50 \pm 0,12)$ ммоль/кг у групі цирозу. Препарат LOLA проявив свою ефективність у відновленні активності фермента, викликаючи підвищення його функції на 11,14 % до $(7,20 \pm 0,18)$ ммоль/кг.

Заблокувавши продукцію поліамінів, ця властивістю LOLA втрапилися, і активність фермента залишалася навіть нижчою, ніж у тварин з нелікованим цирозом: $(5,64 \pm 0,26)$ ммоль/кг у групі DFMO проти $(7,20 \pm 0,18)$ ммоль/кг у групі LOLA.

Отже, ефекти LOLA щодо впливу на активність ферментів СДГ та ЦХО та на вміст церулоплазміну асоційовані та критично залежні із процесом синтезу поліамінів.

У таблиці 4.26 наведені показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn- супероксиддисмутази, супероксиддисмутази загальної у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та DFMO.

У щурів із цирозом активність Mn-СОД була суттєво знижена на 32 % із $(4,70 \pm 0,08)$ ОД/мг у групі контролю до $(3,20 \pm 0,10)$ ОД/мг у групі цирозу, Cu,Zn-СОД – у більш, ніж вдвічі, із $(5,28 \pm 0,16)$ ОД/мг у групі контролю до $(2,40 \pm 0,12)$ ОД/мг у групі цирозу, а СОД загальної – на 46,67 % із $(10,50 \pm 0,17)$ ОД/мг у групі контролю до $(5,60 \pm 0,07)$ ОД/мг у групі цирозу.

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA сприяла вираженому зростанню активності Mn-СОД на 13,86 % до $(3,64 \pm 0,10)$ ОД/мг. Активність Cu,Zn-СОД була підвищена на 32,34 % до $(3,17 \pm 0,28)$ ОД/мг, а СОД загальної – на 69 % до $(9,46 \pm 0,12)$ ОД/мг, порівнюючи з групою нелікованих щурів.

Таблиця 4.26 – Показники активності Mn-супероксиддисмутази, Cu,Zn-супероксиддисмутази та супероксиддисмутази загальної у щурів із цирозом при застосуванні LOLA та DFMO

Показник	Контроль	Цироз	Цироз+ LOLA	Цироз + LOLA + DFMO
Mn-СОД (ОД/мг)	4,70 ± 0,08	3,20 ± 0,10***	3,64 ± 0,10 [§]	1,42 ± 0,14 ^{†††}
Cu,Zn-СОД (ОД/мг)	5,28 ± 0,16	2,40 ± 0,12***	3,17 ± 0,28 [§]	2,08 ± 0,10 ^{††}
СОД загальна у печінці (ОД/мг)	10,50 ± 0,17	5,60 ± 0,07***	9,46 ± 0,12 ^{§§§}	3,51 ± 0,02 ^{†††}
Примітка. ***P<0,001 проти групи контролю; [§] P<0,05, ^{§§§} P<0,001 проти групи цирозу, ^{††} P<0,01, ^{†††} P<0,001 проти лікування LOLA.				

Введення DFMO реверсувало здатність LOLA підвищувати активність Mn-СОД при цирозі на фоні заблокованого синтезу поліамінів, і її показники склали (1,42 ± 0,14) ОД/мг у групі DFMO проти (3,64 ± 0,10) ОД/мг у групі LOLA, а різниця між групами сягала 61 %.

Такий же ефект виник і щодо активності Cu,Zn-СОД. Блокування синтезу поліамінів заблокувало активність LOLA щодо підвищення активності фермента в умовах цирозу, тому вона була на 34,47 % нижчою: (2,08 ± 0,10) ОД/мг у групі DFMO проти (3,17 ± 0,28) ОД/мг у групі LOLA.

Врешті, активність СОД загальної зазнала майже трикратного зниження (-63 %) до (3,51 ± 0,02) ОД/мг при паралельному застосуванні LOLA та DFMO, порівнюючи із показником активності цього фермента при лікуванні цирозу за допомогою LOLA при нормальному синтезі поліамінів.

Отже, в результаті проведених досліджень можна зробити висновок, що процес синтезу поліамінів відіграє надзвичайно важливу роль у механізмі протективної дії LOLA в умовах цирозу, оскільки застосування DFMO заблокувало досліджувані нами властивості препарату, завдяки яким він запобігав розвитку патологічних синдромів, що супроводжують тетрахлорметан-індукований цироз.

Базуючись на результатах представлених у даному розділі можна стверджувати, що:

1. При експериментальному цирозі виявлено порушення структури печінки із формуванням псевдоочащочок, оточених полями фіброзу у поєднанні із лімфо-гістоцитарною інфільтрацією. В гепатоцитах візуалізуються дистрофічно-некротичні зміни. Імуногістохімічне дослідження свідчить про посилення руйнації гепатоцитів та стимуляції формування колагенових волокон і відкладання позаклітинного матриксу. Експериментальний цироз характеризується розвитком процесів цитолізу та холестазу, зниженням активності мітохондріальних ферментів, зменшенням рівня NO_2^- у крові із супутнім зростанням його вмісту у печінці; втратою активності функціонування антиоксидантного захисту на тлі інтенсифікації прооксидантних процесів, що призводить до наростання проявів ендотоксикозу.

2. Препарат LOLA при цирозі сприяє покращенню морфофункціонального стану печінки, та виявляє протективні властивості щодо гепатоцитів запобігаючи розвитку синдромів цитолізу та холестазу, знижує експресію $\text{TNF-}\alpha$ та $\text{TGF-}\beta$, підвищує синтез білка, сечовини та поліамінів, зменшує явища ендотоксикозу, покращує метаболічні процеси у печінці, пригнічує прооксидантні процеси, посилюючи при цьому антиоксидантні, покращує функціонування системи мітохондріального дихання.

3. Блокування синтезу оксиду азоту за допомогою L-NAME не реверсувало більшість протективних ефектів LOLA при експериментальному цирозі печінки. Встановлено що ефекти LOLA щодо активності аланінамінотрансферази, лужної фосфатази, гамма-глутамілтрансферази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази, вмісту загального білірубину, сечовини, загального білка у крові та печінці, активних продуктів тіобарбітурової кислоти, відновленого глутатіону були реалізовані незалежно від активності NO-синтази. За даної експериментальної моделі ми встановили взаємозв'язок в механізмі дії LOLA між впливом на синтез нітроген оксиду та

експресією цитокінів TNF- α та росту TGF- β , концентрацією молекул середньої маси, активністю глутатіон-S-трансферази, каталази та супероксиддисмути.

4. Результати наших досліджень свідчать, що застосування блокатора синтезу поліамінів DFMO у щурів із цирозом печінки на фоні корекції LOLA реверсує протективну дію препарату щодо процесів цитолізу та холестазу, стану системи прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального дихання, ендотоксикозу. Зміна морфологічної будови печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичними проявами гепатоцитів, лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією колагенової строми, мукоїдним та фібриноїдним набряком полів фіброзу.

Результати представлені в даному розділі опубліковано в таких працях [248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальна тетрахлорметанова модель, яку ми використали в наших дослідженнях, відтворює основні біохімічні й гістопатологічні зміни, характерні для гострого ураження печінки в людей [196].

Патогенез гострого ураження при токсичному гепатиті протікає стадійно, спочатку ураження гепатоцитів, далі порушення проникності мітохондрій, і остання стадія – загибель гепатоцитів [45]. Початкове пошкодження клітин печінки, спричинене токсичними агентами не прогресує рівномірно до третьої стадії, а пошкоджений гепатоцит може бути відновлений за допомогою механізмів захисту та регенераційної здатності, саме тому ми проводили дослідження на 3 та 7 доби експерименту, які відображають 2 та 3 стадію дослідження [46, 47].

Про розвиток гострого токсичного ураження печінки судили за вираженими гістологічними змінами та біохімічними маркерами ураження печінки. На третю добу експерименту відзначали ознаки некротичного ураження та жирової дистрофії централобулярних гепатоцитів з порушенням балкової організації, розширення порталних трактів, лімфогістоцитарну інфільтрацію, що узгоджується з даними літератури щодо морфологічної структури печінки за гострого токсичного ураження [259]. Ознаки ураження прогресивно зменшувалися на 7 добу експерименту з активізацією процесів регенерації, про що свідчила поява двоядерних гепатоцитів.

Фармакологічна корекція за допомогою LOLA призвела до відновлення структури печінки, що підтверджується результатами інших науковців [260]. Так, вже у перший термін дослідження в ділянці порталних трактів спостерігали лише поодинокі залишкові ознаки ураження печінки у вигляді окремих клітин з вакуолярними включеннями. Часточкова структура печінки зберігалася, добре візуалізувалася трабекулярна структура. Лише в

окремих гепатоцитах виявлялися незначні ознаки дистрофічних змін, ядра виявлялися у всіх клітинах, міжклітинні контакти були збережені.

При ушкодженні печінки збільшується гепатоцелюлярна проникність, через що АЛТ і АСТ вивільняються і проникають у плазму [225], у зв'язку із чим підвищується активність цих ферментів в сироватці крові. Результати наших досліджень показали, що активність АЛТ достовірно збільшувалася на 82,78 % та 70,30 %, а АСТ була в 4 рази вищою за контрольні значення в обидва терміни експерименту. При застосуванні LOLA показники АЛТ та АСТ були на 26,07 % та 50,82 % нижчими порівняно із показниками тварин з нелікованим гепатитом на 3 день, а на 7 добу відповідно на 24,02 % і 50,86 %. Отже, фармакологічна корекція за допомогою LOLA достовірно запобігала зростанню активності амінотрансфераз як на 3 день токсичного гепатиту, так і через тиждень після його моделювання, що свідчить про здатність препарату запобігати цитолізу та підтверджується клінічними даними [152]. Смирнов Н.Л., 2011 відзначив позитивну динаміку в біохімічних показниках цитолізу у хірургічних пацієнтів із ураженнями паренхіми печінки [261].

Запалення, що виникає в результаті токсичного ураження печінки, спричиняє набряку гепатоцитів, що призводить до оклюзії жовчних протоків та, як наслідок, перевантаження гепатоцитів речовинами, екскреція яких стає неможливою і вони потрапляють у системний кровотік. В результаті цих патологічних процесів розвивається внутрішньопечінковий холестаза [226], на що вказує зростання активності ЛФ в обидва терміни експерименту. Холестаза, в свою чергу, сприяє зростанню концентрації всіх складових жовчі, в тому числі, холестеролу і білірубину, що узгоджується з нашими результатами [226]. Лікування гепатиту за допомогою LOLA сприяло зниженню концентрації ЗБ на 54,30 % до $(5,84 \pm 0,47)$ ммоль/л та на 40,51 % до $(4,06 \pm 0,34)$ ммоль/л через 3 і 7 днів, відповідно. У той же час достовірного зниження ЗХ під впливом LOLA на 3 добу не виникало, однак, на 7 добу його рівень $(1,42 \pm 0,07)$ мкмоль/л був достовірно нижчим на 24,82 %, порівняно з нелікованими щурами. Наші результати щодо зниження активності ГГТ та ЛФ при гострому ураженні

печінки узгоджуються з результатами експериментальних та клінічних досліджень інших науковців [152]. Зменшення проявів холестазу може бути обумовлено здатністю покращувати процеси жовчовиділення за даними О.М. Креховської-Лепявко [268].

Печінка є місцем метаболізму вуглеводів, жирів і білків, де відбувається їх синтез та розпад. Майже всі білки сироватки крові синтезуються гепатоцитами в фізіологічних умовах. При пошкодженні печінки цей процес може бути порушений [226]. Індукування токсичного гепатиту викликало пригнічення білковосинтезуючої функції печінки, сприяючи зниженню концентрації загального білка на 24,01 % та 13,50 % у крові та 25,14 % 20,33 % у печінці проти групи контролю та відповідно до термінів дослідження. Застосування LOLA виявилось ефективним у відновленні білоксинтезуючої функції печінки та сприяло збільшенню концентрації загального білка і в крові (на 26,20 % та 20,27 %) і в печінці (на 17,47 % та 23,49 %) порівняно з нелікованими тваринами.

Путресцин є попередником поліамінів спермідину та сперміну, синтезується в печінці з амінокислоти L-орнітину за участі ферменту орнітиндекарбоксилази [181]. При гепатиті їх синтез вірогідно знижується, що узгоджується з даними Huang M. et al. [263]. Застосування LOLA сприяло зростанню рівня путресицину в печінці на 16,3 та 23,3 % відповідно до термінів експерименту та порівняно з нелікованими тваринами.

За введення амінокислот, попередників синтезу поліамінів, таких як аргінін, адеметіонін та орнітин, спостерігається не тільки підвищення синтезу спермідину та сперміну [264], а й покращення морфофункціонального стану печінки [265, 266, 267], що вказує на те, що гепатопротекторний ефект цих амінокислот може мати поліамін-залежний механізм. Активація процесів регенерації, яку ми відмітили морфологічно може бути результатом активації синтезу поліамінів за введення LOLA.

Детоксикація потенційно шкідливих сполук, що потрапляють в організм або утворюються в результаті біотрансформації як нутрієнтів, так і

ксенобіотиків є однією з найважливіших функцій печінки [227]. При гострому ураженні печінки її детоксикаційна функція різко пригнічується внаслідок масивного некрозу гепатоцитів, що робить неможливою елімінацію токсичних іонів амонію з наступним розвитком гіперамоніємії та розвитком енцефалопатії [1]. Зниження рівня сечовини за умов токсичного гепатиту, яке ми отримали в наших дослідженнях, може бути пояснене пригніченням синтезуючої функції печінки на фоні збереженої видільної функції нирок. Лікування LOLA сприяло підвищенню рівня сечовини у більш, ніж вдвічі. Оскільки препарат посилює синтез сечовини у печінці, він може служити як потужний засіб у попередженні печінкової енцефалопатії [228].

Щоб дослідити вплив LOLA на прояви ендотоксикозу ми визначити концентрацію молекул середньої маси. Їх вміст (MCM_1 та MCM_2) вірогідно зростав під впливом CCl_4 на третю (на 38,32 % та 60,65 %) та сьому (на 34,13 % та 59,26 %) доби експерименту відповідно. Лікування LOLA сприяло достовірному зниженню вмісту MCM_1 та MCM_2 в обидва терміни дослідження, що узгоджується з результатами інших науковців [268].

GSH-залежна кон'югація продуктів мембранного пероксидного окислення ліпідів за допомогою глутатіон-S-трансферази, ферменту, який бере участь у клітинній детоксикації, вважається одним із основних клітинних механізмів захисту від токсичності [234]. Застосування досліджуваного препарату викликає деяке зростання активності глутатіон-S-трансферази на 8,0 % на 3 добу експерименту, однак, на 7 добу достовірних змін у активності ферменту не встановлено.

Окиснювальний стрес є значимим у патофізіології різних захворювань печінки. Клітини печінки забезпечені ефективними молекулярними стратегіями для строгого контролю внутрішньоклітинного рівня активних форм кисню і підтримки балансу між молекулами оксидантів і антиоксидантів. Білки гепатоцитів, ліпіди та ДНК належать до клітинних структур, на які в першу чергу впливають АФК та активні форми азоту, порушуючи на клітинному та молекулярному рівнях структурно-функціональний зв'язок клітин печінки.

Надмірна активація вільнорадикальних процесів ліпідних та білкових структур гепатоцитів відіграють вирішальну роль у розвитку та прогресуванні захворювань печінки. Оксидативний стрес разом із пригніченням антиоксидантного захисту викликають надмірне ремоделювання тканин органа, що підтверджується результатами нашого гістологічного дослідження [232, 269].

Надмірне формування ГПЛ та ТБК у щурів з гепатитом, яке ми отримали, свідчить про посилену пероксидацію ліпідів та порушення антиоксидантних захисних механізмів [232]. Тому зменшення утворення проміжних та кінцевих продуктів ліпопероксидації при лікуванні LOLA вказує на виражену здатність препарату пригнічувати реакції пероксидного окиснення ліпідів. Гіперактивація ліпопероксидації веде до напруження ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи.

ЦП є мідьвмісним глікопротеїном, що продукується гепатоцитами та проявляє виражену антиоксидантну дію, пригнічуючи пероксидацію ліпідів через елімінацію супероксид-аніонів. Після моделювання гострого токсичного гепатиту вміст церулоплазміну у сироватці крові щурів підвищувався на 31,94 % та 23,23 %, що можна пояснити вивільненням вмісту гепатоцитів внаслідок цитолізу, а також активацією протеїнів гострої фази запалення [270]. Тому зниження ЦП під впливом LOLA свідчить як про зменшення цитолізу, так і про потенційну протизапальну дію досліджуваного препарату.

Відновлений глутатіон – активний акцептор вільних радикалів, тому зниження його рівня в гепатоцитах в умовах змодельованого нами гепатиту в обидва терміни дослідження може відображати виснаження антиоксидантного резерву [234]. Лікування LOLA сприяло інтенсивному підвищенню концентрації GSH на 76,99 % та 87,43 % відповідно до термінів дослідження.

Каталаза є одним із найважливіших антиоксидантних ферментів, який відіграє важливу роль у метаболізмі перекису водню та підтримці клітинного окисно-відновного гомеостазу [233]. У щурів із змодельованим гепатитом активність каталази у печінці значно знизилася, а у сироватці зростала, що узгоджується з результатами інших науковців та свідчить про вихід ферменту із

гепатоцитів в сироватку крові через виражений цитоліз [271]. Введення LOLA з метою корекції значно підвищило активність ферменту у печінці та знизило його активність у сироватці крові.

Відомо, що супероксиддисмутаза – фермент антиоксидантного захисту, що каталізує дисмутацію радикалів O_2 та перешкоджає перетворенню супероксидного аніон-радикала в гідроксильний високотоксичний радикал, а також служить акцептором вільних кисневих радикалів, уповільнюючи перекисне окиснення ліпідів та білків [237]. Визначали два типи СОД: цитозольну Cu/Zn-СОД, та мітохондріальну Mn-СОД. Обидві форми ферменту ефективно знешкоджують супероксид-аніон-радикал як одну з найбільш активних вільнорадикальних сполук в різних структурах клітини та підтримують окисно-відновний баланс [238].

