НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

**ТУРБАЛ ЛЮДМИЛА ВОЛОДИМИРІВНА**

УДК 61:612.3:615.9.616.3:616-099

# ДИСЕРТАЦІЯ
# МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ОТРУТИ ЗМІЙ ВИДУ VIPERA BERUS

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 _____ Л.В. Турбал

Наукові керівники:

Яременко Лілія Михайлівна, доктор медичних наук, професор;

Маєвський Олександр Євгенійович, доктор медичних наук, професор.

Київ – 2025

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 11:16:06 23.04.2025

Назва файлу з підписом: дисертація_Турбал.pdf.asice
Розмір файлу з підписом: 13.2 МБ

Перевірені файли:
Назва файлу без підпису: дисертація_Турбал.pdf
Розмір файлу без підпису: 14.0 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Турбал Людмила Володимирівна
П.І.Б.: Турбал Людмила Володимирівна
Країна: Україна
РНОКПП: 3314217780
Організація (установа): Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
Код ЄДРПОУ: 02010787
Посада: Асистент кафедри описової та клінічної анатомії
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 11:16:03 23.04.2025
Сертифікат виданий: КНЕДП ТОВ "Центр сертифікації ключів "Україна"
Серійний номер: 3434FD07000000000000000000000000000001
Алгоритм підпису: ДСТУ 4145
Тип підпису: Удосконалений
Тип контейнера: Підпис та дані в архіві (розширений) (ASIC-E)
Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)
Сертифікат: Кваліфікований

Версія від: 2025.02.05 13:00

# АНОТАЦІЯ

*Турбал Л. В.* Морфологічні та біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2025.

У дисертаційній роботі подано теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-практичного завдання щодо визначення особливостей морфологічних та біохімічних змін печінки за умов впливу отрути змій виду Vipera berus, що відображають стан гепатоцитів.

Дисертаційне дослідження здійснене відповідно до планів наукових досліджень Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця і є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри гістології та ембріології "Вивчити тканинні реакції різних відділів нервової системи та внутрішніх органів на ураження різного ґенезу, та їх модуляцію. Педагогічні аспекти викладання гістології" (номер державної реєстрації 0123U101216).

Експеримент проведено на 50 білих безпородних щурах-самцях, що отримані з віварію Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Протягом дослідження експериментальних тварин розподіляли на групу контролю та дві групи досліду: щурі, яким внутрішньоочеревинно вводили яд гадюки Vipera berus berus у відповідній дозі $LD_{50}$, та щурі, яким внутрішньоочеревинно вводили яд гадюки Vipera berus nikolskii у відповідній дозі $LD_{50}$.

Вибір дози був обумовлений попередніми дослідженнями, в яких було чітко встановлені токсичні дози ядів звичайних гадюк Vipera berus berus та Vipera berus nikolskii.

Для гістологічного дослідження забирали шматочки печінки у попередньо зважених тварин всіх груп та вивчали за допомогою методів

світлової і електронної мікроскопії. Гомогенати печінки, а також зразки крові експериментальних щурів використовували для проведення біохімічних і лабораторних досліджень.

