



Н.О. Пентюк

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова

## Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування $CCl_4$ -індукованого фіброзу печінки у щурів

### Ключові слова

$CCl_4$ -індукований фіброз печінки, цироз, гомоцистеїн, оксидативний стрес.

Печінковий фіброгенез є вирішальним чинником природного перебігу хвороб печінки будь-якої етіології, оскільки зумовлює архітектурну перебудову органа з розвитком портальної гіпертензії і печінкової недостатності. Нині немає ефективної антифібротичної терапії, а наявні заходи обмежуються застосуванням симптоматичної терапії на етапі сформованого цирозу печінки. Значною мірою ця проблема зумовлена недостатнім розумінням молекулярних основ патогенезу фіброзу в печінці і чинників, що сприяють його розвитку.

Вважається, що в основі фіброзу печінки лежить активація зірчастих клітин Іто, які у відповідь на паракринні стимули з сусідніх уражених клітин трансформуються в міофібробласти, продукують низку фіброгенних медіаторів, які забезпечують їхню проліферацію, вазоконстрикцію, надмірну продукцію щільного позаклітинного матриксу та порушення його деградації [3]. Ми припускаємо, що в процесі печінкового фіброгенезу може бути залучене порушення обміну гомоцистеїну. Гіпергомоцистеїнемія є загально-визнаним незалежним чинником ризику атеротромботичних судинних хвороб [7] та причетна до патологічного ремоделювання серця і судин, активації системного запалення, тромботворення, вазоконстрикції [7], а саме ці чинники є елементами патогенезу фіброзу печінки [3]. Крім того, печінка відіграє провідну роль у метаболізмі гомоцистеїну [2].

Метою дослідження є вивчення впливу хронічної гіпергомоцистеїнемії на формування  $CCl_4$ -індукованого фіброзу печінки у щурів.

### Матеріали та методи

Дослідження проведено на 40 щурах популяції Вістар, які перебували на звичайному раціоні віварію та мали вільний доступ до питної води. Експериментальну модель фіброзу печінки створено шляхом інтрагастрального введення 40 % розчину  $CCl_4$  на соняшниковій олії з розрахунку 0,3 мл/100 г маси двічі на тиждень протягом 6 тиж [6]. Група інтактного контролю отримувала відповідну кількість олії. У тварин третьої групи було створено модель гіпергомоцистеїнемії шляхом інтрагастрального введення водного розчину тіолактону гомоцистеїну з розрахунку 100 мг/кг 4 доби на тиждень протягом 6 тиж [5]. Тварини четвертої групи отримували аналогічну кількість  $CCl_4$  і тіолактону гомоцистеїну, і таким чином було поєднано гіпергомоцистеїнемію і  $CCl_4$ -індукований фіброз печінки.

Біологічні матеріали брали у тварин під ефірним наркозом. У сироватці крові визначали активність аланінамінотрансферази та вміст загального білка. Кількість гідроксипроліну в печінці щурів визначали, як описано раніше [13]. Вміст гіалуронової кислоти в сироватці крові визначали за карбазоловою реакцією після її виділення шляхом хроматографування на целюлозі. Вміст карбонільних груп білків сироватки крові визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [8], вміст тіольних груп білків — за реакцією з реактивом Елмана [1]. Активність аконітази в післяядерному гомогенаті печінки визначали спектрофотометрично за формуванням цис-аконітату [14]. Активність ксантиноксидази в постмітохондріальній фракції печінки ви-

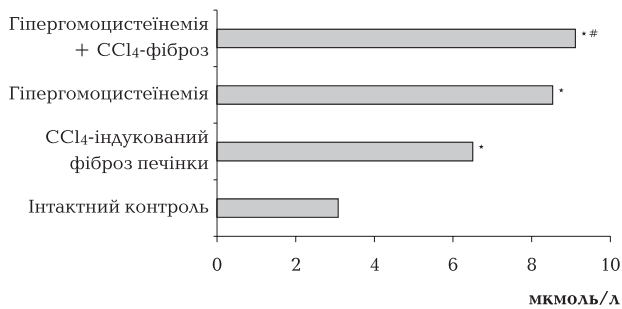


Рисунок. Рівень гомоцистеїну в сироватці крові щурів з хронічним навантаженням тіолактоном гомоцистеїну та CCl<sub>4</sub>-індукованим фіброзом печінки

\* Вірогідна різниця показників щодо групи «інтактний контроль».