У щурів із CCl_4 -індукованим ураженням печінки на 3 добу активність Mn-СОД достовірно не змінювалася, однак активність цитозольної Cu,Zn-СОД знижувалася вдвічі, що корелювало із загальним зниженням активності фермента та узгоджувалося з даними Suzuki K, 1991. [272]. Це може свідчити про поступове зниження експресії ферменту, спочатку в цитозолі гепатоцита при збереженій активності фермента в мітохондріях. Фармакологічна корекція за допомогою LOLA сприяла вираженому зростанню активності мітохондріальної Mn-СОД, що вказує на протективні властивості препарату. Спостерігалася тенденція до зростання активності цитозольної форми ферменту, а показник СОД загальної вірогідно зростав на 21,8 % порівнюючи з групою нелікованих щурів. На 7 добу експерименту спостерігаємо пригнічення активності усіх форм ферменту при гепатиті та зростання їх активності за введення LOLA, що узгоджується з даними інших науковців [273].

Показник загальної антиоксидантної активності враховує кумулятивну дію всіх антиоксидантів, присутніх у плазмі та тканинах організму. Низька ЗАА може свідчити про оксидантний стрес або підвищену сприйнятливність до окисного пошкодження [239]. Ми спостерігали зниження ЗАА в обидва терміни

дослідження з достовірним її підвищення за введення коригуючого чинника, особливо на третю добу дослідження.

При активації процесів пероксидації ліпідів забезпечення енергією більшості гепатоцитів знижується через розмежування дихання і оксидативного фосфорилування у мітохондріях, які є основними мішенями для гепатотоксичних ефектів багатьох речовин. Дисфункція цих органел викликає порушення енергетичного метаболізму та ініціює внутрішньоклітинний оксидативний стрес [232]. Про стан системи мітохондріального дихання за введення LOLA при гепатиті судили за активністю СДГ та ЦХО. СДГ відіграє важливу роль у циклі Кребса, конвертуючи сукцинат у фумарат, в результаті відбувається окислення субстрату (NAD^+ і FAD) та відновлення NADH і FADH_2 . NADH і FADH_2 , що утворилися, є носіями електронів, які згодом використовуються для генерації АТФ в електронному транспортному ланцюзі, таким чином, сукцинатдегідрогеназа відіграє важливу роль у виробництві енергії в клітинах. ЦХО вважається кінцевим ферментом у мітохондріальному електрон-транспортному ланцюгу і служить для переносу електронів, а її знижена активність відображає порушення енергетичного метаболізму [274]. Зниження активності СДГ і ЦХО, зумовлене CCl_4 -індукованим гепатитом, свідчить про порушення функції електрон-транспортного ланцюга, що веде до зниженої утилізації кисню тканинами. Це, у свою чергу, може підвищувати потребу гепатоцитів у енергії та посилювати пошкодження печінки [274]. Відомо, що 2 ферменти, які приймають участь в перетворенні орнітин-аргінін-цитрулін, а саме орнітин транскарбамілаза та орнітин- δ -амінотрансфераза є ферментами мітохондріальної матриці, то орнітин з цитоплазми повинен транспортуватися до мітохондріальної матриці за допомогою спеціальної транспортної системи, що потребує енергії [275]. Тому той факт, що LOLA підвищує активність ЦХО та СДГ при ураженні печінки, дає можливість припустити його потенційну ефективність у відновленні мітохондріального дихання та нормалізувати метаболізм орнітину. Більш того, Sisalli M.J. та співавтори зазначають, що LOLA може безпосередньо впливати на мітохондрії,

втручаючись у мітохондріальні механізми, пов'язані з продукцією активних форм кисню і активних форм нітрогену, сприяючи тим самим функціональному відновленню мітохондрій за рахунок відтоку мітохондріального кальцію, ймовірно, за рахунок активації ізоформи 3 трансмембранного протеїну $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінника (NCX3). При цьому генерація активних форм кисню знижується, а продукція NO підвищується [276].

Ще в 1991 році Valance and Moncada висловили припущення, що NO може бути відповідальним за гіпердинамічні зміни при ураженнях печінки. Враховуючи те, що одним із можливих механізмів протективної дії LOLA може бути пов'язаний із системою аргінін-NO ми вирішили дослідити рівень стабільного кінцевого метаболіту NO – нітрит-аніону в крові та печінці. Встановлене нами підвищення сироваткової концентрації NO_2^- при її зниженні у тканинах печінки може бути пов'язане із пригнічення активності eNOS у гепатоцитах через роз'єднання (uncoupled) ферменту, а зростання активності iNOS у плазмі зумовлене надмірним вивільненням прозапальних цитокінів, що є типовою ознакою гострого гепатиту [277]. Застосування LOLA підсилювало синтез NO_2^- у сироватці на 23 % і на 26,51 % у печінці на 3 добу експерименту, проте на 7 добу – продукція NO_2^- у сироватці зменшилася на 23,64 %, хоча його вміст у печінці підвищився на 21,99 %. Реакція супероксиду з оксидом азоту в мітохондріях, яка призводить до генерації високореактивних видів пероксинітриту, є молекулярною основою ініціювання мітохондріальної дисфункції та наступних патологічних змін [68].

З даних літератури відомо, що гіперпродукція NO при токсичних ураженнях печінки пов'язана зі зростаннями ендотоксемії, що прямо або опосередковано через систему цитокінів стимулює синтез оксиду азоту [68]. Разом з тим, інші дослідження вказують на зниження синтезу NO та зниження активності конститутивної NO-синтази (NOS) при [75]. Щоб встановити, які з досліджуваних нами ефектів LOLA можуть бути залежними від системи L-орнітин – L-аргінін – NO, ми дослідили ефективність препарату за умов блокування NOS. В якості інгібітора синтезу нітроген оксиду нами було обрано

N-нітро-L-аргінін метиловий ефір – L-NAME. Завдяки своїй ліпофільній структурі він добре проникає через мембрани. Усередині клітини L-NAME, який є проліком, піддається деестерифікації і стає еквівалентом L-нітро-L-аргініну, потужному інгібітору всіх ізоформ NOS з преференцією до cNOS [278]. Неселективність його дії забезпечує пригнічення як фізіологічного метаболізму L-аргініну-NO, який забезпечується ендотеліальною NOS, так і цитокініндукованого синтезу оксиду азоту за рахунок пригнічення індукцибельної NOS. Про пригнічення синтезу нітроген оксиду за введення L-NAME при паралельному введенні LOLA у тварин з гепатитом судили за зменшенням концентрації NO_2^- у сироватці та в печінці.

Як зазначено вище у нашому дослідженні препарат LOLA проявив високу ефективність у попередженні синдромів цитолізу та холестазу, які були викликані тетрахлорметановим ураженням печінки. Динаміка змін активності амінотрансфераз у щурів з токсичним гепатитом при лікуванні препаратом LOLA та одночасним застосуванням L-NAME на 3 та 7 доби дослідження продемонструвала NO-залежний механізм дії LOLA у попередженні синдрому цитолізу. Застосування L-NAME пригнітило здатність LOLA інгібувати активність ЛФ та ГГТ, що вказує на можливий NO-залежний механізм дії LOLA у попередженні синдрому холестазу. Наші дослідження узгоджуються з попередньо проведеними в нашій лабораторії дослідженнями щодо впливу модуляторів синтезу оксиду азоту на процеси жовчовиділення [279]. При блокуванні активності NOS не відбувалося пригнічення здатності LOLA знижувати вміст в сироватці крові ЗБ та ЗХ ні у гострому періоді, ні в динаміці.

Індукування токсичного гепатиту викликало пригнічення білоксинтезуючої функції печінки, сприяючи зниженню концентрації загального білка у крові та в печінці на 3 і 7 дні експерименту. Лікування препаратом LOLA викликало відновлення білоксинтезуючої функції печінки та призвело до збільшення концентрації загального білка і в крові, і в печінці. Однак, блокування синтезу NO при введенні L-NAME інгібувало здатність препарату LOLA підтримувати нормальний вміст білка у крові, і його рівень був знижений в

обидва терміни дослідження. У той же час введення L-NAME не вплинуло на ефективність LOLA щодо підтримання вмісту загального білка у печінці. Тому, ми не можемо припускати NO-асоційований механізм реалізації активації синтезу білка. Рівень путресцину в печінці достовірних змін також не зазнавав.

Застосування L-NAME не реверсувало ефективності LOLA у збереженні здатності печінки синтезувати сечовину ні на 3 день, ні на 7 день дослідження.

У щурів із заблокованою активністю NOS втрачається здатність препарату знижувати вміст MCM_1 та MCM_2 , тому їх рівень залишався значно вищим, порівнюючи із щурами із нормальною функцією системи нітроген оксиду.

Враховуючи, що NO є вільним радикалом, який легко вступає у взаємодію з іншими сполуками, завдяки непарному електрону на зовнішній орбіталі, цілком логічним було припустити [280], що деякі ефекти LOLA на процеси ліпопероксидації та стан антиоксидантного захисту можуть мати NO-залежні механізми.

Нами встановлено, що застосування L-NAME заблокувало позитивні ефекти LOLA щодо відновлення активності каталази в печінці і, відповідно зменшення в крові. Введення L-NAME не спричинило достовірних змін у ефектах LOLA щодо впливу на активність ферментів Mn-COD і Cu,Zn-COD. Однак, активність COD загальної, пригнічення якої внаслідок гепатиту було попереджено лікуванням LOLA, зменшилася на фоні застосування L-NAME на 3 добу експерименту. Зростання активності ферментів антиоксидантного захисту каталази та супероксиддисмутази за введення аргініну було зафіксовано Н. Г. Близнецовою. Цей ефект дослідник пов'язує з впливом NO на експресію генів, що кодують антиоксидантні ферменти [281]. Застосування L-NAME поряд із LOLA пригнітило здатність препарату запобігати зростанню антиоксидантного мідь-вмісного білка церулоплазміну, і його вміст залишався значно підвищеним, особливо на пізніших термінах, що узгоджується з результатами інших науковців та корелює з впливом інгібіторів NOS на синтез білка [282]. Ефекти LOLA щодо відновленого GSH, на нашу думку, реалізовані через NO-залежний механізм, оскільки при заблокованій активності NO-

синтази його вміст залишався, як і при гепатиті, зниженим на 3 і 7 доби дослідження. Активність глутатіон-S-трансферази пригнічувалася у групі LOLA+L-NAME лише на 3 день після розвитку гепатиту, тому вважаємо що в механізмі підвищення активності зазначеного ферменту можуть відігравати роль і інші фактори.

Ґрунтуючись на показнику ЗАА також можна стверджувати, що механізми дії LOLA на процеси ліпопероксидації лише частково мають NO-залежний механізм, тому що блокування NOS не впливало на здатність LOLA забезпечувати потужний антиоксидантний захист при гепатиті. Блокування синтезу NO не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, активність ізоформ СОД, рівень ТБК-активних продуктів.

Однак наші дослідження дозволяються припустити взаємозв'язок між продукцією NO та рівнем ГПЛ, відновленого глутатіону, церулоплазміну активністю каталази.

Активність СДГ та ЦХО достовірно знижувалася у групі LOLA+L-NAME порівняно з тваринами, які отримували лікування тільки LOLA. Проведені нами дослідження показали, що здатність покращувати процеси мітохондріального дихання за введення LOLA пов'язані з дисбалансом системи нітроген оксиду. Таким чином можна стверджувати, що гепатопротективний ефект LOLA при гострому гепатиті в значній мірі реалізується через NO-залежний механізм.

З метою вивчення впливу LOLA на синтез поліамінів за умов токсичного гепатиту піддослідним тваринам разом з LOLA вводили α -DFMO (Альфа-дифторметилорнітин), який є незворотним інгібітором орнітин декарбоксилази (ОДЛ), першого і лімітуючого швидкість біосинтезу поліамінів фермента. Поліаміни мають багато функцій, але в першу чергу важливі для клітин, що швидко проліферують. Таким чином, ОДЛ потенційно є мішенню препаратів для лікування захворювань, при яких швидка проліферація є ключовим процесом, що призводить до патології. DFMO спочатку досліджувався як протипухлинний засіб, але його ефективність не була високою. Однак DFMO

був успішно застосований для лікування африканської сонної хвороби і наразі є одним із небагатьох клінічно використовуваних препаратів для боротьби з цією забутою тропічною хворобою. Інша заявка, схвалена FDA для DFMO як активного інгредієнта крему для видалення волосся Vaniqa. Патентом захищені експериментальні дослідження щодо застосування блокаторів NOS та DFMO для лікування депресії [283]. В останні роки відновлення інтересу до DFMO лікування для гіперпроліферативних захворювань призвело до збільшення кількості багатообіцяючих доклінічних досліджень і клінічних випробувань, наприклад як хіміопрофілактичного та хіміотерапевтичного засобу проти колоректального раку та нейробластоми [286].

Про ефективність пригнічення синтезу поліамінів за введення DFMO, судили за концентрацією путресцину, яка достовірно знижувалася порівняно з групами LOLA та гепатит, і була нижчою за показник контролю, що узгоджується з результатами інших науковців [284].

Блокування синтезу поліамінів при введенні DFMO інгібувало здатність препарату LOLA підтримувати нормальний рівень білка у крові, і його рівень був знижений, що підтверджує роль поліамінів в регуляції білкового синтезу [285].

Введення DFMO інгібувало здатність LOLA попереджувати зростання маси печінки при гепатиті і покращувати морфофункціональний стан органа. Це морфологічно підтверджувалось вираженою великокрапельною та дрібнокрапельною жировою дистрофією, гіаліново- крапельною білковою дистрофією гепатоцитів перипортальних трактів та помірною лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією на 3 добу експерименту, а на 7 добу відмічаються глибокі дистрофічно-некротичні зміни гепатоцитів у поєднанні із вираженою лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією стромы. За одночасного введення DFMO та LOLA знижувати активність амінотрансфераз, у порівнянні із групою тварин, яким вводять тільки LOLA. Тому можна припустити поліамін-залежний механізм дії препарату у попередженні цитолізу і холестазу. Наші дослідження узгоджуються з результатами клінічних

досліджень DFMO для лікування нейробластоми. У 5 % пацієнтів цього дослідження підвищувалася активність АЛТ та АСТ [286].

У здатності LOLA пригнічувати продукцію MCM, як маркера ендотоксикозу, поліамін-залежний механізм дії проявлявся уже на ранніх термінах дослідження. Наукові дослідження свідчать, що DFMO проявляє ототоксичну дію, фетотоксичну дію, викликає ураження тонкої кишки, а саме некроз криптового епітелію та мікроабсцес крипт, і навіть потенціює токсичність інших лікарських засобів [384, 287, 288].

Застосування DFMO призвело до блокування LOLA щодо впливу на вміст нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів з гепатитом, що свідчить про критичну роль орнітин декарбоксилази (ОДЛ) у функціонуванні орнітинового циклу перетворення L-аргініну в механізмі реалізації протекторних ефектів ефектів LOLA. Цей неочікуваний нами ефект можна пояснити тим, що існує взаємозв'язок між цими сигнальними речовинами [289] і NO здатен стимулювати синтез поліамінів [290].

Нами встановлено, що препарат LOLA втратив свою здатність пригнічувати продукцію проміжних та кінцевих продуктів ліпопероксидації ГПЛ та ТБК, і їхній вміст був значно вищим, порівнюючи із показниками щурів, пролікованих LOLA. При застосуванні DFMO процеси ліпопероксидації можуть активізуватися, що узгоджується з результатами [291]. Про здатність поліамінів пригнічувати процеси ліпопероксидації показано в дослідженнях Bellé NA et al., 2004. Вони показали, що поліаміни спермін та спермідин можуть бути акцепторами вільних радикалів та виступати в ролі антиоксидантів [292, 240].

Ефекти LOLA щодо системи глутатіону також можуть реалізовуватися через механізми, асоційовані із синтезом поліамінів та їх дією, адже блокування їх продукції призводило до зменшення вмісту GSH. Відомо про взаємозв'язок системи глутатіону та поліамінів. Вплив поліаміну на генерацію відновленого глутатіону аналізували в дріжджах. Спермін стимулював відновлення окисленого глутатіону в присутності глюкозо-6-фосфату або ізоцитрату в

пермеабілізованих клітинах дріжджів. Стимуляція утворення GSH відбувалася за рахунок посилення надходження NADPH (відновленого нікотинаміадеїндинуклеотидфосфату). Поліамінактивована мітохондріальна NADP (нікотинаміададеїндинуклеотидфосфат)-ізоцитратдегідрогеназа і цитозольна глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа з дріжджів. Активуюча дія поліаміну здебільшого полягала в впливі на максимальну швидкість цих ферментів, а порядок ефективності як активаторів був спермін > спермідин > путресцин [293].

Блокування синтезу поліамінів також зменшувало здатність LOLA покращувати мітохондріальне дихання, про що свідчили показники активності ЦХО та СДГ. Наші дослідження узгоджуються з результатами Fujimoto S., et al. [294]. Дослідження проведені на культурі клітин HepG2 (лінія клітин гепатобластами людини), що оброблена DFMO показали, що три гени, які були пов'язані з дихальним ланцюгом і окисним фосфорилуванням, піддаються down-регуляції. Їх проаналізували за допомогою аналізу Northern blot. Було виявлено, що субодинаця 1 цитохромоксидази, низько-молекулярний убіхінон зв'язаний протеїн, і субодинаця 2 НАДН-дегідрогенази регулюються путресцином.

Блокування синтезу поліамінів нівелювало нормалізуючий вплив LOLA на активність антиоксидатних ферментів каталази та СОД при токсичному гепатиті, що може бути пов'язано як з антиоксидантною дією самих поліамінів, так і з їх прямим впливом на синтез цих ензимів як білкових сполук.