При світловій мікроскопії печінки щурів контрольної групи встановлено, що пухка волокниста сполучна тканина добре розвинена у ділянці портального тракту, проте погано виражена між часточками; часточки мають неправильну, гексагональну форму, межі не мають чіткого контуру. Гепатоцити полігональної форми із оксифільною цитоплазмою, з одним, іноді двома світлими ядрами. У складі стінки синусоїдів виявляються поодинокі зірчасті макрофаги, в перисинусоїдальному просторі виявляються поодинокі клітини Іто. У кутах печінкової часточки локалізуються печінкові тріади, просвіт міжчасточкової вени широкий; у стінці міжчасточкової артерії у середній оболонці наявні гладкі міоцити; стінка міжчасточкової жовчної протоки утворена одношаровим кубічним епітелієм. Крім тріад, на кутах часточки виявляються лімфатичні судини. Випадіння нітро-синього тетразолю в осад у вигляді гранул диформазану синього кольору вказує на наявність сукцинатдегідрогенази; у цитоплазмі гепатоцитів виявляються дуже багато порохоподібно-аморфного матеріалу та відсутні великі гранули осаду барвника і гранули диформазану, які рівномірно розташовані по всій ділянці класичної часточки. Глікоген накопичується рівномірно у цитоплазмі клітин у вигляді великих та дрібних грудок рожево-червоного забарвлення. В перипортальних та центролобулярних ділянках печінкових часточок спостерігалася слабка або негативна реакція експресії антигена $CD86^+$. Між типовими печінковими балками розташовані просвіти синусоїдних гемокапілярів, у стінці яких локалізуються тіла $CD86^+$ клітин із характерною світло-коричневою цитоплазмою та добре розвиненими відростками.

Гістологічні дослідження печінки щурів при укусі гадюки степової показали прояв реактивних альтеративних змін у стромі та паренхімі органу; порушення синусоїдних гемокапілярів, просвіти яких нерівномірно розширені, повнокровні з стазом еритроцитів, відзначається небагато

лімфоцитів; в сполучній тканині навколо тріад лейкоцитарна інфільтрація; в просвіті кровонаповнених міжчасточкових вен стази та сладжування еритроцитів. Розташування гепатоцитів у вигляді печінкових пластинок збережене; у перипортальній, центролобулярній ділянках часточок клітини із пікнотичними ядрами та інтенсивно базофільною цитоплазмою, особливо у перипортальних ділянках; в просторі Діссе збільшення популяції клітин Купфера. Відзначається нерівномірна активність сукцинатдегідрогенази у часточках; гепатоцити із помірною активністю ферменту забарвлюються інтенсивно, характеризуються великими гранулами диформазану та порохоподібно-аморфним осадом і розташовані переважно у периферійних ділянках часточки. У центролобулярній зоні гепатоцити із низьким ступенем забарвлення, що вказує на зниження сукцинатдегідрогенази у цитоплазмі клітин. У більшості гепатоцитів скупчення рожево-червоних гранул глікогену периферійно, при цьому частина цитоплазми звільнена від вмісту та має оксифільне забарвлення; окремі клітини із типовою локалізацією даної трофічної сполуки. В різних ділянках печінкової часточки виявляються популяції $CD86^+$ клітин, більшість з них мають світло-коричневу або коричневу цитоплазму із численними відростками, які залягають вздовж просвіту синусоїда, іноді виявляються у перисинусоїдих просторах. Ступінь експресії трансмембранного глікопротеїну CD86 невисокий, проте у порівнянні з інтактною групою тварин інтенсивніший. Збільшення популяції $CD86^+$ клітин вказує на реактивні запальні процеси.

Мікроскопічні дослідження печінки тварин при укусі гадюки Нікольського встановили значні дистрофічні і запальні зміни паренхіми органу у порівняні з попередніми групами тварин. Спостерігається пошкодження часточкової будови печінки і порушення цитоархітектоніки печінкових часточок; значні осередки хаотичного розташування гепатоцитів із втратою типової балкової структури. Більшість гепатоцитів з дистрофічними змінами, особливо у центролобулярних ділянках, що проявляється локальними явищами гідропічної дистрофії. Більшість синусоїдів