\* Вірогідна різниця показників щодо групи «CCl<sub>4</sub>-індукований фіброз»

мірювали, використовуючи ксантин (кінцева концентрація 75 мкмоль), осаджували білки ацетонітрилом, а утворену сечову кислоту визначали за збільшенням поглинання при 293 нм. Активність NADPH-оксидази в постмітохондріальній фракції печінки вимірювали спектрофотометрично за спадом поглинання NADPH при 340 нм в інкубаційному середовищі, що містило 0,05 М К-фосфатний буфер рН 7,4 та 0,1 мМ NADPH [4]. Активність тіоредоксинредуктази визначали, як описано раніше [9].

### Результати та обговорення

Встановлено, що введення щурам тіолактому гомоцистеїну в сумарній дозі 2,4 г/кг протягом 6 тиж спричинило виразну гіпергомоцистеїнемію. Вміст гомоцистеїну в сироватці крові зріс більше ніж удвічі й становив (8,53 ± 0,54) проти (3,08 ± 0,22) мкмоль/л у групі інтактного контролю. В групі тварин з моделлю CCl<sub>4</sub>-індукованого фіброзу також спостерігалось вірогідне зростання вмісту гомоцистеїну в сироватці до (6,5 ± 0,57) мкмоль/л, що свідчить про значне порушення обміну цієї сірковмісної амінокислоти

при фіброзі печінки (рисунок). Поєднане введення тіолактому гомоцистеїну та CCl<sub>4</sub> призвело до розвитку вірогідно тяжчої гіпергомоцистеїнії, ніж у тварин з CCl<sub>4</sub>-індукованим фіброзом печінки, які не отримували тіолактому гомоцистеїну.

Введення CCl<sub>4</sub> протягом 6 тиж спричинило тяжкий фіброз печінки у дослідних тварин (табл. 1). Вірогідно збільшилося співвідношення маси печінки та селезінки стосовно маси тіла щурів, що є ознакою гепатоспленомегалії і характерне для сформованого цирозу. Вміст гіалуронової кислоти в сироватці крові зріс на 90 %, а рівень гідроксипроліну в печінці збільшився у понад вдвічі й становив (998 ± 95,9) проти (413 ± 58,5) мкг/г печінки у інтактних тварин. Це свідчить, що гіпергомоцистеїнемія індукує процеси фіброгенезу в печінці. Співвідношення маси печінки й маси тварини вірогідно зросло порівняно з групою інтактного контролю. Вміст гіалуронової кислоти в сироватці крові тварин також вірогідно збільшився на 27 %, що свідчить про посилення процесів синтезу екстрацелюлярного матриксу. Рівень гідроксипроліну в печінці, специфічного компоненту колагену, виявляв тенденцію до зростання.

Розвиток CCl<sub>4</sub>-індукованого фіброзу печінки на тлі гіпергомоцистеїнії спричинив найтяжчі патологічні зміни. Рівень гіалуронової кислоти в сироватці крові зріс на 130 % порівняно з групою інтактного контролю і був вірогідно вищим, ніж у тварин з моделлю CCl<sub>4</sub>-індукованого фіброзу печінки. Вміст гідроксипроліну в печінці становив (1277 ± 63,2) мкг/г печінки, втричі перевищував такий у інтактних тварин і був вірогідно вищим, ніж у тварин з моделлю фіброзу печінки. Практично у всіх тварин цієї групи спостерігались асцит та спонтанна кровоточивість, а також тенденція до посилення гепатоспленомегалії.