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про те, що процес синтезу поліамінів відіграє надзвичайно важливу роль у механізмі протективної дії LOLA в умовах токсичного гепатиту як у гострому періоді, так і динаміці, оскільки застосування DFMO реверсує більшість ефектів препарату у попередженні розвитку патологічних синдромів, що супроводжують тетрахлорметан-індуковане ураження печінки.

Цироз печінки – одна з основних причин смертності серед хвороб печінки. Саме цироз формує кінцеву стадію багатьох хронічних захворювань

печінки. Поширеність цирозу печінки, становить 200–300 осіб на 100 тис. населення [295].

Формування цирозу за використаної нами експериментальної моделі підтверджувалось гістологічно формуванням в паренхімі печінки значних полів фіброзу у поєднанні із вираженою лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією та появою псевдоцистичок.

При цирозі печінки LOLA проявляє виражену активність у відновленні морфофункціонального стану печінки, запобігаючи розвитку синдромів цитолізу та внутрішньопечінкового холестазу. Про що свідчить встановлене нами зниження активності АСТ, АЛТ, ГГТ, ЛФ та зниження вмісту компонентів жовчі в сироватці крові. Результати наших досліджень співпадають з даними клінічного застосування LOLA у пацієнтів з цирозом печінки [152].

Патоморфологічно циротичне ураження формується внаслідок порушення гомеостазу між фіброгенезом та фібролізом. Складний процес фіброгенезу ініціюється основним пошкоджуючим фактором, таким як вірус, алкоголь, токсин, продукт обміну речовин та ін., що призводить до їх некрозу та активації запальної реакції [296]. Проліферуючі запальні клітини, клітини Купфера і тромбоцити вивільняють цитокіни та фактори росту. Фактор некрозу пухлини (TNF- α) – це прозапальний цитокін, який бере участь у різних патологічних процесах, включаючи хронічне токсичне ураження печінки із формуванням цирозу печінки. Гепатоцити реагують на TNF- α , що виділяється клітинами Купфера. Після зв'язування TNF- α гепатоцит проліферує або зазнає апоптозу або некроптозу. Інгібітори TNF- α полегшують процеси пошкодження тканини, що моделюються на тваринах, і свідчить про те, що зниження (але не усунення) рівня TNF- α зміщує баланс TNF- α у бік його позитивних функцій. Трансформуючий фактор росту (TGF- β) є центральним регулятором хронічного процесу в печінці, що сприяє (потенціює) розвитку всіх стадій захворювання від початкового ураження печінки через запалення та фіброз до цирозу [72]. Активація трансформуючого фактора росту (TGF- β) підсилює руйнування

гепатоцитів та опосередковує активацію печінкових зірчастих клітин і фібробластів, що призводить до формування колагенових волокон, включаючи утворення міофібробластів і відкладення позаклітинного матриксу. Тому TGF- β вважається основним профіброгенним цитокіном що корелює зі швидкістю прогресування захворювання [297]. Моделювання CCL₄ індукованого цирозу проявляється формуванням вираженого фіброзу по ходу портальних трактів, дистрофічними та дистрофічно-некротичними змінами в гепатоцитах, значною лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією фіброзних полів, появою TNF- α та TGF- β факторів на мембранах клітин переважно в просвітах синусоїдів. Це вказує на посилення руйнування гепатоцитів та опосередковує активацію печінкових макрофагів і фібробластів, що призводить до інтенсифікації формування колагенових волокон, відкладення позаклітинного матриксу. Застосування LOLA при експериментальному цирозі печінки різко знижує активацію TNF- α та TGF- β на мембранах клітин в просвітах синусоїдів та частково знижує лімфо-гістіоцитарної інфільтрацію переважно в паренхімі печінки. Отже ми з'ясували, що застосування LOLA при експериментальному цирозі печінки різко знижує активацію TNF- α та TGF- β на мембранах клітин в просвітах синусоїдів та частково знижує кількість лімфо-гістіоцитарної інфільтрації переважно в паренхімі печінки, покращує структуру печінки.

В умовах моделювання цирозу у щурів рівень сечовини та загального білка зазнає суттєвого зниження, що пов'язано із порушеною синтезуючою функцією органа. Повторне введення LOLA з лікувальною метою призвело до покращання синтезуючої функції печінки, а саме достовірного зростання концентрації білка у крові та печінці, а також рівня сечовини в сироватці, що узгоджується з результатами Kircheis G., Lüth S. [1]. Фармакологічна корекція за допомогою LOLA сприяла зменшенню ендотоксикозу, на що вказувало достовірне зниження вмісту MCM₁ та MCM₂ на 16,88 % та 25 %, порівняно із групою тварин, що не отримували лікування.

Окиснювальний стрес не тільки запускає пошкодження печінки, індукуючи безповоротну зміну ліпідів, білків та вмісту ДНК і, що

найважливіше, модулює шляхи, що забезпечують нормальні біологічні функції. Оскільки ці шляхи регулюють транскрипцію генів, експресію білків, клітинний апоптоз та активацію ЗКП, розглядається як один із патологічних механізмів, що призводить до прогресування захворювань печінки. Про активацію процесів ліпопероксидації за експериментального цирозу судили за достовірним зростанням концентрації ТБК-реактивних та ГПЛ. Зниження продукції досліджуваних продуктів ПОЛ при лікуванні LOLA вказує на виражену здатність препарату пригнічувати вільнорадикальні реакції. Цей ефект пов'язують з глутаматом, який утворюється з LOLA, також може перетворитися на глутатіон, який є важливим антиоксидантом для гепатоцитів [298] і вміст якого достовірно зростає відповідно до наших результатів. Повторне введення LOLA тваринам із цирозом з лікувальною метою підвищувало спроможність і інших компонентів ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи, а саме активність каталази, супероксиддисмутази та її фракції, вміст церулоплазміну.

Після моделювання цирозу у щурів спостерігалось підвищення сироваткового вмісту нітрит-аніона (NO_2^-) майже втричі, а печінковий вміст NO_2^- був знижений. Лікування препаратом LOLA попередило індуковане цирозом підвищення NO_2^- у сироватці та попереджувало зниження нітрит-аніону в печінці, що узгоджується з даними інших дослідників щодо NO-залежного механізму дії препарату [299]. Клінічні дослідження у пацієнтів з цирозом [172], а також на експериментальній моделі хронічної печінкової недостатності [150] підтверджують, що введення LOLA дійсно призводить до накопичення L-аргініну, який є субстратом для NO-синтази (NOS), а збільшення його доступності призведе до збільшення ендотеліальної NOS з подальшим покращенням мікроперфузії печінки [167].

Таким чином, результати наших досліджень свідчать про виражені протективні ефекти препарату LOLA при цирозі, зумовленому тетрахлорметаном. Про це свідчить його здатність в деякій мірі покращувати структуру органа, пригнічувати формування фіброзу, зменшувати активність

цитокінів TNF- α та TGF- β , знижувати ступінь синдромів цитолізу та внутрішньопечінкового холестазу, покращувати метаболічні процеси в гепатоцитах, зменшувати прояви ендотоксикозу, пригнічувати прооксидантні процеси, посилюючи при цьому антиоксидантні функції організму.

З метою вивчення, які з цих позитивних фармакодинамічних ефектів досліджуваного препарату пов'язані із впливом на систему нітроген оксиду, ми порівнювали дію препарату при активній функції NOS та при її блокуванні за допомогою L-NAME. Стан системи оксиду азоту при блокуванні NOS оцінювали за зниженням вмісту нітрит-аніону у сироватці і печінці щурів, що служило маркером пригнічення активності NO-синтаз.

Структурні зміни печінки у групі тварин яким вводили LOLA у поєднанні з L-NAME на фоні сформованого цирозу характеризуються вираженим запальним явищами, а саме лімфо-гістіоцитарною інфільтрацією, особливо навколо розширених та повнокровних судин портальних трактів, периваскулярним набряком, який поширювався переважно по стромі та мукоїдним набряком колагенових волокон. Це узгоджується з результатами імуногістохімічних досліджень, які вказують на помірне зростання вмісту фактору некрозу пухлин переважно на мембранах в просвітах синусоїдів TNF- α та трансформуючого фактора росту TGF- β із переважанням локалізації в просвітах синусоїдів навколо портальних трактів. Дані результати узгоджуються з даними Mona Fouad Mahmoud et al. [300], які також встановили підвищення експресії генів TNF- α та TGF- β за введення L-NAME у тварин з перев'язкою жовчних протоків.

Одночасне введення L-NAME не реверсувало ефекти LOLA щодо зниження активності амінотрансфераз, а навпаки, потенціювало властивості препарату, сприяючи зниженню ферментів-маркерів цитолізу. Одночасне застосування L-NAME не порушило також і здатність LOLA інгібувати активність ЛФ та ГГТ. Це свідчить про незалежність механізму протективної дії фармакологічного засобу у попередженні синдрому цитолізу і холестазу в щурів з експериментальним цирозом.

Блокування синтезу NO при введенні L-NAME не реверсувало і здатність препарату LOLA покращувати синтезуючу функцію печінки та збільшувати синтез сечовини, що також свідчить про незалежність цих механізмів від системи нітроген оксиду при цирозі.

А ось пригнічення ендотоксикозу під впливом LOLA відбувається через NO-залежний механізм, про що свідчили дані щодо концентрації середньомолекулярних пептидів у групі LOLA + L-NAME, що узгоджується з результатами інших науковців, які показали, що донатори нітроген оксиду здатні зменшувати явища ендотоксикозу при цирозі печінки [163].

Серед таких патологічних факторів як запалення, імунні реакції, ендотоксикоз та вільнорадикальне окиснення існують складні перехресні зв'язки [97].

Зміни таких показників прооксидантної системи як вмісту ГПЛ та ТБК у печінці у щурів із цирозом при лікуванні LOLA та L-NAME вказують на те, що антиоксидантні властивості LOLA при цьому патологічному стані реалізуються не через NO-залежний механізм, адже активність процесів ліпопероксидації залишається високою. Про активізацію процесів переокиснення мембранних ліпідів за повного блокування NOS при експериментальному цирозі зазначено в публікації Олещук О.М. та співав. [301].

Дані щодо активації ПОЛ корелюють із показниками стану антиоксидантної системи, які ми отримали в нашому експерименті. Застосування L-NAME не лише не реверсувало здатність LOLA підвищувати активність каталази в печінці, а й потенціувало цей ефект, сприяючи підвищенню активності фермента. В дослідженні Purwar N. et al. [302] показано взаємодію нітроген оксиду та каталази на структурному та кінетичному рівнях. Високі концентрації нітроген оксиду можуть порушити функціонування каталази. Каталаза – це фермент, який відповідає за розкладання перекису водню водою та киснем. Нітроген оксид може реагувати з іонами заліза, які є необхідними для каталізування розкладання перекису водню каталазою. Це

може призвести до зменшення активності каталази та збільшення концентрації перекису водню, що може бути шкідливим для клітин [302, 303].

Ефекти LOLA щодо відновленого GSH при експериментальному цирозі були реалізовані через NO-незалежний механізм, оскільки при заблокованій активності NO-синтази його вміст залишався таким же, як і при збереженій функції фермента.

У той же час активність глутатіон S-трансферази зазнала достовірного пригнічення при застосуванні L-NAME, порівняно із лікуванням лише LOLA, що узгоджується з результатами інших дослідників, які показали взаємозв'язок між активністю даного детоксикаційного ферменту та оксиду азоту [304].

Позитивний вплив LOLA на систему мітохондріального дихання при цирозі не мало взаємозв'язку із активністю NOS, так як активність ферментів СДГ та ЦХО залишалася високою на фоні введення блокатора синтезу нітроген оксиду.

Введення L-NAME не спричинило достовірних змін у ефектах LOLA щодо впливу на активність ферментів Mn-COD і Cu,Zn-COD, але активність обох форм ферменту мала тенденцію до зниження. Активність загальної COD знизилась на 68,9 % на фоні застосування L-NAME, що свідчить про значення NO-залежного механізму в регулюванні обох форм ферменту, що узгоджується з даним літератури [305].

Таким чином, при експериментальному цирозі ми встановили залежність між системою L-аргінін-нітроген оксид та експресією цитокінів TNF- α та TGF- β , концентрацією молекул середньої маси, активністю глутатіон-S-трансферази, каталази та супероксиддисмутази.

З метою вивчення впливу LOLA на синтез поліамінів при експериментальному цирозі вивчали зміни структури, показники функціонального стану та метаболічні процеси у печінці за комбінованого введення препарату з DFMO. Про пригнічення синтезу поліамінів судили за достовірним зниженням концентрації путресцину.

Гістологічно у печінці за введення LOLA + DFMO спостерігали поширення зон фіброзування, лімфо-гістіоцитарної інфільтрації, порушення балкової організації, зростання кількості некротично змінених гепатоцитів та клітин з ознаками білкової дистрофії. Вищенаведене свідчить, що блокування синтезу поліамінів призводить до практично нівелювання позитивного впливу LOLA на структуру печінки. Вплив інгібітора метаболізму поліамінів DFMO при цирозі та корекції LOLA сприяв зростанню експресії фактора некрозу пухлин із переважанням на мембранах в просвітах синусоїдів, що також свідчить про інтенсивність токсичного ураження печінки TNF- α . Поряд із цим візуалізується значне зростання трансформуючого фактора росту TGF- β із переважанням локалізації в просвітах синусоїдів навколо портальних трактів. Власне активація TGF- β може обґрунтовувати подальше ушкодження гепатоцитів, шляхом активації печінкових зірчастих клітин і фібробластів, що призводить до інтенсифікації формування колагенових волокон, включаючи утворення фібробластів і відкладення позаклітинного матриксу [306].

Такі гістологічні зміни при експериментальному цирозі у групі LOLA + DFMO узгоджуються з результатами біохімічних досліджень щодо наростання явищ ендотоксикозу та порушення процесів детоксикації в печінці, на що вказують показники рівня МСМ в крові та активність GST печінки.

Застосування DFMO пригнітило також здатність LOLA зменшувати прояви цитолізу та холестазу. Блокування процесу синтезу поліамінів викликало виражене підвищення вмісту ЗБ і ЗХ, навіть у порівнянні з нелікованим цирозом. Одночасне застосування DFMO нівелювало ефективність LOLA щодо пригнічення активності АСТ та АЛТ, ЛФ та ГГТ. Здатність інгібіторів синтезу поліамінів активізувати явища цитолізу та посилювати ступінь ушкодження підтверджено іншими науковцями [286].

Блокування синтезу поліамінів інгібувало здатність препарату LOLA покращувати білоксинтетичну функцію за експериментального цирозу, що пояснюється їх здатністю через РНК регулювати синтез протеїнів [307].

Активация процесів ліпопероксидації при застосуванні LOLA + DFMO у порівнянні з моно введенням LOLA при експериментальному цирозі корелює з аналогічним результатами, які отримали при гепатиті і пояснює роль поліамінів у регуляції різних біологічних процесів, що протікають в клітині та обґрунтовується їх здатністю бути акцепторами вільних радикалів та виступати в ролі антиоксидантів [292].

Стан досліджуваних нами показників ферментативної (активність каталази крові та печінки, супероксиддисмутази та її видів) та неферментативної ланок антиоксидантної системи (вміст відновленого глутатіону в печінці та церулоплазміну в крові) показав, що при експериментальному цирозі блокування синтезу поліамінів практично реверсувало позитивний коригуючий вплив LOLA. Блокування синтезу поліамінів також зменшувало здатність LOLA покращувати процеси мітохондріального дихання, про що свідчили показники активності ЦХО та СДГ та узгоджується з Fujimoto S., et al. [294].

Отже, результати щодо вивчення ролі стимуляції синтезу поліамінів у дії LOLA при експериментальному гепатиті свідчить про його критичну роль в механізмі реалізації цих ефектів. Тому застосування препаратів на основі орнітину та аргініну як гепатопротекторів при цирозі може бути неефективним за умови пригнічення синтезу поліамінів, наприклад при застосуванні цитостатичних лікарських засобів.

Таким чином, проведені нами дослідження показали особливості механізму протекторної дії LOLA при токсичному гепатиті та цирозі та довели, що важливими ланками дії препарату є його здатність впливати на синтез нітроген оксиду та поліамінів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального наукового завдання, яке полягає у з'ясуванні ефективності лікарського засобу L-орнітину L-аспартату (LOLA) при гострому токсичному гепатиті та цирозі печінки та встановлення нітроген оксид та поліамін-залежних механізмів його дії.

1. Про формування гострого токсичного ураження печінки за тетрахлорметанового ураження свідчить розвиток синдромів цитолізу та холестазу (достовірно зростає активність АСТ в 4,2 та 4,0 раза, лужної фосфатази в 3,4 та 1,7 раза, ГГТ в 5,2 та 3,2 раза відповідно на 3 та 7 доби експерименту), пригнічення білок- та поліамін-синтезуючої функції органа (концентрація білка знижується на 25,1% та 20,3 %, путресцину на 21,5 % та 24,5 %, відповідно до термінів дослідження). Наростають явища ендотоксикозу з пригніченням процесів детоксикації в органі, порушується баланс системи прооксиданти-антиоксиданти, функціонування електрон-транспортної системи мітохондрій. Усе це підтверджено структурними змінами, які характеризуються порушенням структури часточки, вираженими ушкодженнями центролобулярних гепатоцитів з проявами жирової дистрофії та некрозів.

2. LOLA при гострому токсичному гепатиті сприяє відновленню структури печінки: зменшуються дистрофічно-некротичні прояви та відновлюється балкова організація гепатоцитів. Протективні властивості препарату біохімічно проявляються зниженням показників синдромів цитолізу та холестазу, підвищенням синтезу білка, сечовини та поліамінів, зменшенням явища ендотоксикозу, пригніченням процесів ліпопероксидації з одночасним відновленням стану антиоксидантої системи, нормалізацією функціонування системи оксиду азоту та мітохондріального дихання.