кровонаповнені, з явищами сладжування еритроцитів та початком формування тромбів. Окремі гемокапіляри мають значно розширені просвіти та пошкоджений ендотелій. Втрачається цілісність будови стінки центральної вени, виявляється її стоншення та фрагментація. Є значні інфільтрати лімфогістіоцитів з вогнищевими накопиченнями біля жовчних проток і лімфоцитів, розподілених уздовж печінкових пучків у синусоїдальних капілярах. У судинах відбувається застій, в результаті чого утворюються тромби. Контури стінки міждолькової жовчної протоки нечіткі, супроводжуються набряком аморфного компонента пухкої сполучної тканини в межах тріад. При гістохімічному аналізі виявлено помітне зниження рівня сукцинатдегідрогенази. У цитоплазмі виявлено кілька великих гранул, тоді як більшість клітин демонструють локально концентрований аморфний осад диформазану, що свідчить про порушення процесу гліколізу. Крім того, гістохімічне дослідження глікогену виявляє низьку концентрацію цієї життєво важливої сполуки (у вигляді дрібних гранул вздовж краю плазмалеми) в гепатоцитах; деякі клітини демонструють повну відсутність глікогену. Інтенсивно забарвлені клітини CD86+ розподіляються по печінкових часточках, що вказує на виражену запальну реакцію, викликану впливом на орган отрути гадюки Нікольського. Цитоплазма цих клітин темно-коричньова, що відображає фіксацію вторинних антитіл; відростки численні і заповнюють просвіти синусоїдальних гемокапілярів, а деякі поширюються на просвіт Діссе. При фарбуванні гематоксиліном Майєра в гепатоцитах виявляються виражені деструктивні зміни, включаючи освітлену вакуолізовану цитоплазму і пікнотизацію ядер; синусоїди значно розширюються чи спадаються, що порушує архітектуру часточок печінки.

При електронно-мікроскопічному дослідженні печінки щурів контрольної групи встановлено, що гепатоцити включають округлі, великі ядра, які містять переважно електронносвітлий еухроматин, поодиноко визначаються невеликі грудки гетерохроматину. Каріолема клітин чітко контурована, рівна, без інвагінацій, з чисельними ядерними порами.

Цитоплазма помірної електронної щільності із добре розвиненими органелами синтетичного апарату. Плазмолеми гепатоцитів чіткі, формують у васкулярній поверхні мікроворсинки, в контактних поверхнях та у ділянках жовчних капілярів визначаються десмосоми та щільні замикальні контакти. Просвіти жовчних капілярів помірні із добре вираженими мікроворсинками. В просторі Діссе локалізуються клітини Купфера, поодиноко клітини Ito. Синусоїдні гемокапіляри містять ендотеліоцити. Просвіт кровоносних капілярів нешироκий, містить формені елементи крові.

За умов дії отрути гадюки степової при гістологічному дослідженні клітин печінки показало значні зміни структури паренхіматозного та судинного компонентів. Жовчні капіляри погано контуровані з нечисельними мікроворсинками. Перинуклеарний простір локально розширений. Функціональна напруженість в органі за умов токсичної дії отрути гадюки степової супроводжується гетерогенністю гепатоцитів. При електронномікроскопічному дослідженні визначається поява чисельних “темних” клітин, в яких цитоплазма містить слабо розвинені органели синтетичного та енергетичного апаратів, які в значній мірі деструктуризовані. Зростає число осміофільних первинних лізосом, вторинних-фагосом та пероксисом. Зменшується вміст дрібнодисперсних, осміофільних включень глікогену. Виявлялись “світлі” гепатоцити, які містили різко електронносвітлу гіалоплазму, поодинокі мембранні органели, які були нечіткими та фрагментованими. При гістологічному дослідженні було встановлено, що гемотоксичний вплив отрути гадюки степової спричинив зростання кількості клітин Купфера, які втрачали зв'язок із ендотелієм та мігрували в перисинусоїдний простір. Зростало число pit-клітин в перисинусодному просторі Діссе як прояв захисних імунних реакцій. Також визначилися клітини Ito з включеннями ліпідних гранул в цитоплазмі. Відзначались дисциркуляторні зміни в органі: звужені або переважно розширені синусоїдні гемокапіляри з наявністю еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів. Стінка капілярів нечітко контурована, базальна мембрана несуцільна із широкими

порами та на значних площах відсутня. Часто формує осміофільні гомогенні смужки. Ендотеліальні клітини мали локальний набряк цитоплазматичних ділянок, люменальна поверхня плазмолеми також була нечітко структурована.