Як свідчать дані табл. 2, хронічне введення CCl<sub>4</sub> закономірно спричинює вірогідне підвищення активності АЛТ на 54 % та зменшення

Таблиця 1. Вплив гіпергомоцистеїнії на показники фіброзу печінки у щурів (M ± m)

Показник	Інтактний контроль (n = 10)	CCl <sub>4</sub> -індукований фіброз печінки (n = 10)	Гіпергомоцистеїнемія (n = 10)	Гіпергомоцистеїнемія + CCl <sub>4</sub> -фіброз печінки (n = 10)
Маса печінки/маса тварини · 100	3,32 ± 0,15	3,82 ± 0,18*	3,85 ± 0,19*	3,90 ± 0,14*
Маса селезінки/маса тварини · 100	0,35 ± 0,02	0,503 ± 0,034*	0,390 ± 0,019	0,560 ± 0,030*
Гіалуронова кислота, нг/мл	71,1 ± 3,55	137 ± 8,16*	90,3 ± 5,93*	162 ± 7,13**
Гідроксипролін печінки, мкг/г	413 ± 58,7	998 ± 95,9*	579 ± 44,3	1277 ± 63,2* #
Асцит	0	1	0	8
Спонтанні кровотечі	0	0	0	7

Примітка. \* Вірогідна різниця показників щодо групи «інтактний контроль».

\*\* Вірогідна різниця показників щодо групи «CCl<sub>4</sub>-індукований фіброз».

вмісту загального білка в сироватці крові на 23 %. Водночас синдроми цитолізу і зниження білково-синтетичної функції печінки виявляли і у тварин з моделлю гіпергомоцистеїнемії без застосування  $CCl_4$ , хоча і в менших масштабах. Так, активність АЛТ у сироватці крові вірогідно зросла на 17 %, вміст загального білка виявився вірогідно нижчим (на 8 %) порівняно з такими у інтактних тварин. Гіпергомоцистеїнемія поглиблювала ступінь цитолізу і печінкової недостатності при  $CCl_4$ -індукованому фіброзі: активність АЛТ сягала ( $4,26 \pm 0,15$ ) мкмоль/(л·год) порівняно з ( $2,67 \pm 0,19$ ) мкмоль/(л·год) в групі інтактного контролю, вміст загального білка знизився до ( $76,9 \pm 1,18$ ) порівняно з ( $89,4 \pm 1,38$ ) г/л відповідно.

Формування експериментального фіброзу печінки супроводжувалося виявами оксидативного стресу. Вміст білкових карбонільних груп у сироватці крові перевищував такий у інтактних тварин на 58 %, а рівень білкових тиольних груп був меншим на 28 %. Хронічне навантаження тіолактоном гомоцистеїну також супроводжувалося деякими ознаками окисної модифікації білків. Так, вміст карбонільних груп вірогідно зріс до ( $5,75 \pm 0,30$ ) проти ( $4,37 \pm 0,10$ ) нмоль/мг білка у інтактних тварин, а вміст SH-групи вірогідно знизився до ( $11,6 \pm 0,78$ ) проти ( $14,1 \pm 0,80$ ) ммоль/л відповідно. Гіпергомоцистеїнемія значно поси-

лила вияви оксидативного стресу у тварин з експериментальним фіброзом печінки, що виявлялося значним виснаженням кількості тиольних груп та нагромадженням карбонільних груп білків у сироватці крові, причому вміст SH-груп білків був вірогідно меншим, ніж у тварин з групи  $CCl_4$ -індукованого фіброзу, і становив лише ( $7,52 \pm 1,02$ ) ммоль/л.

Як видно з табл. 3, формування фіброзу супроводжується виразними змінами активності прооксидантних та антиоксидантних ферментів печінки. Зокрема, активність NADPH-оксидази та ксантинооксидази — ферментів-продуцентів вільних радикалів кисню — вірогідно зростала на 70 та 54 % відповідно. Водночас активність тіоредоксинредуктази та аконітази в печінці щурів з  $CCl_4$ -індукованим фіброзом вірогідно падала на 22 та 28 % відповідно, що є ознакою виснаження тіоредоксинозалежної системи та інактивації мітохондріальної аконітази надлишком супероксиду. Введення тваринам гомоцистеїну також спричинило посилення процесів оксидативного стресу. Причому якщо активність аконітази мала лише тенденцію до зниження, то падіння активності тіоредоксинредуктази було навіть більш виразним, ніж у групі щурів з моделлю  $CCl_4$ -індукованого фіброзу печінки, і становило 34 %. Активність NADPH-оксидази у щурів з гіпергомоцистеїнемією вірогідно зросла і становила