3. Блокада синтезу оксиду азоту, шляхом застосування L-NAME у щурів із токсичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA сповільнило відновлення гепатоцитів в ділянці портальних трактів, структури балкової організації, посилення лімфо-гістіоцитарної інфільтрації портальних трактів, що свідчить про залежність гепатопротективної дії препарату від синтезу оксиду азоту. Встановлено, що пригнічення цитолізу, холестазу та ендотоксикозу, активація мітохондріального дихання за введення LOLA відбувається через NO-залежний механізм. Щодо впливу на процеси ліпопероксидації та стан антиоксидантної системи, то ці ефекти LOLA реалізує не тільки через систему L-аргінін-NO. Встановлено залежність між рівнем продукції NO та синтезом ГПЛ, відновленого глутатіону, активності каталази. Блокування синтезу NO не впливало на здатність LOLA підтримувати високий потенціал антиоксидантного захисту при гепатиті, активність ізоформ СОД, рівень ТБК-активних продуктів.

4. Результати наших досліджень свідчать, що застосування блокатора синтезу поліамінів DFMO у щурів із токсичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA реверсує більшість ефектів препарату у попередженні розвитку патологічних синдромів, що супроводжують тетрахлорметан-індуковане ураження печінки. Зміна морфологічної будови печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичні змінами як в центролобулярних зонах, так і по всій часточці у поєднанні із запальною інфільтрацією.

5. При експериментальному тетрахлорметановому цирозі виявлено порушення структури печінки із формуванням псевдочасточок, оточених полями фіброзу у поєднанні із лімфо-гістоцитарною інфільтрацією. В гепатоцитах візуалізуються дистрофічно-некротичні зміни. Імуногістохімічне дослідження свідчить про посилення руйнації гепатоцитів та стимуляції формування колагенових волокон і відкладання позаклітинного матриксу. Циротичне ураження характеризується розвитком процесів цитолізу та холестазу, зниженням активності мітохондріальних ферментів, зменшенням

рівня NO_2^- у крові із супутнім зростанням його вмісту у печінці; втратою активності функціонування антиоксидантного захисту на тлі інтенсифікації прооксидантних процесів, що призводить до наростання проявів ендотоксикозу.

6. Препарат LOLA при цирозі сприяє покращенню морфофункціонального стану печінки, про що свідчить часткове, проте суттєве відновлення структури органа, зменшення дистрофічно-некротичних проявів гепатоцитів та ознак запалення. За введення препарату знижується активність цитолізу та холестази, зменшується експресія $\text{TNF-}\alpha$ та $\text{TGF-}\beta$, підвищується синтез білка, сечовини та поліамінів, знижуються явища ендотоксикозу, відновлюються функціонування системи мітохондріального дихання та метаболічні процеси у печінці, пригнічуються прооксидантні процеси з одночасною активізацією антиоксидантних.

7. Блокування синтезу оксиду азоту за допомогою L-NAME не реверсувало більшість протективних ефектів LOLA при експериментальному цирозі печінки. Гістологічно спостерігали поглиблення запальних процесів, що проявлялися мукоїдним набряком в ділянках сформованого склерозу портальних трактів. Встановлено, що ефекти LOLA щодо активності аланінамінотрансферази, лужної фосфатази, гамма-глутамілтрансферази, сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази, вмісту загального білірубину, сечовини, загального білка у крові та печінці, активних продуктів тіобарбітурової кислоти, відновленого глутатіону були реалізовані незалежно від активності NO-синтази. За даної експериментальної моделі ми встановили взаємозв'язок в механізмі дії LOLA між впливом на синтез нітроген оксиду та експресією цитокінів $\text{TNF-}\alpha$ та $\text{TGF-}\beta$, концентрацією молекул середньої маси, активністю глутатіон-S-трансферази, каталази та супероксиддисмутази.

8. Результати наших досліджень свідчать, що застосування блокатора синтезу поліамінів DFMO у щурів із циротичним ураженням печінки на фоні корекції LOLA реверсує протективну дію препарату щодо процесів цитолізу та

холестази, стану системи прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального дихання, ендотоксикозу. Імуногістохімічне дослідження свідчить про наростання експресії цитокінів TNF- α та TGF- β . Зміна морфологічної будови печінки за введення LOLA в комбінації з DFMO характеризується глибокими дистрофічно-некротичні змінами гепатоцитів, лімфо-гістіоцитарною та лейкоцитарною інфільтрацією колагенової строми, мукоїдним та фібриноїдним набряком полів фіброзу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Kircheis G., Lüth S. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of L-Ornithine L-Aspartate (LOLA) in Hepatic Encephalopathy. *Drugs*. 2019. Vol. 79, Suppl 1. P. 23–29. DOI: 10.1007/s40265-018-1023-2
2. L-ornithine L-aspartate for prevention and treatment of hepatic encephalopathy in people with cirrhosis / E. T. Goh et al. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018. Vol. 5, № 5. P. CD012410. DOI: 10.1002/14651858.CD012410.pub2.
3. L-ornithine L-aspartate in acute treatment of severe hepatic encephalopathy: A double-blind randomized controlled trial / A. Jain et al. *Hepatology*. 2022. Vol. 75, № 5. P. 1194–1203. DOI: 10.1002/hep.32255.
4. Anthocyanins Protect Hepatocytes against CCl₄-Induced Acute Liver Injury in Rats by Inhibiting Pro-inflammatory mediators, Polyamine Catabolism, Lipocalin-2, and Excessive Proliferation of Kupffer Cells / D. Popović et al. *Antioxidants*. 2019. Vol. 8, № 10. P. 451. DOI: 10.3390/antiox8100451
5. An Increase in Liver Polyamine Concentration Contributes to the Tryptophan-Induced Acute Stimulation of Rat Hepatic Protein Synthesis / S. Koike et al. *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 2665. DOI: 10.3390/nu12092665
6. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018. Vol. 392, № 10159. P. 1789–1858. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7
7. Burden of liver diseases in the world / S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, P. S. Kamath. *J Hepatol*. 2019. Vol. 70, № 1. P. 151–171. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.09.014
8. Вірусні гепатити 2020 : звіт / ДУ «Центр громадського здоров'я МОЗ України». Київ, 2021. 24 с.
URL: https://phc.org.ua/sites/default/files/users/user90/A4_zvit_gepatit1021_online_zamina.pdf (дата звернення: 07.10.2022).

9. Сергеева Т. А., Іванчук І. О. Гепатит С в Україні: епідеміологічна характеристика та оцінка тягаря (за результатами аналізу даних з різних джерел) / ДУ «Центр громадського здоров'я МОЗ України». Київ, 2018. 111 с. URL: <https://www.phc.org.ua/sites/default/files/uploads/files/VGC-2018.pdf> (дата звернення: 10.10.2022).

10. The changing epidemiology of liver diseases in the Asia-Pacific region / M. C. S. Wong et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019. Vol. 16, № 1. P. 57–73. DOI: 10.1038/s41575-018-0055-0

11. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019. Vol. 380, № 15. P. 1450–1462. DOI: 10.1056/NEJMra1713263

12. Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies / L. Pimpin¹ et al. *J Hepatol*. 2018. Vol. 69, № 3. P. 718–735. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.05.011

13. European association for the study of the liver. Prospects for liver disease in the EU. URL: http://www.easl.eu/medias/EASLimg/News/EASL_HEPAMAP_Full_Report.pdf (дата звернення: 09.09.2022).

14. The future burden of obesity-related diseases in the 53 WHO European Region countries and the impact of effective interventions: a modelling study / L. Webber et al. *BMJ Open*. 2014. Vol. 4, № 7. P. e004787. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-004787

15. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study / M. Ng et al. *Lancet*. 2014. Vol. 384, № 9945. P. 766–781. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8

16. TET3 as a non-invasive screening tool for the detection of fibrosis in patients with chronic liver disease / L. L. Feng et al. *Sci Rep*. 2023. Vol. 13, № 1. P. 6382. DOI: 10.1038/s41598-023-33564-7.

17. The Epidemiology of Acute Liver Failure / N. Weiler et al. *Dtsch Arztebl Int*. 2020. Vol. 117, № 4. P. 43–50. DOI: 10.3238/arztebl.2020.0043.

18. Development of a model to predict transplant-free survival of patients with acute liver failure / D. G. Koch et al. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016. Vol. 14, № 8. P. 1199–1206.e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2016.03.046
19. Arshad M. A., Murphy N., Bangash M. N. Acute liver failure. *Clin Med (Lond)*. 2020. Vol. 20, № 5. P. 505–508. DOI: 10.7861/clinmed.2020-0612
20. Population-based surveillance for acute liver failure / W. A. Bower et al. *Am J Gastroenterol*. 2007. Vol. 102, № 11. P. 2459–2463. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01388.x
21. Acute liver failure in Scotland between 1992 and 2009; incidence, aetiology and outcome / A. D. Bretherick et al. *QJM*. 2011. Vol. 104, № 11. P. 945–956. DOI: 10.1093/qjmed/hcr098
22. Acute liver failure: a curable disease by 2024? / W. Bernal et al. *J Hepatol*. 2015. Vol. 62, 1 Suppl. P. S112–120. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.016
23. Outcomes in adults with acute liver failure between 1998 and 2013: an observational cohort study / A. Reuben et al. *Ann Intern Med*. 2016. Vol. 164, № 11. P. 724–732. DOI: 10.7326/M15-2211
24. Nationwide longitudinal analysis of acute liver failure in Taiwan / C. M. Ho et al. *Medicine (Baltimore)*. 2014. Vol. 93, № 4. P. e35. DOI: 10.1097/MD.0000000000000035
25. Liver failure due to acute viral hepatitis (A-E) / P. Manka, J. Verheyen, G. Gerken, A. Canbay. *Visc Med*. 2016. Vol. 32, № 2. P. 80–85. DOI: 10.1159/000444915
26. Acute liver failure in Scotland: changes in aetiology and outcomes over time (the Scottish look-Back study) / M. C. Donnelly et al. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017. Vol. 45, № 6. P. 833–843. DOI: 10.1111/apt.13943
27. Etiologies and outcomes of acute liver failure in Germany / J. Hadem et al. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012. Vol. 10, № 6. P. 664–669.e662. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.02.016

28. The incidence, etiologies, outcomes, and predictors of mortality of acute liver failure in Thailand: a population-base study / K. Thanapirom¹ et al. *BMC Gastroenterology*. 2019. Vol. 19, № 1. P. 18. DOI: 10.1186/s12876-019-0935-y
29. Недашківський С. М. Медикаментозно зумовлені ураження печінки: принципи діагностики, патологічні зміни й підходи до лікування. *Медицина невідкладних станів*. 2019. № 2. С. 63–70. DOI: 10.22141/2224-0586.2.97.2019.161644
30. Rotundo L., Pyrsopoulos N. Liver injury induced by paracetamol and challenges associated with intentional and unintentional use. *World J Hepatol*. 2020. Vol. 12, № 4. P. 125–136. DOI: 10.4254/wjh.v12.i4.125.
31. Morabito V., Adebayo D. Fulminant hepatitis: definitions, causes and management. *Health*. 2014. Vol. 6, № 10. P. 1038–1048. DOI: 10.4236/health.2014.610130
32. Acute liver failure / W. Bernal, G. Auzinger, A. Dhawan, J. Wendon. *Lancet*. 2010. Vol. 376, № 9736. P. 190–201. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60274-7
33. Systematic review: acute liver failure - one disease, more than 40 definitions / K. A. Wlodzimirow et al. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012. Vol. 35, № 11. P. 1245–1256. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2012.05097.x
34. Lee Y. A., Wallace M. C., Friedman S. L. Pathobiology of liver fibrosis: A translational success story. *Gut*. 2015. Vol. 64, № 5. P. 830–841. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-306842
35. Tsochatzis E. A., Bosch J., Burroughs A. K. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014. Vol. 383, № 9930. P. 1749–1761. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60121-5
36. Iwakiri Y., Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Rep*. 2021. Vol. 3, № 4. P. 100316. DOI: 10.1016/j.jhepr.2021.100316
37. Quantifying the fraction of cirrhosis attributable to alcohol among chronic hepatitis C virus patients: implications for treatment cost-effectiveness / H. A. Innes et al. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2013. Vol. 57, № 2. P. 451–460. DOI: 10.1002/hep.26051

38. Efficacy of combined therapy in patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis / G. C. Lv et al. *World J Gastroenterol*. 2013. Vol. 19, № 22. P. 3481–3486. DOI: 10.3748/wjg.v19.i22.3481
39. Camaschella C. Treating iron overload. *N Engl J Med*. 2013. Vol. 368, № 24. P. 2325–2327. DOI: 10.1056/NEJMcibr1304338
40. Popov Y. Mouse model of primary biliary cirrhosis with progressive fibrosis: are we there yet? *Hepatology*. 2013. Vol. 57, № 2. P. 429–431. DOI: 10.1002/hep.25969
41. Deutsch M., Emmanuel T., Koskinas J. Autoimmune Hepatitis or Wilson's Disease, a Clinical Dilemma. *Hepat Mon*. 2013. Vol. 13, № 5. P. e7872. DOI: 10.5812/hepatmon.7872
42. Liver transplantation for patients with acute-on-chronic liver failure (ACLF) in Europe: Results of the ELITA/EF-CLIF collaborative study (ECLIS) / L. S. Belli et al. *J. Hepatol*. 2021. Vol. 75, № 3. P. 610–622. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.03.030
43. Björnsson H. K., Björnsson E. S. Drug-induced liver injury: Pathogenesis, epidemiology, clinical features, and practical management. *Eur J Intern Med*. 2022. Vol. 97. P. 26–31. DOI: 10.1016/j.ejim.2021.10.035
44. Stravitz R. T., Lee W. M. Acute liver failure. *Lancet*. 2019. Vol. 394, № 10201. P. 869-881. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)31894-X
45. Russmann S., Kullak-Ublick G. A., Grattagliano I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Curr Med Chem*. 2009. Vol. 16, № 23. P. 3041–3053. DOI: 10.2174/092986709788803097
46. Gijbels E., Vinken M. Mechanisms of drug-induced cholestasis. *Methods Mol Biol*. 2019. Vol. 1981. P. 1–14. DOI: 10.1007/978-1-4939-9420-5_1
47. Suh J. I. Drug-induced liver injury. *Yeungnam Univ J Med*. 2020. Vol. 37, № 1. P. 2–12. DOI: 10.12701/yujm.2019.00297
48. Gap junction inhibition prevents drug-induced liver toxicity and fulminant hepatic failure / S. J. Patel et al. *Nat Biotechnol*. 2012. Vol. 30, № 2. P. 179–183. DOI: 10.1038/nbt.2089

49. Chalasani N., Björnsson E. Risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Gastroenterology*. 2010. Vol. 138, № 7. P. 2246–2259. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.04.001
50. Björnsson E. S. Epidemiology and risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Semin Liver Dis*. 2014. Vol. 34, № 2. P. 115–122. DOI: 10.1055/s-0034-1375953
51. Liver transplantation for drug-induced acute liver failure / M. Biolato et al. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017. Vol. 21, № 1. P. 37–45. PMID: 28379596
52. Li H., He J., Jia W. The influence of gut microbiota on drug metabolism and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016. Vol. 12, № 1. P. 31–40. DOI: 10.1517/17425255.2016.1121234
53. Curative effects of thiacepromone against acetaminophen-induced acute hepatic failure via inhibition of proinflammatory cytokines production and infiltration of cytotoxic immune cells and Kupffer cells / Y. R. Kim et al. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013. Vol. 2013. P. 974794. DOI: 10.1155/2013/974794
54. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid / R. M. Hartmann et al. *Dig Dis Sci*. 2012. Vol. 57, № 8. P. 2038–2044. DOI: 10.1007/s10620-012-2134-3
55. Effect of dichloromethylene diphosphonate on liver regeneration following thioacetamide-induced necrosis in rats / M. Bautista et al. *World J Hepatol*. 2013. Vol. 5, № 7. P. 379–386. DOI: 10.4254/wjh.v5.i7.379
56. Russwurm M., Koesling D. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J*. 2004. Vol. 23, № 22. P. 4443–4450. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600422
57. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction / A. R. Cyr, L. V. Huckaby, S. S. Shiva, B. S. Zuckerbraun. *Crit Care Clin*. 2020. Vol. 36, № 2. P. 307–321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009
58. Nitric oxide and l-arginine metabolism in a devascularized porcine model of acute liver failure / V. Sharma et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012. Vol. 303, № 3. P. G435–G441. DOI: 10.1152/ajpgi.00268.2011

59. Bernal W., Wendon J. Acute liver failure. *N Engl J Med.* 2013. Vol. 369, № 3. P. 2525–2534. DOI: 10.1056/NEJMra1208937
60. Rama Rao K. V., Jayakumar A. R., Norenberg M. D. Brain edema in acute liver failure: mechanisms and concepts. *Metab Brain Dis.* 2014. Vol. 29, № 4. P. 927–936. DOI: 10.1007/s11011-014-9502-y
61. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy / I. Ciećko-Michalska, M. Szczepanek, A. Słowik, T. Mach. *Gastroenterol Res Pract.* 2012. Vol. 2012. P. 642108. DOI:10.1155/2012/642108
62. Montgomery J. Y., Bajaj J. S. Advances in the evaluation and management of minimal hepatic encephalopathy. *Curr Gastroenterol Rep.* 2011. Vol. 13, № 1. P. 26–33. DOI: 10.1007/s11894-010-0150-z
63. Pro-inflammatory cytokines are raised in extrahepatic portal venous obstruction, with minimal hepatic encephalopathy / A. Srivastava et al. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011. Vol. 26, № 6. P. 979–986. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06706.x
64. Dynamic susceptibility contrast-enhanced first-pass perfusion MR imaging in patients with subclinical hepatic encephalopathy / T. Li et al. *J Neuroradiol.* 2012. Vol. 39, № 5. P. 290–294. DOI: 10.1016/j.neurad.2011.09.002
65. Jaeschke H., McGill M. R., Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2012. Vol. 44, № 1. P. 88–106. DOI: 10.3109/03602532.2011.602688
66. Ramachandran A., Jaeschke H. Oxidative Stress and Acute Hepatic Injury. *Curr Opin Toxicol.* 2018. Vol. 7. P. 17–21. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.10.011.
67. Du K., Ramachandran A., Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol.* 2016. Vol. 10. P. 148–156. DOI: 10.1016/j.redox.2016.10.001
68. Editor's Highlight: Metformin Protects Against Acetaminophen Hepatotoxicity by Attenuation of Mitochondrial Oxidant Stress and Dysfunction /

K. Du et al. *Toxicol Sci.* 2016. Vol. 154, № 2. P. 214–226. DOI: 10.1093/toxsci/kfw158

69. Lysosomal iron mobilization and induction of the mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced toxicity to mouse hepatocytes / K. Kon et al. *Toxicol Sci.* 2010. Vol. 117, № 1. P. 101–108. DOI: 10.1093/toxsci/kfq175

70. Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during acetaminophen-induced hepatocellular injury: Protection by starch-desferal and minocycline / J Hu et al. *Free Radic Biol Med.* 2016. Vol. 97. P. 418–426. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.024

71. Heidari R. Brain mitochondria as potential therapeutic targets for managing hepatic encephalopathy. *Life Sci.* 2019. Vol. 218. P. 65–80. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.12.030

72. Zhou W. C., Zhang Q. B., Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014. Vol. 20, № 23. P. 7312–7324. DOI: 10.3748/wjg.v20.i23.7312.