При гістологічному дослідженні клітин печінки щурів за умов впливу отрути Нікольського встановлено, що ступінь вираженості деструктивних змін судинного та паренхіматозного компонентів органу був більшим. При електронно-мікроскопічному дослідженні було встановлено, що зростало число "темних" клітин, каріо- та гіалоплазма яких була підвищеної осміофілії, а органели деструктуризовані, гомогенні. Лізосоми в цитоплазмі чисельні, електроннощільні. Також визначалися "світлі" гепатоцити, цитоплазма яких була низької електронної щільності із поодинокими фрагментованими органелами та великими осміофільними фагосомами. Значні реактивні зміни спостерігалися і в гемокапілярах органу за умов дії гемотоксину. При гістологічному дослідженні було встановлено, що мікросудини мали рідко звужений просвіт, переважно визначалися повнокровні, із стазами та сладжами еритроцитів у їх просвіті, нейтрофільними гранулоцитами, лімфоцитами. Стінка пошкоджена, цитоплазма ендотелію ущільнена, формує осміофільні смужки, ядра ендотеліоцитів невеликі, видовжені, з нечіткою каріолемою та гетерохроматином по всій площі каріоплазми. Також в центролобулярних ділянках виявлялися гемокапіляри з широким просвітом, деструктуризованою стінкою, в якій цитоплазма локально інтенсивно набрякла та виступає в просвіт гемокапіляра у вигляді лопатоподібних утворів.

В просторі Діссе визначаються pit клітини. Перебіг запальних процесів у печінці проявляється також зростанням числа активних макрофагальних клітин Купфера, що втрачали контакт із ендотелієм та переміщалися в перисинусоїдний простір Діссе і характеризувалися ультраструктурно наявністю в їх цитоплазмі чисельних осміофільних невеликих первинних лізосом та вторинних, об'ємних – фагосом.

При біохімічному дослідженні крові та гомогенатів печінки щурів за умов дії отрути Vipera berus встановлено, що введення отрути призводить до

зниження вмісту загального білка в досліджуваному органі. Спостерігались зміни вмісту білкових фракцій різної молекулярної маси, зокрема знижувався вміст білків вищої молекулярної маси на фоні зростання вмісту білків нижчої молекулярної маси; зростання активності протеолітичних ферментів в досліджуваному органі. За умов гострої токсичності, індукованої введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*, спостерігається зростання відносного вмісту молекул середньої маси в печінці; значна активація протеолітичних процесів в досліджуваному органі; характер цих процесів відрізняється в залежності від отрути: вплив отрути *Vipera berus nikolskii* має більш виражений характер в бік зростання вмісту металоматриксних протеїназ, що свідчить про більш агресивний влив цієї отрути в порівнянні з отрутою *Vipera berus berus*. Зростання вмісту ММП-1, -2, -3 та -8 у клітинах печінки щурів є сигналом до підвищення протеолітичної активності металопротеїназ для запобігання розвитку фіброзу печінки за впливу отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*.

Таким чином, проведенні дослідження печінки тварин контрольної групи показали, що орган має типову будову, яка характерна для даного виду тварин.

За умов впливу отрути гадюки степової мікроскопічно спостерігаються альтеративні зміни паренхіми печінки та судинні розлади. Встановлено появу осередків лейкоцитарної інфільтрації, що вказує на розвиток запальних процесів, виявляються в складі часточок багато двоядерних гепатоцитів, як пристосувально-компенсаторна реакція органу, також відзначаються нерівномірно та локально різко розширені синусоїдні гемокапіляри із сладж-ефектом еритроцитів.