Таблиця 2. Активність аланінамінотрансферази (АЛТ), вміст білка, білкових карбонільних і тиольних груп у сироватці крові щурів ( $M \pm m$ )

Показник	Інтактний контроль (n = 10)	$CCl_4$ -індукований фіброз печінки (n = 10)	Гіпергомоцистеїнемія (n = 10)	Гіпергомоцистеїнемія + $CCl_4$ -фіброз печінки (n = 10)
АЛТ у сироватці крові, ммоль/(л·год)	$2,67 \pm 0,19$	$4,12 \pm 0,12^*$	$3,13 \pm 0,08^*$	$4,26 \pm 0,15^*$
Загальний білок у сироватці крові, г/л	$89,4 \pm 1,38$	$78,2 \pm 2,21^*$	$82,1 \pm 1,55^*$	$76,9 \pm 1,18^*$
Карбонільні похідні сироватки, нмоль/мг білка	$4,37 \pm 0,10$	$6,91 \pm 0,34^*$	$5,75 \pm 0,30^*$	$6,84 \pm 0,35^*$
SH-групи білків, ммоль/л	$14,1 \pm 0,80$	$10,2 \pm 0,74^*$	$11,6 \pm 0,78^*$	$7,52 \pm 1,02^{**}$

Примітка. \* Вірогідна різниця показників щодо групи «інтактний контроль».

\*\* Вірогідна різниця показників щодо групи « $CCl_4$ -індукований фіброз».

Таблиця 3. Вплив гіпергомоцистеїнемії на активність редоксочутливих ферментів печінки щурів з  $CCl_4$ -індукованим фіброзом ( $M \pm m$ )

Показник	Інтактний контроль (n = 10)	$CCl_4$ -індукований фіброз печінки (n = 10)	Гіпергомоцистеїнемія (n = 10)	Гіпергомоцистеїнемія + $CCl_4$ -фіброз печінки (n = 10)
NADPH-оксидаза, нмоль/(хв · мг білка)	$1,15 \pm 0,11$	$1,96 \pm 0,185^*$	$1,73 \pm 0,19^*$	$2,43 \pm 0,300^*$
Ксантинооксидаза, од. опт. щ./ (хв · 10 мг білка)	$0,084 \pm 0,004$	$0,129 \pm 0,017^*$	$0,107 \pm 0,009^*$	$0,143 \pm 0,019^*$
Тіоредоксинредуктаза, од. опт. щ./ (хв · 10 мг білка)	$0,087 \pm 0,006$	$0,068 \pm 0,006^*$	$0,057 \pm 0,004^*$	$0,058 \pm 0,009^*$
Аконітаза, од. опт. щ./ (хв · 10 мг білка)	$6,45 \pm 0,71$	$4,62 \pm 0,47^*$	$6,13 \pm 0,74$	$4,13 \pm 0,52^*$

Примітка. \* Вірогідна різниця показників щодо групи «інтактний контроль».

( $1,73 \pm 0,19$ ) проти ( $1,15 \pm 0,11$ ) нмоль/(хв · мг білка) в групі інтактних тварин. Активність ксантиноксидази у щурів з гіпергомоцистеїнемією вірогідно зросла на 27 % порівняно з інтактними тваринами. Формування експериментального фіброзу печінки на тлі гіпергомоцистеїнемії характеризувалося тенденцією до поглиблення змін активності зазначених ферментів.

Таким чином, хронічна гіпергомоцистеїнемія ініціює процеси фіброгенезу в печінці, що виявлялося гепатомегалією, зростанням вмісту гіалуронової кислоти в сироватці крові щурів та тенденцією до збільшення вмісту гідроксипроліну в печінці. Дані літератури свідчать, що гіпергомоцистеїнемія у мишей з дефектом цистатіонін-бета-синтетази супроводжується посиленням експресії інгібітора металопротеїнази-1 та про(альфа)1 колагену типу I в печінці [12], що можна розцінити як наявність профіброгенної дії надлишку гомоцистеїну. Наші дані свідчать, що гіпергомоцистеїнемія здатна істотно промотувати прогресування експериментального фіброзу печінки і пришвидшувати настання декомпенсації цирозу в дослідних тварин. Про тісний зв'язок порушень обміну гомоцистеїну з процесами фіброгенезу свідчить і той факт, що і у тварин з  $CCl_4$ -індукованим фіброзом виявляється істотне зростання рівня гомоцистеїну в крові. Таким чином, формується патологічне коло: з одного боку, підвищений рівень гомоцистеїну прискорює печінковий фіброгенез, з іншого — прогресування фіброзу веде до формування гіпергомоцистеїнемії.