73. Böttcher K., Pinzani M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017. Vol. 121. P. 3–8. DOI: 10.1016/j.addr.2017.05.016

74. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: Common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress / S. Sakaguchi et al. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011. Vol. 26, № 1. P. 30–46. DOI: 10.2133/dmpk.dmpk-10-rv-087

75. Cichoż-Lach H., Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 20, № 25. P. 8082–8091. DOI: 10.3748/wjg.v20.i25.8082

76. Superoxide-induced apoptosis of activated rat hepatic stellate cells / C. Thirunavukkarasu, S. Watkins, S. A. K. Harvey, C. R. Gandhi. *J Hepatol.* 2004. Vol. 41, № 4. P. 567–575. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.06.023

77. ASC/caspase-1/IL-1 β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury / N. Kamo et al. *Hepatology*. 2013. Vol. 58, № 1. P. 351–362. DOI: 10.1002/hep.26320

78. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with preascitic cirrhosis / M. Ubeda et al. *Hepatology*. 2010. Vol. 52, № 6. P. 2086–2095. DOI: 10.1002/hep.23961

79. The association between TNF- α 238A/G and 308A/G polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis: An updated PRISMA-compliant meta-analysis / X. Y. Li, C. H. Liang, V. Parkman, Z. T. Lv. *Medicine (Baltimore)*. 2018. Vol. 97, № 43. P. e12883. DOI: 10.1097/MD.00000000000012883.

80. Albillos A., Lario M., Álvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol*. 2014. Vol. 61, № 6. P. 1385–1396. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.08.010

81. Interleukin-1 α and interleukin-1 β play a central role in the pathogenesis of fulminant hepatic failure in mice / M. Sultan et al. *PLoS ONE*. 2017. Vol. 12, № 9. P. e0184084. DOI: 10.1371/journal.pone.0184084

82. Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III trial / B. Shakoory et al. *Crit Care Med*. 2016. Vol. 44, № 2. P. 275–281. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001402

83. Fabregat I., Caballero-Díaz D. Transforming Growth Factor- β -Induced Cell Plasticity in Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis. *Front Oncol*. 2018. Vol. 8. P. 357. DOI: 10.3389/fonc.2018.00357

84. IL-6 and IL-10 gene polymorphisms and cirrhosis of liver risk from a comprehensive analysis / M. Zheng et al. *BMC Endocr Disord*. 2021. Vol. 21, № 1. P. 242. DOI: 10.1186/s12902-021-00906-3

85. Manna F. A., Abdel-Wahhab K. G. Physiological potential of cytokines and liver damages. *Hepatoma Res*. 2016. Vol. 2. P. 131–143. DOI: 10.20517/2394-5079.2015.58

86. George J., Tsuchishima M., Tsutsumi M. Metabolism of N-nitrosodimethylamine, methylation of macromolecules, and development of hepatic fibrosis in rodent models. *J Mol Med (Berl)*. 2020. Vol. 98, № 9. P. 1203–1213. DOI: 10.1007/s00109-020-01950-7.

87. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *J Hepatol*. 2017. Vol. 66, № 6. P. 1300–1312. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.02.026.

88. Khanam A., Saleeb P. G., Kottilil S. Pathophysiology and Treatment Options for Hepatic Fibrosis: Can It Be Completely Cured? *Cells*. 2021. Vol. 10, № 5. P. 1097. DOI: 10.3390/cells10051097

89. Research Progress and Treatment Status of Liver Cirrhosis with Hypoproteinemia / J. Wen et al. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022. Vol. 2022. P. 2245491. DOI: 10.1155/2022/2245491

90. The change of protein malnutrition in patients with posthepatic cirrhosis / H. Shen, F. Xi, C. Xu, Z. Zhang. *J Clin Int Med*. 2006. №. 2. P. 91–92.

91. Jenne C. N., Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol*. 2013. Vol. 14, № 10. P. 996–1006. DOI: 10.1038/ni.2691

92. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens / K. Y. Helmy et al. *Cell*. 2006. Vol. 124, № 5. P. 915–927. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.039

93. Ultrasound Pressure Estimation for Diagnosing Portal Hypertension in Patients Undergoing Dialysis for Chronic Kidney Disease / P. Machado et al. *J Ultrasound Med*. 2022. Vol. 4, № 9. P. 2181–2189. DOI: 10.1002/jum.15897.

94. Kim M. Y., Baik S. K., Lee S. S. Hemodynamic alterations in cirrhosis and portal hypertension. *Korean J Hepatol*. 2010. Vol. 16, № 4. P. 347–352. DOI: 10.3350/kjhep.2010.16.4.347

95. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015. Vol. 39, Suppl 1. P. S51–S59. DOI: 10.1016/j.clinre.2015.05.005.

96. Mallat A., Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013. Vol. 305, № 8. P. C789–C799. DOI: 10.1152/ajpcell.00230.2013
97. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases / S. Li et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, № 11. P. 26087–26124. DOI: 10.3390/ijms161125942
98. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin / H. E. Palma et al. *Mol Cell Biochem*. 2014. Vol. 386, № 1-2. P. 199–210. DOI: 10.1007/s11010-013-1858-5
99. Systemic oxidative stress is implicated in the pathogenesis of brain edema in rats with chronic liver failure / C. R. Bosoi et al. *Free Radic Biol Med*. 2012. Vol. 52, № 7. P. 1228–1235. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.006
100. Oxidative stress in chronic hepatitis C patients / J. Zhao et al. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2013. Vol. 27, № 1. P. 47–49. PMID: 23855130
101. Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases / S. Li et al. *Oxid Med Cell Longev*. 2016. Vol. 2016. P. 4234061. DOI: 10.1155/2016/4234061
102. Interrelation of inflammation and oxidative stress in liver cirrhosis / M. M. Pomacu et al. *Exp Ther Med*. 2021. Vol. 21, № 6. P. 602. DOI: 10.3892/etm.2021.10034
103. Seen S. Chronic liver disease and oxidative stress – a narrative review. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021. Vol. 15, № 9. P. 1021–1035. DOI: 10.1080/17474124.2021.1949289
104. Степанов Ю. М., Бреславец Ю. С. Клінічний досвід застосування біологічного гепатопротектору прогепар у лікуванні хворих із гепатобіліарною патологією (огляд). *Гастроентерологія*. 2015. № 3. С. 133–141
105. Моніторинг асортиментної структури та динаміки цінових показників гепатопротекторів на сучасному фармацевтичному ринку України / І. О. Пухальська, Адаба Мухамед, О. П. Гудзенко, О. Л. Дроздов. *Актуальні*

питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2020. Т. 13, № 3. С. 407–414. DOI: 10.14739/2409-2932.2020.3.216227

106. Мультипотентный гепатопротектор ларнамин в клинической практике / Н. Б. Губергриц, А. Е. Клочков, П. Г. Фоменко, Н. В. Беляева. *Гастроентерология*. 2016. № 1. С. 39–47

107. Опарин А. Г., Лаврова Н. В., Благовещенская А. В. Гепатопротекторы: тактика клинического применения. *Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини*. 2016. № 1. С. 75–81.

108. Беловол А. Н., Князькова И. И. Клиническая фармакология гепатопротекторов. *Ліки України*. 2019. № 5/6. С. 18–25.

109. Гепатопротектори в лікуванні захворювань печінки: клініко/біохімічні механізми дії / Н. В. Харченко та ін. *Здоров'я України. Тематичний номер. Гастроентерологія, Гепатологія, Колопроктологія*. 2013. Березень. С. 28–29.

110. Фейса С. В., Кочмарь О. Ю. Гепатопротектори у лікуванні неалкогольної жирової хвороби печінки. *Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина»*. 2017. Вип. 1. С. 72–74.

111. Hepatotoxicity and Hepatoprotective agents: A Mini review / M. Maqbool et al. *PharmaTutor*. 2019. Vol. 7, № 9. P. 34–40. DOI: 10.29161/PT.v7.i9.2019.34

112. Daoudi N. E., Bnouham M. Hepatoprotective Essential Oils: A Review. *J Pharmacopuncture*. 2020. Vol. 23, № 3. P. 124–141. DOI: 10.3831/KPI.2020.23.3.124

113. Potential hepatoprotective effects of flavonoids contained in propolis from South Sulawesi against chemotherapy agents / M. Sahlan et al. *Saudi J Biol Sci*. 2021. Vol. 28, № 10. P. 5461–5468. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.08.022

114. Role of silymarin as antioxidant in clinical management of chronic liver diseases: a narrative review / A. Aghemo et al. *Ann Med*. 2022. Vol. 54, № 1. P. 1548–1560. DOI: 10.1080/07853890.2022.2069854

115. Alipour M. R., Karimi-Sales E. Molecular mechanisms of protective roles of isoflavones against chemicals-induced liver injuries. *Chem Biol Interact.* 2020. Vol. 329. P. 109213. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109213

116. Ghorbani A., Hooshmand S. Protective Effects of *Morus nigra* and Its Phytochemicals against Hepatotoxicity: A Review of Preclinical Studies. *Pharmacology.* 2021. Vol. 106, № 5-6. P. 233–243. DOI: 10.1159/000515032

117. Pharmacotherapies for Drug-Induced Liver Injury: A Current Literature Review / M. Li et al. *Front Pharmacol.* 2022. Vol. 12. P. 806249. DOI: 10.3389/fphar.2021.806249

118. Порівняльна характеристика гепатопротекторів, застосованих для лікування неалкогольного стеатогепатиту, асоційованого з герпесвірусною інфекцією, у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС / О. В. Гасанова та ін. *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології.* 2017. Вип. 22. С. 339–352.

119. Ткач С. М. L-орнитин-L-аспартат как универсальный гепатопротектор - детоксикант с плеiotропными эффектами. *Здоровья України. Тематичний номер. Гастроентерологія, Гепатологія, Колопроктологія.* 2013. № 3. Вересень. С. 60–61.

120. Осьодло Г. В., Бойчак М. П., Федорова О. О. Рациональний вибір гепатопротекторів при медикаментозно-індукованих ураженнях печінки. *Гастроентерологія.* 2022. Т. 56, № 3. С. 179–189. DOI: 10.22141/2308-2097.56.3.2022.507

121. Butterworth R. F., Gruengreiff K. l-ornithine l-aspartate (LOLA) for the treatment of hepatic encephalopathy in cirrhosis: evidence for novel hepatoprotective mechanisms. *J Liver Clin Res.* 2018. Vol. 5, № 1. P. 1044. URL: <https://www.jsimedcentral.com/journal-article-pdf/Journal-of-Liver-and-Clinical-Research--/liver-5-1044.pdf> (дата звернення: 15.10.2022).

122. Sikorska H., Cianciara J., Wiercińska-Drapało A. Fizjologiczne funkcje L-ornityny i L-asparaginianu oraz celowość podawania asparaginianu ornityny w stanach względnego niedoboru [Physiological functions of L-ornithine and L-aspartate in the body and the efficacy of administration of L-ornithine-L-aspartate in

conditions of relative deficiency]. *Pol Merkur Lekarski*. 2010. Vol. 28, № 168. P. 490–495. PMID: 20642112

123. Clinical efficacy of L-ornithine-L-aspartate in the management of hepatic encephalopathy / G. Kircheis, M. Wettstein, S. vom Dahl, D. Häussinger. *Metab Brain Dis*. 2002. Vol. 17, № 4. P. 453–462. DOI: 10.1023/a:1021934607762

124. Knepper M. A., Packer R., Good D. W. Ammonium transport in the kidney. *Physiol Rev*. 1989. Vol. 69, № 1. P. 179–249. DOI: 10.1152/physrev.1989.69.1.179

125. Blanco Vela C. I., Poo Ramirez J. L. Efficacy of oral L-ornithine L-aspartate in cirrhotic patients with hyperammonemic hepatic encephalopathy. *Ann. Hepatol*. 2011. Vol. 10, Suppl. 2. P. S55–S59. PMID: 22228883

126. Regulation of urea synthesis: changes in the concentration of ornithine in the liver corresponding to changes in urea synthesis / T. Saheki, M. Hosoya, S. Fujinami, T. Katsunuma. *Adv Exp Med Biol*. 1982. Vol. 153. P. 255–263. DOI: 10.1007/978-1-4757-6903-6_32

127. Effect of L-ornithine L-aspartate against thioacetamide-induced hepatic damage in rats / A. K. Najmi et al. *Ind J Pharmacol*. 2010. Vol. 42, № 6. P. 384–387. DOI: 10.4103/0253-7613.71926

128. Похилько С. Ю. Застосування L-орнітин-L-аспартату (Гепатокс) у клінічній практиці. *Практикуючий лікар*. 2018. Т. 7, № 3. С. 41–43. URL: https://nikopharm.ua/wpcontent/uploads/2018/11/Reprint_GEPATOKS.pdf (дата звернення: 12.10.2022).

129. Вплив L-орнітину-L-аспартату на деякі показники функції печінки в пацієнтів після резекції печінки / І. І. Лісний та ін. *Медицина неотложных состояний*. 2018. № 2. С. 47–52. DOI: 10.22141/2224-0586.2.89.2018.126602

130. Canbay A., Sowa J. P. L-Ornithine L-Aspartate (LOLA) as a Novel Approach for Therapy of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Drugs*. 2019. Vol. 79, Suppl 1. P. 39–44. DOI: 10.1007/s40265-018-1020-5

131. Гонський Я. І. Біохімія людини : підручник. 3-е вид., випр. і доп. Тернопіль : ТДМУ «Укрмедкнига», 2020. 732 с.

132. Impact of L-ornithine L-aspartate on non-alcoholic steatohepatitis-associated hyperammonemia and muscle alterations / C. Pichon et al. *Front Nutr.* 2022. Vol. 9. P. 1051157. DOI: 10.3389/fnut.2022.1051157

133. Efficacy of L-ornithine-L-aspartate as an adjuvant therapy in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy / S. Abid et al. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2011. Vol. 21. P. 666-671.

134. Nitrogen metabolism in normal and cirrhotic liver / D. Häussinger et al. *Adv Exp Med Biol.* 1990. Vol. 272. P. 47–64. DOI: 10.1007/978-1-4684-5826-8_3

135. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018. Vol. 115, № 23. P. 5839–5848. DOI: 10.1073/pnas.1804932115

136. Никонов В. В., Нудьга А. Н., Ковалева Е. А. Эффективность L-орнитина-L-аспартата в комплексном лечении печеночной энцефалопатии. *Медицина неотложных состояний.* 2011. № 6. С. 65–69.

137. Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study / P. Jepsen et al. *Hepatology (Baltim Md.).* 2010. Vol. 51, № 5. P. 1675–1682. DOI: 10.1002/hep.23500

138. Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS / S. W. Olde Damink et al. *Hepatology.* 2002. Vol. 36, № 5. P. 1163–1171. DOI: 10.1053/jhep.2002.36497

139. A morphological method for ammonia detection in liver / V. Gutiérrez-de-Juan et al. *PLoS One.* 2017. Vol. 12, № 3. P. e0173914. DOI: 10.1371/journal.pone.0173914

140. Hepatic glutamine metabolism / M. Watford et al. *Nutrition.* 2002. Vol. 18, № 4. P. 301–303. DOI: 10.1016/s0899-9007(02)00739-6

141. Glutamine and Intestinal Physiology and Pathology / F. Blachier et al. / *Glutamine: Biochemistry, Physiology, and Clinical Applications* / ed. by D. Meynial-Denis. Boca Raton : CRC Press, 2017. P. 137–148.

142. Glutamine synthetase in muscle is required for glutamine production during fasting and extrahepatic ammonia detoxification / Y. He et al. *J Biol Chem*. 2010. Vol. 285, № 13. P. 9516–9524. DOI: 10.1074/jbc.M109.092429

143. Ammonia: a novel target for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis / K. L. Thomsen et al. *Med Hypotheses*. 2018. Vol. 113. P. 91–97. DOI: 10.1016/j.mehy.2018.02.010

144. Alimirah M., Sadiq O., Gordon S. C. Novel Therapies in Hepatic Encephalopathy. *Clin Liver Dis*. 2020. Vol. 24, № 2. P. 303–315. DOI: 10.1016/j.cld.2020.01.009

145. Butterworth R. F., McPhail M. J. W. L-Ornithine L-Aspartate (LOLA) for Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Results of Randomized Controlled Trials and *Meta-Analyses*. *Drugs*. 2019. Vol. 79, № 1. P. 31–37. DOI: 10.1007/s40265-018-1024-1

146. L-Ornithine L-aspartate versus placebo in the treatment of hepatic encephalopathy: a meta-analysis of randomised placebo-controlled trials using individual data / A. M. Delcker, R. Jalan, M. Schumacher, G. Comes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2000. Vol. 32, № 4, Pt. 2. P. 310A.