За умов впливу отрути гадюки Нікольського встановлено більш значні деструктивні зміни структурних елементів печінки і ланок судинного русла, що підтверджується зокрема достовірною динамікою змін морфометричних показників. Відзначається розширення і кровонаповнення судин, формування тромбів, крововиливи, деструкція стінки гемокапілярів. Активація макрофагів

поєднується з лейкоцитарною інфільтрацією переважно ділянок тріад та локально в перипортальних ділянках печінкових часточок. Порушення часточково-балкової будови органу супроводжується гідропічною дистрофією гепатоцитів, а також значним зниженням в них вмісту сукценатдегідрогенази та глікогену.

Потенційний вплив зміїних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* на стан білкового метаболізму тканини печінки викликає суттєвий зсув процесів протеолізу в даному органі, з появою нетипових білкових молекул різного ступеня організації, таких як білки, пептиди. Компоненти досліджуваних зміїних отрут мають прямий або опосередкований вплив на компоненти системи протеолізу та можуть призводити до запуску неконтрольованих та фізіологічно нетипових сигнальних шляхів та біохімічних реакцій, в яких ключовими агентами будуть відігравати як патологічне підвищення активності та вмісту окремих компонентів протеолітичної системи даного органу, так і фізіологічно нетипові білкові молекули, що з'являються в даному органі за дії досліджуваних зміїних отрут. Це все, в свою чергу провокує появу та прогресування різноманітних патологічних станів як досліджуваного органу, так і організму в цілому.

**Ключові слова:** печінка, отрута змій, металопротеїнази, білковий профіль, ядерно-цитоплазматичний індекс, некроз, крововилив.

## ANNOTATION

*Turbal L. V.* Morphological and biochemical changes in the liver of rats under the influence of venom of snakes of the species Vipera berus. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in knowledge 22 "Health care" in the speciality 222 "Medicine". – Bogomolets National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation presents a theoretical generalisation and a new solution to the scientific and practical problem of determining the features of morphological and

biochemical changes in the liver under the influence of the venom of snakes of the species Vipera berus, reflecting the state of hepatocytes.

The dissertation research was carried out in accordance with the National Medical University's scientific research plans. It is a fragment of the research work of the Department of Histology and Embryology "To study tissue reactions of different parts of the nervous system and internal organs to lesions of various genesis, and their modulation. Pedagogical aspects of teaching histology" (state registration number 0123U101216).

The experiment was conducted on 50 white outbred male rats obtained from the vivarium of the Taras Shevchenko National University of Kyiv. During the study, the experimental animals were divided into a control group and two experimental groups: rats that were injected intraperitoneally with the venom of the viper Vipera berus berus at the appropriate dose of $LD_{50}$ and rats that were injected intraperitoneally with the venom of the viper Vipera berus nikolskii in the proper dose of $LD_{50}$.

The choice of dose was due to previous studies in which the toxic doses of the venoms of the common vipers Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii were established.

For histological examination, pieces of liver were taken from pre-weighed animals of all groups and studied using light and electron microscopy methods. Liver homogenates and blood samples from experimental rats were used for biochemical and laboratory studies.

Light microscopy of the liver of rats of the control group revealed that loose fibrous connective tissue is well developed in the portal tract but poorly expressed between the lobules. The lobes have an irregular, hexagonal shape, and the borders do not have a precise contour. Hepatocytes are polygonal in shape with oxyphilic cytoplasm, with one, sometimes two, light nuclei. Single stellate macrophages are found in the sinusoid wall, and single Ito cells are found in the perisinusoidal space. Hepatic triads are localised in the corners of the hepatic lobule; the lumen of the interlobular vein is wide; smooth myocytes are present in the wall of the interlobular

artery in the middle membrane. A single-layered cubic epithelium forms the wall of the interlobular bile duct. In addition to triads, lymphatic vessels are found at the corners of the lobule. The precipitation of nitro-blue tetrazole in the form of blue diformazane granules indicates the presence of succinate dehydrogenase. In the cytoplasm of hepatocytes, there is a lot of gunpowder-amorphous material, and there are no large granules of dye precipitate and diformazan granules, which are evenly distributed throughout the entire area of the classic lobule. Glycogen accumulates evenly in the cytoplasm of cells in the form of large and small lumps of pinkish-red colour. In the periportal and centrilobular areas of the hepatic lobules, a weak or negative reaction of CD86+ antigen expression was observed. Between the typical hepatic beams are lumens of sinusoidal hemocapillaries, in the wall of which the bodies of CD86+ cells with a characteristic light brown cytoplasm and well-developed processes are localised.