Отримані нами дані свідчать, що одним із механізмів профіброгенної дії гіпергомоцистеїнемії є активація оксидативного стресу. На це вказують нагромадження карбонільних і виснаження тіольних груп білків сироватки крові, зниження активності антиоксидантних ферментів аконітази і тіоредоксинредуктази, активація прооксидантних ферментів NADPH-оксидази та ксантиноксидази в печінці. Оксидативний стрес розглядається не лише як універсальний патологіч-

ний чинник хронічного запалення та деструкції тканин, а й важливий елемент патогенезу фіброзування, оскільки саме активні форми кисню (супероксидний та гідроксильний радикали) є головними транскрипційними активаторами трансформації зірчастих клітин та продукції фіброгенних медіаторів [10].

Прооксидантна дія надлишку гомоцистеїну, очевидно, пов'язана з його відновними властивостями, завдяки яким він у присутності іонів перехідних металів ініціює утворення активних форм кисню, а також зі здатністю тіолактону гомоцистеїну модифікувати білки [2, 11, 15].

## Висновки

Інтрагастральне введення  $CCl_4$  протягом 6 тиж у сумарній дозі 14,4 мл/кг спричинює розвиток тяжкого фіброзу печінки у щурів з розвитком гепатоспленомегалії, зростанням вмісту гіалуронової кислоти в сироватці крові та гідроксипроліну в печінці і формуванням гіпергомоцистеїнемії.

Тривале введення тіолактону гомоцистеїну ініціює печінковий фіброгенез у щурів, який виявляється гепатомегалією, зростанням вмісту гіалуронової кислоти в сироватці крові, збільшенням вмісту гідроксипроліну в печінці.

Хронічна гіпергомоцистеїнемія значною мірою прискорює формування  $CCl_4$ -індукованого фіброзу та пришвидшує настання декомпенсації цирозу у тварин.

Одним із механізмів фіброгенної дії гомоцистеїну є активація оксидативного стресу, що виявляється симптомами окисної модифікації білків, зниженням активності аконітази і тіоредоксинредуктази, активацією прооксидантних ферментів NADPH-оксидази та ксантиноксидази в печінці.

Таким чином, гіпергомоцистеїнемія не лише обтяжує прогресування експериментального фіброзу печінки, а й здатна ініціювати фіброгенез. Тому перспективним напрямом подальших досліджень є вивчення антифіброзної активності гіпогомоцистеїнемічних засобів, зокрема бетаїну і фолату.

## Список літератури

1. Вєревкіна І.В., Точилкін А.І., Попова Н.А. Колориметрический метод определения SH-групп и S-S-связей в белках при помощи 5,5'-дیتیобис (2-нітробензойной) кислоты // *Современные методы в биохимии.*— М.: Медицина, 1977.— С. 223—228.
2. Пєнтюк О.О., Лудюк М.Б., Андрушко І.І., Постовітенко К.П. Метаболізм гомоцистеїну та його роль в патології // *Укр. біохім. журн.*— 2003.— № 75 (1).— С. 5—17.
3. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis // *J. Clin. Invest.*— 2005.— N 115 (2).— P. 209—218.
4. Fukui T., Ishizaka N., Rajagopalan S. et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats // *Circ. Res.*— 1997.— N 80 (1).— P. 45—51.
5. Fischer P.A., Dominguez G.N., Cuniberti L.A. et al. Hyperhomocysteinemia induces renal hemodynamic dysfunction: is nitric oxide involved? // *J. Am. Soc. Nephrol.*— 2003.— N 14 (3).— P. 653—360.
6. He S.-X., Luo J.-Y., Wang Y.-P. et al. Effects of extract from Ginkgo biloba on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats // *World J. Gastroenterol.*— 2006.— N 12 (24).— P. 3924—3928.
7. Huang T., Yuan G., Zhang Z. et al. Cardiovascular pathogenesis in hyperhomocysteinemia // *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*— 2008.— N 17 (1).— P. 8—16.
8. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins // *Methods Enzymol.*— 1994.— N 233.— P. 346—357.
9. Lu J., Papp L.V., Fang J. et al. Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity // *Cancer Res.*— 2006.— N 66 (8).— P. 4410—4418.

10. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis // *Fibrogenesis & Tissue Repair*.— 2008.— N 1 (5).— P. 1755—1769.
11. Ramakrishnan S., Sulochana K.N., Lakshmi S. et al. Biochemistry of homocysteine in health and diseases // *Indian J. Biochem. Biophys.*— 2006.— N 43 (5).— P. 275—283.
12. Robert K., Nehme J., Bourdon E. et al. Cystathionine beta synthase deficiency promotes oxidative stress, fibrosis, and steatosis in mice liver // *Gastroenterology*.— 2005.— N 128 (5).— P. 1405—1415.
13. Siddiqi N.J., Alhomida A.S. Investigation into the distribution of total, free, peptide-bound, protein-bound, soluble- and insoluble-collagen hydroxyproline in various bovine tissues // *J. Biochem. Mol. Biol.*— 2003.— N 36 (2).— P. 154—158.
14. Takemoto M., Node K., Nakagami H. et al. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy // *J. Clin. Invest.*— 2001.— N 108 (10).— P. 1429—1437.
15. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidative stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function // *Curr. Drug. Metab.*— 2005.— N 6 (1).— P. 27—36.

Н.А. Пентюк

## Влияние гипергомоцистеинемии на формирование CCl<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени у крыс

Интрагастральное введение CCl<sub>4</sub> на протяжении 6 нед в суммарной дозе 14,4 мл/кг вызвало формирование тяжелого фиброза печени у крыс с развитием гепатоспленомегалии, гипергомоцистеинемии, значительным повышением уровня гиалуроновой кислоты в сыворотке крови, гидроксипролина в печени. Хроническая гипергомоцистеинемия, вызванная интрагастральным введением тиолактона гомоцистеина в суммарной дозе 2,4 г/кг на протяжении 6 нед, активизирует печеночный фиброгенез у интактных животных, что проявляется гепатомегалией, повышением уровня гиалуроновой кислоты в сыворотке крови, содержания гидроксипролина в печени. Хроническая гипергомоцистеинемия значительно усиливает формирование CCl<sub>4</sub>-индуцированного фиброза печени и ускоряет декомпенсацию цирроза у крыс. Одним из механизмов фиброгенного действия гомоцистеина является активация оксидативного стресса с явлениями окислительной модификации белков, снижением активности аконитазы и тиоредоксинредуктазы, активацией NADPH-оксидазы и ксантинооксидазы в печени крыс.

N.O. Pentiuik

## The influence of hyperhomocysteinemia on formation CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats

The intragastric administration of CCl<sub>4</sub> during 6 weeks in total dose 14.4 ml/kg has caused formation of severe liver fibrosis in rats with the development of hepatosplenomegaly, significant increase of the levels of serum hyaluronic acid, liver hydroxyproline and formation of hyperhomocysteinemia. Chronic hyperhomocysteinemia, induced by intragastric administration of homocysteine-tiolactone in total dose of 2.4 g/kg during 6 weeks, activates liver fibrogenesis in intact animals, that is shown by hepatomegaly, increases serum level hyaluronic acid and liver hydroxyproline contents. Chronic hyperhomocysteinemia considerably strengthens formation of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis and accelerates decompensation of liver cirrhosis in rats. One of the mechanisms of homocysteine fibrogenic action is activation oxidative stress, with protein oxidation, reduction of aconitase and thioredoxin reductase activity, activation of NADPH-oxidase and xanthinoxidase in rats liver.

### Контактна інформація

Пентюк Наталія Олександрівна, к. мед. н., асистент кафедри пропедевтики внутрішньої медицини  
21029, м. Вінниця, вул. Квятека, 5, кв. 16

Стаття надійшла до редакції 1 липня 2009 р.