147. L-Ornithine L-aspartate in the management of hepatic encephalopathy: a meta-analysis / Q. Jiang, X. H. Jiang, M. H. Zheng, Y. P. Chen. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009. Vol. 24, № 1. P. 9–14. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05582.x

148. L-Ornithine L-aspartate for hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a metaanalysis of randomized controlled trials / M. Bai et al. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013. Vol. 28, № 5. P. 783–792. DOI: 10.1111/jgh.12142

149. Sidhu S. S. L-Ornithine L-Aspartate is Effective and Safe for the Treatment of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *J Clin Exp Hepatol*. 2018. Vol. 8, № 3. P. 219–221. DOI: 10.1016/j.jceh.2018.08.007

150. L-ornithine-L-aspartate in experimental portal-systemic encephalopathy: therapeutic efficacy and mechanism of action / C. Rose et al. *Metab Brain Dis*. 1998. Vol. 13, № 2. P. 147–157. DOI: 10.1023/a:1020613314572

151. Сова В. А. Алкогольна хвороба печінки: фокус на L-орнітин-L-аспаратат. *Терапевтика*. 2021. Т. 2, № 2. С. 30–34. DOI: 10.31793/2709-7404.2021.2-2.30

152. Butterworth R. F., Canbay A. Hepatoprotection by l-ornithine l-aspartate in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Basel Switz*. 2019. Vol. 37, № 1. P. 1–6. DOI: 10.1159/000491429

153. Oral Intake of L-Ornithine-L-Aspartate Is Associated with Distinct Microbiome and Metabolome Changes in Cirrhosis / A. Horvath et al. *Nutrients*. 2022. Vol. 14, № 4. P. 748. DOI: 10.3390/nu14040748

154. Efficacy of L-ornithine L-aspartate in acute liver failure: a double-blind, randomized, placebocontrolled study / S. K. Acharya et al. *Gastroenterology*. 2009. Vol. 136, № 7. P. 2159–2168. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.050

155. Oral l-ornithine-l-aspartate in minimal hepatic encephalopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / M. R. Alvares-da-Silva et al. *Hepatol Res*. 2014. Vol. 44, № 9. P. 956–963. DOI: 10.1111/hepr.12235

156. The brain-muscle axis in minimal hepatic encephalopathy (MHE): a placebo-controlled, longitudinal double-blind trial with L-Ornithine l-Aspartate (LOLA) – preliminary results / Y. Pasha et al. *J Clin Exp Hepatol*. 2017. Vol. 7, № 1. P. S5–S6. DOI: 10.1016/j.jceh.2017.01.009

157. L-ornithine-L-aspartate lowers plasma and cerebrospinal fluid ammonia and prevents brain edema in rats with acute liver failure / C. Rose et al. *Hepatology*. 1999. Vol. 30, № 3. P. 636–640. DOI: 10.1002/hep.510300311

158. Жигунова А. К. Взаимосвязь гепатопротекции и детоксикации в терапии при функциональных нарушениях работы печени. *Український медичний часопис*. 2013. № 4. С. 85–94.

159. Tejero J., Shiva S., Gladwin M. T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev*. 2019. Vol. 99, № 1. P. 311–379. DOI: 10.1152/physrev.00036.2017

160. Nitric oxide's physiologic effects and potential as a therapeutic agent against COVID-19 / F. L. M. Ricciardolo, F. Bertolini, V. Carriero, M. Högman. *J Breath Res.* 2020. Vol. 15, № 1. P. 014001 DOI: 10.1088/1752-7163/abc302

161. Продукція оксиду азоту в печінці за умов впливу ацетату свинцю в експерименті / О. Л. Апихітіна та ін. *Современные проблемы в токсикологии.* 2007. № 2. С. 22–26. URL: http://medved.kiev.ua/web_journals/arhiv/toxicology/2007/2_2007/str22.pdf (дата звернення: 15.10.2022).

162. An Overview of NO Signaling Pathways in Aging / A. M. Pourbagher-Shahri et al. *Molecules.* 2021. Vol. 26, № 15. P. 4533. DOI: 10.3390/molecules26154533

163. Олещук О. М. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на біохімічні показники функціонального стану печінки здорових щурів. *Фізіологічний журнал.* 2014. № 2. С. 58–62. DOI:10.15407/fz60.02.057

164. Бабак О. Я., Ярмыш Н. В., Панченко Г. Ю. Механізми гепатопротекторного и токсического влияния азота оксида. *Сучасна гастроентерологія.* 2006. № 5. С. 76–84.

165. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver / L. McNaughton et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. Vol. 99, № 26. P. 17161–17166. DOI: 10.1073/pnas.0134112100

166. Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice / T. M. Leung et al. *Histol Histopathol.* 2011. Vol. 26, № 2. P. 201–211. DOI: 10.14670/HH-26.201

167. Олещук О. М. Стан системи оксиду азоту при експериментальному цирозі печінки. *Вісник проблем біології та медицини.* 2014. Вип. 3, Т. 2(111). С. 198–202.

168. Ghellam M., Koca İ. Nitrate in All Respects: Metabolic Pathways, Sources, and Human Health. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi.* 2019. Vol. 3, № 2. P. 120–130.

169. Hepatoselective nitric oxide (NO) donors, V-PYRRO/NO and V-PROLI/NO, in nonalcoholic fatty liver disease: a comparison of antisteatotic effects with the biotransformation and pharmacokinetics / K. Kus et al. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2015. Vol. 43, № 7. P. 1028–1036. DOI: 10.1124/dmd.115.063388

170. Господарський І. Я., Волинець К. В., Грушко В. В. Можливості і проблеми застосування гепатопротекторів у хворих на хронічний гепатит с при супутньому автоімунному синдромі. *Гастроентерологія*. 2014. № 4. С. 43–47.

171. The Role of Nitric Oxide in the Modulation of Hepatic Microcirculation and Tissue Oxygenation in an Experimental Model of Hepatic Steatosis / S. Ijaz, W. Yang, M. C. Winslet, A. M. Seifalian. *Microvascular Research*. 2005. Vol. 70, № 3. P. 129–136. DOI: 10.1016/j.mvr.2005.08.001

172. Effects of ornithine aspartate on plasma ammonia and plasma amino acids in patients with cirrhosis / U. Staedt et al. *J Hepatology*. 1993. Vol. 19, № 3. P. 424–430. DOI: 10.1016/s0168-8278(05)80553-7

173. Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat / C. Peralta et al. *Transplantation*. 2001. Vol. 71, № 4. P. 529–536. DOI: 10.1097/00007890-200102270-00008

174. Shah V., Kamath P. S. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transplantation*. 2003. Vol. 9, № 1. P. 1–11. DOI: 10.1053/jlts.2003.36244

175. Michael A. J. Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *J Biol Chem*. 2016. Vol. 291, № 29. P. 14896–14903. DOI: 10.1074/jbc.R116.734780

176. L-Ornithine L-Aspartate Restores Mitochondrial Function and Modulates Intracellular Calcium Homeostasis in Parkinson's Disease Models / M. J. Sisalli et al. *Cells*. 2022. Vol. 11, № 18. P. 2909. DOI: 10.3390/cells11182909

177. Прилуцький М. П., Стародуб М. Ф. Визначення концентрації поліамінів сперміну, спермідину та путресцину за допомогою імунобіосенсора на основі ППР у модельних розчинах. *Наукові записки НаУКМА. Природничі науки*. 2017. Т. 197. С. 27–33.

178. Polyamines protect nucleic acids against depurination / Y. Terui et al. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2018. Vol. 99. P. 147–153. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.04.008
179. Polyamine biomarkers as indicators of human disease / M. Amin et al. *Biomarkers.* 2021. Vol. 26, № 2. P. 77–94. DOI: 10.1080/1354750X.2021.1875506
180. Inhibition of polyamine synthesis and uptake reduces tumor progression and prolongs survival in mouse models of neuroblastoma / L. D. Gamble et al. *Sci Transl Med.* 2019. Vol. 11, № 477. P. eaau1099. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau1099
181. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma / L. D. Gamble et al. *Front Oncol.* 2012. Vol. 2. P. 162. DOI: 10.3389/fonc.2012.00162
182. Casero R. A. Jr, Murray Stewart T., Pegg A. E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2018. Vol. 18, № 11. P. 681–695. DOI: 10.1038/s41568-018-0050-3
183. Dual targeting of polyamine synthesis and uptake in diffuse intrinsic pontine gliomas / A. Khan et al. *Nat Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 971. DOI: 10.1038/s41467-021-20896-z
184. Arginine, ornithine and citrulline supplementation in rainbow trout: Free amino acid dynamics and gene expression responses to bacterial infection / T. C. Clark et al. *Fish Shellfish Immunol.* 2020. Vol. 98. P. 374–390. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.01.026
185. Підсилення нораргініном протипухлинної дії інгібіторів ферментів синтезу поліамінів *in vivo* / С. П. Залеток та ін. *Онкологія.* 2017. Т. 19, № 1. С. 17–24.
186. Поліаміни крові та сечі як нові діагностичні маркери раку передміхурової залози / С. П. Залеток та ін. *Онкологія.* 2019. Т. 21, № 3. С. 219–223. DOI: 10.32471/oncology.2663-7928.t-21-3-2019-g.7755
187. Особливості метаболізму поліамінів у трансформованих клітинах крові хворих з різними формами лейкемії / С. П. Залеток та ін. *Онкологія.* 2021. Т. 23, № 4. С. 177–183. DOI: 10.32471/oncology.2663-7928.t-23-4-2021-g.10067

188. The old and new biochemistry of polyamines / D-H. Bae, D. J. R. Lane, P. J. Jansson, D. R. Richardson. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2018. Vol. 1862, № 9. P. 2053–2068. DOI: 10.1016/j.bbagen.2018.06.004
189. Polyamines and related signaling pathways in cancer / J. Li, Y. Meng, X. Wu, Y. Sun. *Cancer Cell Intl*. 2020. Vol. 20, № 1. P. 539–555. DOI: 10.1186/s12935-020-01545-9
190. Kahana C. Protein degradation, the main hub in the regulation of cellular polyamines. *Biochem J*. 2016. Vol. 473, № 24. P. 4551–4558. DOI: 10.1042/BCJ20160519C
191. Structural basis of antizyme-mediated regulation of polyamine homeostasis / H. Y. Wu et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. Vol. 112, № 36. P. 11229–11234. DOI: 10.1073/pnas.1508187112
192. Estrogen cholestasis induces gut and liver injury in rats involving in activating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways / D. Xiang et al. *Life Sci*. 2021. Vol. 276. P. 119367. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119367.
193. Molecular Pathogenesis of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy / J. Xiao et al. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2021. Vol. 2021. P. 6679322. DOI: 10.1155/2021/6679322
194. The Relationship between Estrogen and Nitric Oxide in the Prevention of Cardiac and Vascular Anomalies in the Developing Zebrafish (*Danio Rerio*) / B. G. Sykes et al. *Brain Sci*. 2016. Vol. 6, № 4. P. 51. DOI: 10.3390/brainsci6040051.
195. Thomas T., Thomas T. J. Estradiol control of ornithine decarboxylase mRNA, enzyme activity, and polyamine levels in MCF-7 breast cancer cells: therapeutic implications. *Breast Cancer Res Treat*. 1994. Vol. 29, № 2. P. 189–201. DOI: 10.1007/BF00665680
196. Janakat S., Al-Merie H. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2002. Vol. 48, № 1. P. 41–44. DOI: 10.1016/S1056-8719(03)00019-4

197. Страчень С. Б. Морфологічні зміни печінки під час експериментального пошуку гепатопротекторних лікарських препаратів. *Одеський медичний журнал*. 2000. № 2. С. 26–28.

198. Systemic histopathology of rats with CCl₄-induced hepatic cirrhosis / K. Doi, S. Kurabe, N. Shimazu, M. Inagaki. *Lab Anim*. 1991. Vol. 25, № 1. P. 21–25. DOI: 10.1258/002367791780808121

199. Tumorigenesis and polyamines: α -difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cell in vitro / M. Takigawa et al. *Cancer Res*. 2014. Vol. 50, № 13. P. 4131–4138. PMID: 1693880

200. Verma A. K. Inhibition of tumor promotion by dl- α -difluoromethylornithine, specific irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Basic Life Sci*. 1990. Vol. 52. P. 195–204. DOI: 10.1007/978-1-4615-9561-8_16.

201. Kerwin J. F., Lancaster J. R., Feldman P. L. Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. *J Med Chem*. 1995. Vol. 38, № 22. P. 4343–4362. DOI: 10.1021/jm00022a001

202. Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by NG-L-nitroarginine. / E. S. Furfine, M. F. Harmon, J. E. Paith, E. P. Garvey. *Biochemistry*. 1993. Vol. 32, № 33. P. 8512–8517. DOI: 10.1021/bi00084a017

203. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / за ред. В. В. Влізла. Львів : Сполом, 2012. 764 с.

204. Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. *Лабораторное дело*. 1983. № 3. С. 33–35.

205. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*. 1971. Vol. 44, № 1. P. 276–287. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90370-8

206. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк и др. *Лабораторное дело*. 1988. № 1. С. 16–19.

207. Aebi H. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis* / ed. by H. U. Bergmeyer. Weinheim, New York : Verlag Chemie, Academic Press Inc., 1974. P. 673–680. DOI: 10.1016/b978-0-12-091302-2.50032-3

208. Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. Минск : Беларусь, 1982. 311 с.

209. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. № 82. P. 70–77.

210. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re et al. *Free. Radic. Biol. Med.* 1999. Vol. 26, № 9-10. P. 1231–1237. DOI: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3

211. Орлова Е. А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности *Український журнал екстремальної медицини ім. Г.О. Можаяєва*. 2002. Т. 3, № 1. С. 79–82

212. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease / A. Plaitakis et al. *Biology (Basel)*. 2017. Vol. 6, № 1. P. 11. DOI: 10.3390/biology6010011.

213. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids / I. C. Green et al. *Anal. biochem.* 1982. Vol. 126, № 1. P. 131–138. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-x

214. Protein measurement with folin phenol reagent / O. H. Lowry, H. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. *J Biol Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.

215. Сяткин С. П., Березов Т. Т. Активность орнитиндекарбоксилазы в злокачественных опухолях. *Вопросы медицинской химии*. 1980. Т. 26, № 1. С. 121–124.

216. McIntire F. C., Clements L. M., Sproull M. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene as Quantitative Reagent for Primary and Secondary Amines. *Analytical Chemistry*. 1953. Vol. 25, № 11. P. 1757–1758. DOI: 10.1021/ac60083a050

217. Камышников В. С. Справочник по клинико–биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва : МЕДпресс–информ, 2004. 920 с.

218. Ещенко Н. Д., Вольский Г. Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. *Методы биохимических исследований: липидный и энергетический обмен* : учебное пособие / под ред. М. И. Прохорова. Ленинград : Изд. Ленинградского университета, 1982. С. 207–210.

219. Кривченкова Р. С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий. *Современные методы в биохимии: методы выделения, определения и характеристики субклеточных структур и химических компонентов клеток и жидкостей организма* / ред. В. Н. Орехович. Москва : Медицина, 1968. С. 47–49.

220. Среднемолекулярные пептиды спинномозговой жидкости при гнойных менингитах / В. В. Оськина и др. *Лабораторное дело*. 1987. № 2. С. 23–25.

221. Роль среднемолекулярных пептидов крови в развитии кардиодепрессии при термических ожогах / Р. И. Лифшиц и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1986. Т. 101, № 3. С. 280–282.

222. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974. Vol. 249, № 22. P. 7130–7139. PMID: 4436300

223. Методики морфологічних досліджень / М. М. Багрій, В. А. Діброва, О. Г. Попадинець, М. І. Грищук; за ред. М. М. Багрія, В. А. Діброви. Вінниця : Нова книга, 2016. 328 с.

224. Experimental models for hepatic encephalopathy / D. Díaz-Gómez et al. *Rev Esp Enferm Dig*. 2011. Vol. 103, № 10. P. 536–541. DOI: 10.4321/s1130-01082011001000006

225. Acquired liver injury in the intensive care unit / T. Lescot, C. Karvellas, M. Beaussier, S. Magder. *Anesthesiology*. 2012. Vol. 117, № 4. P. 898–904. DOI: 10.1097/ALN.0b013e318266c6df

226. Rothuizen J. Important Clinical Syndromes Associated with Liver Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2009. Vol. 39, № 3. P. 419–437. DOI: 10.1016/j.cvsm.2009.02.007

227. Effect of Long-Term Exposure to Low or Moderate Lead Concentrations on Growth, Lipid Profile and Liver Function in Albino Rats / L. Allouche, M. Hamadouche, A Touabti, S. Khennouf. *Adv Biol Res*. 2011. Vol. 5, № 6. P. 339–347.

228. L-ornithine phenylacetate attenuates increased arterial and extracellular brain ammonia and prevents intracranial hypertension in pigs with acute liver failure / L. M. Ytrebø et al. *Hepatology*. 2009. Vol. 50, № 1. P. 165–174. DOI: 10.1002/hep.22917

229. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves / D. Prochazkova, R. K. Sairam, G. C. Srivastava, D. V. Singh. *Plant Science*. 2001. Vol. 161, № 4. P. 765–771. DOI: 10.1016/S0168-9452(01)00462-9

230. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines in acute hepatitis B / M. Koulentaki et al. *Eur J Intern Med*. 2004. Vol. 15, № 1. P. 35–38. DOI: 10.1016/j.ejim.2003.11.004. PMID: 15066646.