Histological studies of the liver of rats with the bite of a steppe viper showed the manifestation of reactive alternative changes in the stroma and parenchyma of the organ; disorders of sinusoidal hemocapillaries, the lumens of which are unevenly dilated, full-blooded with stasis of erythrocytes, few lymphocytes are noted; in the connective tissue around the triads, leukocyte infiltration; in the lumen of the blood-filled interlobular veins, stasis and folding of erythrocytes. The arrangement of hepatocytes in the form of hepatic plates is preserved; periportal, centrilobular areas of cell lobules with pycnotic nuclei and intensely basophilic cytoplasm, especially in periportal regions; in the Disse space, an increase in the population of Kupffer cells. There is an uneven activity of succinate dehydrogenase in the lobules; Hepatocytes with moderate enzyme activity stains intensively are characterised by large diformazan granules and powder-amorphous precipitate and are located mainly in the peripheral areas of the lobule. In the centrilobular zone, hepatocytes are low-stained, indicating a decrease in succinate dehydrogenase in the cytoplasm of cells. In most hepatocytes, the accumulation of pinkish-red glycogen granules is peripheral, with part of the cytoplasm freed from its contents and having an oxyphilic colour, individual cells with a typical localisation of this trophic compound.

Populations of $CD86^+$ cells are found in different parts of the hepatic lobule; most of them have a light brown or brown cytoplasm with numerous processes that lie along the lumen of the sinusoid, sometimes found in perisinusoidal spaces. Degree, the expression of the transmembrane glycoprotein $CD86^+$ is low, but compared with the intact group of animals, it is more intense. An increase in the population of CD86+ cells indicates reactive inflammatory processes.

Microscopic studies of the liver of animals with the bite of Nikolsky's viper have established significant dystrophic and inflammatory changes in the parenchyma of the organ in comparison with previous groups of animals. There is damage to the lobular structure of the liver and a violation of the cytoarchitectonics of the classical hepatic lobules; significant foci of chaotic arrangement of hepatocytes with loss of typical beam structure. Most hepatocytes have dystrophic changes, especially in the centrilobular areas, manifested by local phenomena of hydropic dystrophy. Most sinusoids are blood-filled, with red blood cell coupling and the beginning of blood clot formation. Some hemocapillaries have significantly dilated lumens and damaged endothelium. The integrity of the structure of the central vein wall is lost, and its thinning and fragmentation are revealed. Significant lymphohistiocytic infiltrates; focal accumulations in areas of the portal tracts; lymphocytes along the hepatic beams in sinusoidal capillaries; congestion in blood vessels with the formation of blood clots. The wall of the interlobular bile duct has indistinct contours and oedema of the amorphous component of the loose connective tissue of the triads. Histochemical examination of succinate dehydrogenase showed a significant decrease in the enzyme. In the cytoplasm of individual hepatocytes, there are few large granules, and in the vast majority of cells, there is a locally located powder-amorphous precipitate of diformazan. These changes indicate a violation of the glycolysis process in cells. Histochemical study of glycogen in hepatocytes showed a low content of this trophic compound. In the cytoplasm of hepatocytes, local small granules are located along the edge of the plasmalemma. A lack of glycogen characterised single cells. Over the entire area of the hepatic lobules, intensely stained $CD86^+$ cells are found. Such an increase in their population

in sinusoids and the highest degree of exposure to $CD86^+$ indicates significant inflammatory reactions caused by the effect of Nikolsky's viper venom on the organ. The cytoplasm of $CD86^+$ cells is intensely brown, indicating the fixation of secondary antibodies. Their processes are numerous; locally, they filled the lumen of the sinusoidal hemocapillaries, and in some areas, penetration was noted processes into the lumen of Disse. When stained with hematoxylin Mayr, hepatocytes of the hepatic beams with significant destructive changes: enlightened vacuolated cytoplasm and pycnotization of nuclei; the lumens of the sinusoids are significantly dilated or collapsed; The architectonics of the hepatic lobules is disturbed.