231. Succinate dehydrogenase inhibitor dimethyl malonate alleviates LPS/d-galactosa- mine-induced acute hepatic damage in mice / Y. Yang et al. *Innate Immunity*. 2019. Vol. 25, № 8. P. 522–529. DOI: 10.1177/1753425919873042

232. A new enteral diet, MHN-02, which contains abundant antioxidants and whey peptide, protects against carbon tetrachloride-induced hepatitis / T. Takayanagi et al. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2011. Vol. 35, № 4. P. 516–522. DOI: 10.1177/0148607110381599

233. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases / A. Nandi, L. Yan, C. Jana, N. Das. *Oxid Med Cell Longev*. 2019. Vol. 2019. P. 9613090. DOI: 10.1155/2019/9613090

234. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress / H. Raza, M. A. Robin, J. K. Fang, N. G. Avadhani. *Biochem J.* 2002. Vol. 366, Pt. 1. P. 45–55. DOI: 10.1042/BJ20020533

235. Ещенко Н. Д., Вольский Г. Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы. *Методы биохимических исследований*. Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. С. 207–210.

236. Егорихина М. Н., Левин Г. Я. Роль среднемолекулярных пептидов в агрегации клеток крови в острые периоды ожоговой болезни. *Современные технологии медицине*. 2011. № 1. С. 126–130. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-srednemolekulyarnyh-peptidov-v-agregatsii-kletok-krovi-v-ostrye-periody-ozhogovoy-bolezni> (дата обращения: 02.10.2023).

237. Аналіз динаміки активності каталази та супероксиддисмутази на тлі змодельованого антифосфоліпідного синдрому при різних способах його корекції / В. І. Савицький та ін. *Вісник морської медицини*. 2021. № 4(93). С. 112–116. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.5837842>

238. Yao X., Rarey K. E. Detection and regulation of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in rat cochlear tissues. *Hear Res.* 1996. Vol. 96, № 1–2. P. 199–203. DOI: 10.1016/0378-5955(96)00050-0

239. Young I. S. Measurement of total antioxidant capacity. *J Clin Pathol.* 2001. Vol. 54, № 5. P. 339.

240. Грабовський С. С. Ритми синтезу білків під впливом поліамінів. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького*. 2010. Т. 12, № 3. С. 41–50. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2010_12_3%282%29__9 (дата звернення: 09.10.2022).

241. Hepatoprotective effects of L-ornithine-L-aspartate in toxic liver injury / O. M. Oleshchuk, V. A. Datsko, H. Ya. Loi, T. V. Datsko, A. Ye. Mudra, S. L. Malanchuk, Ya. I. Ivankiv, L. Ya. Fedoniuk, N. S. Badiuk. *Farmacology*

OnLine. 2021. Vol. 3. P. 146–155.

URL: https://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2021/vol3/PhOL_2021_3_A018_Oleshchuk.pdf

242. Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, А. З. Ничик, Я. І. Іванків, В. П. Пида, А. В. Чорномидз. *Медична та клінічна хімія.* 2022. Т. 24, № 1. С. 32–38. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2022.i1.12683

243. Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, К. А. Посохова, І. П. Мосейчук, А. З. Ничик. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2022. Т. 16, № 1. С. 36–44. DOI: <https://doi.org/10.33250/16.01.0366>.

244. Nitric oxide-mediated effects of L-ornithine-L-aspartate in acute toxic liver injury / V. Datsko, H. Loi, T. Datsko, A. Mudra, A. Mykolenko, T. Golovata, M. Furdela, Y. Orel, I. Smachylo, A. Burak, M. Klantsa, O. Oleshchuk. *Pharmacia.* 2022. Т. 69, № 2. С. 527–534. DOI: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e83067>

245. Дацко В. А., Олещук О. М., Дацко Т. В. Стан печінки за введення L-орнітину L-аспартату при токсичному гепатиті. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф., присв. Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології ТДМІ 110-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О., Галицькі читання II, 29–30 жовтня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 37–38.

246. Олещук О. М., Дацко В. А., Лой Г. Я. Вплив L-орнітин L-аспартату на маркери холестазу при гострому гепатиті. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIV наук.-практ. конф., 11 черв. 2021 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2021. С. 168–169.

247. Дацко В. А., Лой Г. Я. Імуногістохімічне дослідження печінки при токсичному ураженні CCl₄ та при корекції L-орнітину L-аспартатом у

комбінації з блокатором синтезу оксиду азоту. *Матеріали XXVI Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квіт. 2022 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 131.

248. Experimental cirrhosis liver morphology and function / V. A. Datsko, L. Ya. Fedoniuk, Y. I. Ivankiv, K. I. Kurylo, A. S. Volska, S. L. Malanchuk, O. M. Oleshchuk. *Wiadomości Lekarskie*. 2020. Vol. LXXIII, № 5. P. 947–952. DOI: 10.36740/WLek202005120

249. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Т. В. Дацко, Т. К. Головата. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2021. № 2. С. 54–61. DOI: 10.11603/1811-2471.2021.v.i2.12203

250. Дацко В. А., Олещук О. М. Вплив L-орнітину L-аспартату на вміст TNF- α та TGF- β у печінці при експериментальному цирозі на фоні блокади синтезу оксиду азоту та поліамінів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2022. № 3. С. 42–48. DOI: <https://doi.org/10.11603/1811-2471.2022.v.i3.13286>

251. Ефективність застосування L-орнітину L-аспартату при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, Т. В. Дацко, М. А. Орел. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 черв. 2020 р. Тернопіль : ТНМУ «Укрмедкнига», 2020. С. 68–69.

252. L-орнітину -L-аспартат при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, А. Є. Мудра, Т. В. Дацко, Я. І. Іванків. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль : ТНМУ «Укрмедкнига», 2020. С. 295–296.

253. Datsko V., Darmorys I., Havinska A. L-ornitine L-aspartate and L-NAME effectiveness in experimental cirrhosis. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 159.

254. Дацко В. Вплив L-аргініну L-аспартату на структуру та функцію печінки при експериментальному цирозі у тварин. *Сучасні аспекти медицини та фармації–2021* : матеріали 81 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, 15-16 квітня 2021р., м. Запоріжжя. Запоріжжя, 2021. С. 32.

255. Дацко В. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки у експериментальних тварин. *Матеріали XXV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 12–14 квіт. 2021 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2021. С. 191.

256. Дацко В. А., Олещук О. М. Вплив L-аргініну L-аспартату на структуру та функцію печінки пр. и експериментальному цирозі у тварин. *УМСА-століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)* : матеріали Всеукр. міждисципл. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 8 жовт. 2021р., м. Полтава. Полтава, 2021. С. 47–49.

257. Імуногістохімічне дослідження експресії TNF- α та TGF- β при експериментальному цирозі печінки за умов корекції L-орнітину L-аспартатом у комбінації із інгібіторами синтезу NO та поліамінів / В. А. Дацко, О. М. Олещук, А. З. Миколенко, С. Б. Крамар. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXV наук.-практ. конф., 9 черв. 2022р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 89–91

258. Значення синтезу поліамінів в механізмі дії L-орнітину L-аспартату при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, Г. Я. Лой, Т. В. Дацко, Я. І. Іванків, М. І. Луканюк. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 127.

259. Dynamics of Acute Liver Injury in Experimental Models of Hepatotoxicity in the Context of Their Implementation in Preclinical Studies on Stem Cell Therapy / P. Czekaj et al. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022. Vol. 27, № 8. P. 237. DOI: 10.31083/j.fb12708237. PMID: 36042178.

260. Креховська-Лепявко О. М., Гудима А. А., Фурдела М. Я. Структурні зміни печінки щурів при гострому тетрахлорметановому гепатиті та його корекції L-аргініном та L-орнітином. *Вісник морфології*. 2012. Т. 18, № 1. С. 40–42.

261. Смирнов М. Л. L-орнітину–L-аспартат в лікуванні хворих з невідкладною хірургічною абдомінальною патологією. *Науковий вісник Ужгородського університету. Сер. Медицина*. 2011. Вип. 2(41). С. 237–24

262. Креховська-Лепявко О. М. Особливості впливу амінокислот L-орнітину та L-аргініну на стан жовчовидільної функції печінки у щурів в умовах гострого токсичного гепатиту. *Проблеми військової охорони здоров'я* : зб. наук. праць Української військово-медичної академії. Київ, 2012. № 33. С. 311–314.

263. Targeting Polyamine Metabolism for Control of Human Viral Diseases / M. Huang, W. Zhang, H. Chen, J. Zeng. *Infect Drug Resist.* 2020. Vol. 13. P. 4335–4346. DOI: 10.2147/IDR.S262024

264. Sens D. A., Levine J. H., Buse M. G. Stimulation of hepatic and renal ornithine decarboxylase activity by selected amino acids. *Metabolism*. 1983. Vol. 32, № 8. P. 787. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(83\)90108-7](https://doi.org/10.1016/0026-0495(83)90108-7).

265. Saigal S., Kapoor D., Roy D. S. Ademetionine in patients with liver disease: a review. *Int J Res Med Sci.* 2019. Vol. 7, № 6. P. 2482–2493. DOI: 10.18203/2320-6012.ijrms20192550

266. The effects of L-ornithine and L-arginine on the processes of lipid peroxidation in the functional layers of kidneys on the background of acute toxic hepatitis / O. M. Krekhovska-Lepiavko et al. *Wiadomości Lekarskie*. 2020. Vol. 73, № 11. P. 2498–2502. PMID: 33454690.

267. Олещук О. М. Застосування модуляторів синтезу оксиду азоту при токсичному та холестатичному ураженнях печінки. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2011. Т. 6, № 1. С. 214–217.

268. Креховська-Лепявко О. М., Гудима А. А., Городецький В. Є. Особливості впливу амінокислот L-орнітину та L-аргініну на функціональний

стан нирок у щурів в умовах гострого токсичного гепатиту. *Медична хімія*. 2013. Т. 15, № 1. С. 130–134.

269. Esrefoglu M. Oxidative stress and benefits of antioxidant agents in acute and chronic hepatitis. *Hepat Mon*. 2012. Vol. 12, № 3. P. 160–167. DOI: 10.5812/hepatmon.837

270. The role of medium molecular blood peptides in the development of cardiodepression in thermal burns / R. I. Lifshits, B. M. Val'dman, I. A. Volchegorskii, A. S. Puzhevskii. *Biull Eksp Biol Med*. 1986. Vol. 101, № 3. P. 280–282. PMID: 3955209

271. Effects of [(1-phenyl-5-formyl-1H-imidazol-4-yl)thio]acetic Acid on the Antioxidant Status of the Liver and Kidney in Rats with Tetrachloromethane Poisoning / A. A. Palamar et al. *Pharm Chem J*. 2021. Vol. 54. P. 1101–1105. <https://doi.org/10.1007/s11094-021-02328-w>

272. Differential Expression of Mn- and Cu,Zn-Superoxide Dismutases in Various Tissues of LEC Rats / K. Suzuki et al. *The LEC Rat. A new Model for Hepatitis and Liver Cancer* / ed. by M. Mori, M. C. Yoshida, N. Takeichi, N. Taniguchi. Tokyo : Springer-Verlag, 1991. P. 142–148. https://doi.org/10.1007/978-4-431-68153-3_15

273. Jatwa R., Kar A. Protective effect of L-ornithine-L-aspartate and silymarin on chemically induced kidney toxicity and thyroid dysfunction in mice. *EXCLI Journal*. 2008. Vol. 7. P. 139–150. DOI:10.17877/DE290R-8189

274. Mitochondria in the biology, pathogenesis, and treatment of hepatitis virus infections / C. Qu et al. *Rev Med Virol*. 2019. Vol. 29, № 5. P. e2075. DOI: 10.1002/rmv.2075

275. Gamble J. G., Lehninger A. L. Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 1973. Vol. 248, № 2. P. 610–618. PMID: 4684694

276. Sisalli MJ, Della Notte S, Secondo A, Ventra C, Annunziato L, Scorziello A. L-Ornithine L-Aspartate Restores Mitochondrial Function and

Modulates Intracellular Calcium Homeostasis in Parkinson's Disease Models. *Cells*. 2022;11(18):2909

277. Олещук О. М. Рівень прозапальних цитокінів та NO-синтази при гострому токсичному гепатиті та за введення модуляторів синтезу оксиду азоту. *Вісник наукових досліджень*. 2014. № 3. С. 93–96.

278. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges / J. Vítěček, A. Lojek, G. Valacchi, L. Kubala. *Mediators Inflamm*. 2012. Vol. 2012. P. 318087. DOI: 10.1155/2012/318087

279. Олещук О. М. Оксид азоту та жовчовиділення. *Вісник наукових досліджень*. 2012. № 2. С. 85–88.

280. Hirst D. G., Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol*. 2011. Vol. 704. P. 1–13. DOI: 10.1007/978-1-61737-964-2_1

281. Близнецова Г. Н. Пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система и оксид азота при токсическом повреждении печени : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук. : 03.01.04. Воронеж, 2004. 23 с.

282. Олещук О. М. Роль системи оксиду азоту в механізмах уражень печінки різного генезу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : 14.03.04. Тернопіль, 2013. 38 с. : рис., табл.

283. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease / R. W. Caldwell et al. *Physiol Rev*. 2018. Vol. 98, № 2. P. 641–665. DOI: 10.1152/physrev.00037.2016.

284. Thomas T., MacKenzie S. A., Gallo M. A. Regulation of polyamine biosynthesis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicol Lett*. 1990. Vol. 53, № 3. P. 315–325. DOI: 10.1016/0378-4274(90)90236-f

285. Kashiwagi K., Terui Y., Igarashi K. Modulation of Protein Synthesis by Polyamines in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol*. 2018. Vol. 1694. P. 325–336. DOI: 10.1007/978-1-4939-7398-9_27

286. A Phase I Trial of DFMO Targeting Polyamine Addiction in Patients with Relapsed/Refractory Neuroblastoma / G. L. Saulnier Sholler et al. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 5. P. e0127246. DOI: 10.1371/journal.pone.0127246

287. Difluoromethylornithine in combination with tamoxifen in female rats: 13-week oral toxicity study / A. P. Brown, R. L. Morrissey, J. A. Crowell, B. S. Levine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999. Vol. 44, № 6. P. 475–483. DOI: 10.1007/s002800051121

288. Developmental toxicity studies of 2-(difluoromethyl)-dl-ornithine (DFMO) in rats and rabbits / D. L. Kirchner, M. D. Mercieca, J. A. Crowell, B. S. Levine. *Toxicol Sci*. 1999. Vol. 50, № 1. P. 127–135. DOI: 10.1093/toxsci/50.1.127

289. Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G. F. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci*. 2011. Vol. 181, № 5. P. 593–603. DOI: 10.1016/j.plantsci.2011.04.002

290. Nitric oxide induced by polyamines involves antioxidant systems against chilling stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling / Q. N. Diao, Y. J. Song, D. M. Shi, H. Y. Qi. *J. Zhejiang Univ. Sci B*. 2016. Vol. 17, № 12. P. 916–930. DOI: 10.1631/jzus.B1600102

291. Ogiso S., Matsumoto T., Nimura Y. The role of polyamines in liver regeneration after hepatectomy with ischemic injury. *Surg Today*. 1997. Vol. 27, № 9. P. 833–839. DOI: 10.1007/BF02385274

292. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents / N. A. Bellé et al. *Brain Res*. 2004. Vol. 1008, № 2. P. 245–251. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.02.036

293. Polyamine enhances the regeneration of reduced glutathione by the activation of NADP-dependent dehydrogenases in yeast / Y. Tanemura, K. Murakami, M. Haneda, Y. Masataka. *Biomed Res*. 2004. Vol. 25, № 2. P. 69–74. DOI: 10.2220/biomedres.25.69.

294. Identification of genes differentially expressed by putrescine in HepG2 hepatoblastoma cells / S. Fujimoto et al. *Hepatol Res.* 2001. Vol. 20, № 2. P. 207–215. DOI: 10.1016/s1386-6346(00)00138-8
295. Wallace H. M., Fraser A. V., Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003. Vol. 376, Pt 1. P. 1–14. DOI: 10.1042/BJ20031327
296. GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020. Vol. 5, № 3. P. 245–266. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30349-8
297. Dooley S., ten Dijke P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 2012. Vol. 347, № 1. P. 245–256. DOI: 10.1007/s00441-011-1246-y
298. The glutathione cycle shapes synaptic glutamate activity / T. W. Sedlak et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019. Vol. 116, № 7. P. 2701–2706. DOI: 10.1073/pnas.1817885116
299. The role of nitric oxide in the modulation and tissue oxygenation in an experimental model of hepatic steatosis / S. Ijaz, W. Yang, M. C. Winslet, A. M. Seifalian. *Microvasc Res.* 2005. Vol. 70, № 3. P. 129–136. DOI: 10.1016/j.mvr.2005.08.001
300. Mahmoud M. F., Zakaria S., Fahmy A. Can Chronic Nitric Oxide Inhibition Improve Liver and Renal Dysfunction in Bile Duct Ligated Rats? *Adv Pharmacol Sci.* 2015. Vol. 2015. Article ID 298792. DOI: 10.1155/2015/298792
301. Модуляція системи оксиду азоту при експериментальному цирозі / О. М. Олешук, К. А. Посохова, Н. Є. Лісничук, А. Є. Мудра. *Вісник проблем біології і медицини.* 2012. № 1. С. 152–155.
302. Interaction of nitric oxide with catalase: structural and kinetic analysis / N. Purwar et al. *Biochemistry.* 2011. Vol. 50, № 21. P. 4491–4503. DOI: 10.1021/bi200130r.
303. Brown G. C. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem.* 1995. Vol. 232, № 1. P. 188–191. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20798.x..

304. Russell T. M., Richardson D. R. Glutathione-S-Transferases as Potential Targets for Modulation of Nitric Oxide-Mediated Vasodilation. *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 9. P. 1292. DOI: 10.3390/biom12091292

305. Chavez M. D., Kavdia M. A computational model for analysis of SOD isoforms impact on nitric oxide biotransport in an arteriole. *FASEB J*. 2007. Vol. 21, № 6. P. A1143–A1143. DOI: 10.1096/fasebj.21.6.A1143-b

306. Histological and biochemical evaluation of transforming growth factor- β activation and its clinical significance in patients with chronic liver disease / H. Yokoyama et al. *Helijon*. 2019. Vol. 5, № 2. P. e01231. DOI: 10.1016/j.helijon.2019.e01231.

307. Igarashi K., Kashiwagi K. Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB Life*. 2015. Vol. 67, № 3. P. 160–169. DOI: 10.1002/iub.1363.

ДОДАТОК А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Experimental cirrhosis liver morphology and function / V. A. Datsko, L. Ya. Fedoniuk, Y. I. Ivankiv, K. I. Kurylo, A. S. Volska, S. L. Malanchuk, O. M. Oleshchuk. *Wiadomości Lekarskie*. 2020. Vol. LXXIII, № 5. P. 947–952.

(SCOPUS)

2. Hepatoprotective effects of L-ornithine-L-aspartate in toxic liver injury / O. M. Oleshchuk, V. A. Datsko, H. Ya. Loi, T. V. Datsko, A. Ye. Mudra, S. L. Malanchuk, Ya. I. Ivankiv, L. Ya. Fedoniuk, N. S. Badiuk. *Farmacology OnLine*. 2021. Vol. 3. P. 146–155. **(SCOPUS)**

3. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Т. В. Дацко, Т. К. Головата. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2021. № 2. С. 54–61.

4. Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, А. З. Ничик, Я. І. Іванків, В. П. Пида, А. В. Чорномидз. *Медична та клінічна хімія*. 2022. Т. 24, № 1. С. 32–38.

5. Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, К. А. Посохова, І. П. Мосейчук, А. З. Ничик. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2022. Т. 16, № 1. С. 36–44.

6. Nitric oxide-mediated effects of L-ornithine-L-aspartate in acute toxic liver injury / V. Datsko, H. Loi, T. Datsko, A. Mudra, A. Mykolenko, T. Golovata, M. Furdela, Y. Orel, I. Smachylo, A. Burak, M. Klantsa, O. Oleshchuk. *Pharmacia*. 2022. Т. 69, № 2. С. 527–534. **(SCOPUS)**

7. Дацко В. А., Олещук О. М. Вплив L-орнітину L-аспартату на вміст TNF- α та TGF- β у печінці при експериментальному цирозі на фоні блокади синтезу оксиду азоту та поліамінів. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2022. № 3. С. 42–48.

8. Ефективність застосування L-орнітину L-аспартату при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, Т. В. Дацко, М. А. Орел. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIII наук.-практ. конф., 12 черв. 2020 р. Тернопіль : ТНМУ «Укрмедкнига», 2020. С. 68–69.

9. L-орнітину -L-аспартат при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, А. Є. Мудра, Т. В. Дацко, Я. І. Іванків. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VIII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 23–24 вересня 2020 р. Тернопіль : ТНМУ «Укрмедкнига», 2020. С. 295–296.

10. Дацко В. А., Олещук О. М., Дацко Т. В. Стан печінки за введення L-орнітину L-аспартату при токсичному гепатиті. *Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм* : матеріали X Всеукр. наук.-практ. конф., присв. Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології ТДМІ 110-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О., Галицькі читання II, 29–30 жовтня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 37–38.

11. Datsko V., Darmorys I., Havinska A. L-ornitine L-aspartate and L-NAME effectiveness in experimental cirrhosis. *Матеріали XXIV міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квітня 2020 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2020. С. 159.

12. Олещук О. М., Дацко В. А., Лой Г. Я. Вплив L-орнітин L-аспартату на маркери холестазу при гострому гепатиті. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXIV наук.-практ. конф., 11 черв. 2021 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2021. С. 168–169.

13. Дацко В. Вплив L-аргініну L-аспартату на структуру та функцію печінки при експериментальному цирозі у тварин. *Сучасні аспекти медицини*

та фармації – 2021 : матеріали 81 Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, 15-16 квітня 2021р. Запоріжжя, 2021. С. 32.

14. Дацко В. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки у експериментальних тварин. *Матеріали XXV Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 12–14 квіт. 2021 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2021. С. 191.

15. Дацко В. А., Олещук О. М. Вплив L-аргініну L-аспартату на структуру та функцію печінки пр. и експериментальному цирозі у тварин. *УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)* : матеріали Всеукр. міждисципл. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 8 жовт. 2021р., м. Полтава. Полтава, 2021. С. 47–49.

16. Імуногістохімічне дослідження експресії TNF- α та TGF- β при експериментальному цирозі печінки за умов корекції L-орнітину L-аспартатом у комбінації із інгібіторами синтезу NO та поліамінів / В. А. Дацко, О. М. Олещук, А. З. Миколенко, С. Б. Крамар. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* : матеріали підсумкової LXV наук.-практ. конф., 9 черв. 2022р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 89–91.

17. Дацко В. А., Лой Г. Я. Імуногістохімічне дослідження печінки при токсичному ураженні CCl₄ та при корекції L-орнітину L-аспартатом у комбінації з блокатором синтезу оксиду азоту. *Матеріали XXVI Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених*, 13-15 квіт. 2022 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 131.

18. Значення синтезу поліамінів в механізмі дії L-орнітину L-аспартату при експериментальному цирозі / О. М. Олещук, В. А. Дацко, Г. Я. Лой, Т. В. Дацко, Я. І. Іванків, М. І. Луканюк. *Хімія природних сполук* : матеріали VI Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 жовт. 2022 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2022. С. 127.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- підсумкова LXIII науково-практична конференція, м. Тернопіль, 12 червня 2020 р. *(доповідь і публікація)*;
- VIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів», м. Тернопіль, 23–24 вересня 2020 р. *(стендова доповідь і публікація)*;
- X Всеукраїнська науково-практична конференція, присвячена Ювілейним датам засновників кафедри патофізіології ТДМУ 110-річчю проф. Бергера Е.Н. і 90-річчю проф. Маркової О.О. Галицькі читання II, м. Тернопіль, 29–30 жовтня 2020 р. *(доповідь і публікація)*;
- XXIV міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 13–15 квітня 2020 р. *(публікація)*;
- підсумкова LXIV науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», м. Тернопіль, 11 червня 2021 р. *(публікація)*;
- 81 Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації – 2021», м. Запоріжжя, 15-16 квітня 2021 р. *(доповідь і публікація)*;
- XXV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 12–14 квіт. 2021 р. *(доповідь і публікація)*;
- Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень» (до 100-річчя від заснування УМСА), м. Полтава, 8 жовтня 2021 р., *(публікація)*;
- підсумкова LXV науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», м. Тернопіль, 9 черв. 2022 р. *(публікація)*;

- XXVI Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль 13-15 квіт. 2022 р. *(публікація)*;

- VI Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Хімія природних сполук», м. Тернопіль 27-28 жовт. 2022 р.: *(публікація)*.

ДОДАТОК В.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи
 Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я.Горбачевського
 МОЗ України
 проф. Дельгай Аркадій Гаврилович
 2023 » 01.12.2023р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. **Назва пропозицій до впровадження:** – встановлення механізмів протекторного впливу L-орнітину L-аспартату при гепатиті та цирозі печінки.
2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Дацко В.А.
3. **Джерела інформації:**
 В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, А. З. Ничик, Я. І. Іванків, В. П. Пίδα, А. В. Чорномидз. Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті. Медична та клінічна хімія. 2022; (24, № 1):32-38.
 В. А. Дацко, О. М. Олещук, Г. Я. Лой, М. П. Кланца, Т. В. Дацко, М. І. Луканюк, В. В. Черняшова, К. А. Посохова, І. П. Мосейчук, А. З. Ничик Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2022;(16,№1):36-44.
 В. А. Дацко, О. М. Олещук, Т. В. Дацко, Т. К. Головата. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L- орнітину L – аспартату при цирозі печінки. Здобутки клінічної та експериментальної медицини.2021. №2. С.54-61.
 Механізм протекторної дії L-орнітин L-аспартату при гострому гепатиті зумовлений здатністю препарату не здатністю зменшувати синтез сечовини та прояви ендотоксикозу, а також за рахунок здатності препарату зменшувати активність процесів ліпопероксидації з відновленням антиоксидантного захисту та відновлювати активність ферментів мітохондріального дихання гепатоцитів, зменшувати прояви цитолізу та холестазу. Важливу роль в механізмі дії досліджуваного препарату за умов гострого ураження печінки відіграє здатність препарату нормалізувати функціонування системи L-аргінин-оксид азоту.
 L-орнітин L-аспарат при цирозі пов'язаний зі зменшенням токсичного впливу аміаку за рахунок активізації синтезу сечовини, але і з опосередкованим покращення функціонального стану та активізації метаболічних процесів у печінці.
4. **Впроваджено:** кафедра фармакології з клінічною фармакологією.
4. **Включено:** у лекційний курс та практичні заняття.
5. **Результати впровадження:** використання результатів роботи Дацка В.А. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протекторної дії L-орнітин L-аспартату при гострих та хронічних захворюваннях печінки.
6. **Термін впровадження:** 2022/2023 навчальний рік.
7. **Зауваження та пропозиції:** немає

Відповідальний за впровадження
 завідувач кафедри фармакології з клінічною фармакологією
 Тернопільського національного медичного
 університету ім. І.Я.Горбачевського МОЗ України
 доктор медичних наук, професор

0.0/4 Олещук Олександра Михайлівна

ДОДАТОК В.2



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
 матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

- Назва пропозиції до впровадження:** – встановлення механізмів протекторного впливу L-орнітину L-аспартату при гепатиті та цирозі печінки.
- Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Дацко В.А.
- Джерела інформації:**
 - Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Г.Я. Лой та ін. *Медична та клінічна хімія* 2022. № 1. С. 32-38.
 - Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Г.Я. Лой та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія* 2022. №1. С.36-44.
 - Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Т.В. Дацко, Т.К. Головата *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* 2021. №2. С.54-61.

Механізм протекторної дії L-орнітину L-аспартату при гострому гепатиті зумовлений здатністю препарату зменшувати синтез сечовини та прояви ендотоксикозу, знижувати активність процесів ліпопероксидації з відновленням антиоксидантного захисту та активність ферментів мітохондріального дихання гепатоцитів, зменшувати прояви цитолізу та холестазу. Важливу роль в механізмі дії досліджуваного препарату за умов гострого ураження печінки відіграє здатність препарату нормалізувати функціонування системи L-аргінін-оксид азоту.

Фармакологічна дія L-орнітину L-аспартату при цирозі пов'язана не тільки зі зменшенням токсичного впливу аміаку за рахунок активації синтезу сечовини, але і з опосередкованим покращенням функціонального стану та активізації метаболічних процесів у печінці.
- Впроваджено:** кафедра фармакології.
- Включено:** у лекційний курс та практичні заняття.
- Результати впровадження:** використання результатів роботи Дацка В.А. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протекторної дії L-орнітин L-аспартату при гострих та хронічних захворюваннях печінки.
- Термін впровадження:** 2022/2023 навчальний рік.
- Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження,
 в.о. завідувача кафедри фармакології
 Дніпровського державного
 медичного університету
 доцент, к. фарм. н.,

Антон ЛЄВИХ

ДОДАТОК В.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з навчально-методичної роботи
 Буковинського державного медичного університету
 доц. мед. наук. Ігор Іванович Заморський
 2023р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

- Назва пропозиції до впровадження:** – встановлення механізмів протекторного впливу L-орнітину L-аспартату при гепатиті та цирозі печінки.
- Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Дацко В.А.
- Джерела інформації:**
 Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В.А.Дацко, О.М.Олещук, Г.Я. Лой та ін. *Медична та клінічна хімія* 2022, № 1, С. 32-38.
 Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В.А.Дацко, О.М.Олещук, Г.Я.Лой та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія* 2022, №1, С.36-44.
 Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L- орнітину L-аспартату при цирозі печінки / В.А.Дацко, О.М.Олещук, Т.В.Дацко, Т.К.Головата *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* 2021, №2, С.54-61.
 Механізм протекторної дії L-орнітину L-аспартату при гострому гепатиті зумовлений здатністю препарату зменшувати синтез сечовини та прояви ендотоксикозу, знижувати активність процесів ліпопероксидації з відновленням антиоксидантного захисту та активність ферментів мітохондріального дихання гепатоцитів, зменшувати прояви цитолізу та холестазу. Важливу роль в механізмі дії досліджуваного препарату за умов гострого ураження печінки відіграє здатність препарату нормалізувати функціонування системи L-аргінін-оксид азоту.
 Фармакологічна дія L-орнітину L-аспартату при цирозі пов'язана не тільки зі зменшенням токсичного впливу аміаку за рахунок активації синтезу сечовини, але і з опосередкованим покращенням функціонального стану та активізації метаболічних процесів у печінці.
Впроваджено: кафедра фармакології.
- Включено:** у лекційний курс та практичні заняття.
- Результати впровадження:** використання результатів роботи Дацка В.А. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти L-орнітину L-аспартату при гострих та хронічних захворюваннях печінки.
- Термін впровадження:** 2022/2023 навчальний рік.
- Зауваження та пропозиції:** немає

Відповідальний за впровадження
 завідувач кафедри фармакології
 Буковинського державного медичного університету
 доктор медичних наук, професор



Заморський Ігор Іванович

ДОДАТОК В.4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної та навчальної роботи
 Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова
 д-р. Сербеснікова Оксана Анатоліївна



Віння 2023р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

- Назва пропозиції до впровадження:** – встановлення механізмів протекторного впливу L-орнітину L-аспартату при гепатиті та цирозі печінки.
- Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Дацко В.А.
- Джерела інформації:**
 Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Г.Я. Лой та ін. Медична та клінічна хімія 2022. № 1. С. 32-38.
 Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Г.Я. Лой та ін. Фармакологія та лікарська токсикологія 2022. №1. С.36-44.
 Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L- орнітину L – аспартату при цирозі печінки / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Т.В. Дацко, Т.К. Головата Здобутки клінічної та експериментальної медицини 2021, №2. С.54-61.
 Механізм протекторної дії L-орнітину L-аспартату при гострому гепатиті зумовлений здатністю препарату зменшувати синтез сечовини та прояви ендотоксикозу, знижувати активність процесів ліпопероксидації з відновленням антиоксидантного захисту та активність ферментів мітохондріального дихання гепатоцитів, зменшувати прояви цитолізу та холестазу. Важливу роль в механізмі дії досліджуваного препарату за умов гострого ураження печінки відіграє здатність препарату нормалізувати функціонування системи L-аргінін-оксид азоту. Фармакологічна дія L-орнітину L-аспартату при цирозі пов'язана не тільки зі зменшенням токсичного впливу аміаку за рахунок активації синтезу сечовини, але і з опосередкованим покращенням функціонального стану та активізації метаболічних процесів у печінці.
Впроваджено: кафедра фармакології.
- Включено:** у лекційний курс та практичні заняття, протокол засідання кафедри фармакології ВНМУ № 6 від 13 січня 2023 р.
- Результати впровадження:** використання результатів роботи Дацка В.А. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протекторної дії L-орнітин L-аспартату при гострих та хронічних захворюваннях печінки.
- Термін впровадження:** 2022/2023 навчальний рік.
- Зауваження та пропозиції:** немає

Відповідальний за впровадження
 завідувачка кафедри фармакології
 Вінницького національного медичного
 університету ім. М.І. Пирогова
 доктор медичних наук, професор

Наталія ВОЛОЩУК

ДОДАТОК В.5



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів наукових досліджень в науково-педагогічний процес

1. **Назва пропозиції до впровадження:** – встановлення механізмів протекторного впливу L-орнітину L-аспартату при гепатиті та цирозі печінки.

2. **Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів:** Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра фармакології із клінічною фармакологією, Дацко В.А.

3. **Джерела інформації:**

1. Ефективність L-орнітину L-аспартату в попередженні ендотоксикозу і порушень мітохондріального дихання при гострому токсичному гепатиті / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Г.Я. Лой та ін. *Медицина та клінічна хімія* 2022. №1. С. 32-38.

2. Дослідження NO-залежного механізму дії L-орнітину L-аспартату щодо синдрому цитолізу та холестазу / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Г.Я. Лой та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія* 2022. №1. С.36-44.

3. Морфологічне підтвердження механізмів протективної дії L-орнітину L-аспартату при цирозі печінки / В.А. Дацко, О.М. Олещук, Т.В. Дацко, Т.К. Головата *Здобутки клінічної та експериментальної медицини* 2021. №2. С.54-61.

Механізм протекторної дії L-орнітину L-аспартату при гострому гепатиті зумовлений здатністю препарату зменшувати синтез сечовини та прояви ендотоксикозу, знижувати активність процесів ліпопероксидації з відновленням антиоксидантного захисту та активність ферментів мітохондріального дихання гепатоцитів, зменшувати прояви цитолізу та холестазу. Важливу роль в механізмі дії досліджуваного препарату за умов гострого ураження печінки відіграє здатність препарату нормалізувати функціонування системи L-аргінин-оксид азоту.

Фармакологічна дія L-орнітину L-аспартату при цирозі пов'язана не тільки зі зменшенням токсичного впливу аміаку за рахунок активації синтезу сечовини, але і з опосередкованим покращенням функціонального стану та активізації метаболічних процесів у печінці.

4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес.

6. **Результат впровадження:** використання результатів роботи Дацка В.А. у навчальному процесі дозволяє поглибити знання студентів про фармакодинамічні ефекти протекторної дії L-орнітин L-аспартату при гострих та хронічних захворюваннях печінки.

7. **Термін впровадження:** 2022/2023 навчальний рік.

8. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, протокол № 18 від 09 січня 2023 р.

Відповідальний за впровадження:

асистент кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця,
к.фарм.н.,

Дорошенко А.І.

Завідувачка кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця,
д.мед.н., професор

Зайченко Г. В.