During the biochemical study of the blood and homogenates of the liver of rats under the influence of Vipera berus poison, it was found that the introduction of poison leads to a decrease in the total protein content in the organ under study. Changes in the content of protein fractions of different molecular weights were observed; in particular, the content of proteins of higher molecular weight decreased against the background of an increase in the content of proteins of lower molecular weight, an increase in the activity of proteolytic enzymes in the organ under study. Under conditions of acute toxicity induced by the administration of *venom Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii*, there is an increase in the relative content of medium-weight molecules in the liver, significant activation of proteolytic processes in the organ under study. The nature of these processes differs depending on the poison: exposure to *Vipera berus nikolskii* venom has a more pronounced character towards an increase in the content of metallomatrix proteinases, which indicates a more aggressive effect of this poison compared to the venom *of Vipera berus berus*. An increase in the content of MMP-1, -2, -3 and -8 in rat liver tissues is a signal to increase the proteolytic activity of metalloproteinases to prevent the development of liver fibrosis under the influence *of Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii poisons.*

Thus, studies of the livers of animals in the control group showed that these organs have a typical structure characteristic of this type of animal.

Under conditions of exposure to the venom of the steppe viper, alterative changes in the liver parenchyma and vascular disorders are microscopically observed. The appearance of foci of leukocyte infiltration was established, which indicates the development of inflammatory processes. Many dinuclear hepatocytes are found in the lobules as an adaptive-compensatory reaction of the organ. Evenly and locally sharply dilated sinusoidal hemocapillaries with the sludge effect of erythrocytes are also noted.

Under the influence of Nikolsky's viper venom, more significant destructive changes in the structural elements of the liver and links of the vascular bed were established, which is confirmed, in particular, by the reliable dynamics of changes in morphometric indicators. There is dilation and blood filling of blood vessels, the formation of blood clots, haemorrhages, and destruction of the hemocapillary wall. The activation of macrophages is associated with leukocyte infiltration, mainly in triad regions and locally in the periportal areas of the hepatic lobules. Violation of the lobular-beam structure of the organ is accompanied by hydropic dystrophy of hepatocytes, as well as a significant decrease in the content of succinate dehydrogenase and glycogen in them.

Electron microscopic examination of the liver of rats in the control group revealed that hepatocytes include round, large nuclei, which contain mainly electron-bright euchromatin, and small clumps of heterochromatin are detected singly. The karyolemma of the cells is contoured, smooth, without invaginations, with numerous nuclear pores. The cytoplasm is of moderate electron density with well-developed organelles of the synthetic apparatus. The plasmalemma of hepatocytes are clear, forming microvilli in the vascular surface; desmosomes and dense closing contacts are detected in the contact surfaces and the areas of bile capillaries. The lumens of bile capillaries are moderate, with well-defined microvilli. Kupffer cells are localised in the space of Disse, and Ito cells are found singly. Sinusoidal hemocapillaries contain endothelial cells. The lumen of blood capillaries is narrow, containing formed blood elements.

Under the action of the poison of the steppe viper, electron microscopic examination of the liver showed significant changes in the ultrastructure of the parenchymal and vascular components. Bile capillaries are poorly contoured and have few microvilli. The perinuclear space is locally expanded. Functional tension in the organ under the toxic action of the poison of the steppe viper is accompanied by heterogeneity of hepatocytes. The appearance of numerous “dark” cells is determined, in which the cytoplasm contains poorly developed organelles of the synthetic and energy apparatus, which are largely destructured. The number of osmiophilic primary lysosomes, secondary phagosomes and peroxisomes increases. The content of finely dispersed, osmiophilic inclusions of glycogen decreases. “Light” hepatocytes, which contained sharply electron-bright hyaloplasm and single membrane organelles, were detected and indistinct and fragmented. The hemotoxic effect of the venom of the steppe viper caused an increase in the number of Kupffer cells, which lost their connection with the endothelium and migrated into the perisinusoidal space. The number of pit cells in the perisinusoidal space of Disse increased as a manifestation of protective immune reactions. Ito cells with inclusions of lipid granules in the cytoplasm were also identified. Dyscirculatory changes in the organ were noted: narrowed or predominantly dilated sinusoidal hemocapillaries with erythrocytes, platelets, and leukocytes. The capillary wall is vaguely contoured, and the basement membrane is discontinuous with wide pores and is absent in significant areas. It often forms osmiophilic homogeneous stripes. Endothelial cells had local oedema of the cytoplasmic regions, and the lumenal surface of the plasmalemma was also vaguely structured.

Electron microscopic examination of rat livers exposed to Nikolsky's poison revealed that the degree of destructive changes in the vascular and parenchymal components of the organ was greater. The number of "dark" cells increased, the karyo- and hyaloplasm of which had increased osmiophilia, and the organelles were destructured and homogeneous. Lysosomes in the cytoplasm were numerous and electron-dense. "Light" hepatocytes were also detected, the cytoplasm having low electron density with single fragmented organelles and large osmiophilic

phagosomes. Significant reactive changes were also observed in the hemocapillaries of the organ under the influence of hemotoxin. Microvessels rarely had a narrowed lumen and were mostly full-blooded, with stasis and sludge of erythrocytes in their lumen, neutrophilic granulocytes, and lymphocytes. The wall is damaged, the cytoplasm of the endothelium is compacted, forming osmiophilic stripes, and the nuclei of endothelial cells are small and elongated, with an indistinct karyolemma and heterochromatin over the entire area of the karyoplasm. Also, in the centrilobular areas, hemocapillaries with a wide lumen, a destructured wall were detected, in which the cytoplasm was locally intensely swollen and protruded into the lumen of the hemocapillaries in the form of shovel-shaped formations. Pit cells are determined in the space of Disse. The course of inflammatory processes in the liver is also manifested by an increase in the number of active macrophage Kupffer cells, which lost contact with the endothelium and moved into the perisinusoidal space of Disse and were characterised ultrastructurally by the presence in their cytoplasm of numerous osmiophilic small primary lysosomes and secondary, voluminous phagosomes.

The potential impact of snake venoms *Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii* on the state of protein metabolism of liver tissue causes a significant shift in proteolysis processes in this organ, with the appearance of atypical protein molecules of varying degrees of organisation, such as proteins, peptides. The components of the studied snake venoms have a direct or indirect effect on the elements of the proteolysis system. They can lead to the launch of uncontrolled and physiologically atypical signalling pathways and biochemical reactions, in which the key agents will be both a pathological increase in the activity and content of individual components of the proteolytic system of a given organ, as well as physiologically atypical protein molecules that appear in this organ under the action of the snake venoms under study. All this, in turn, provokes the appearance and progression of various pathological conditions of both the organ under study and the body as a whole.

**Keywords:** liver, snake venom, metalloproteinases, protein profile, nuclear-cytoplasmic index, necrosis, haemorrhage.

**Список публікацій здобувача за темою дисертації**

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Tetiana Halenova, Aleksandr Mudrak, Inna Slyeptsova… & Savchuk Olexiy (2022). Influence of Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii venom on protein-peptide profile in the liver, kidneys and small intestine of rats. *Current Topics in Peptide & Protein Research,* 23, 63-72. https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85150524412&origin=inward&txGid=8afab279052d5ea4c982f449fc4370a5

2. Turbal, L. V., Yaremenko, L. M., & Maievskyi, O. Y. (2023). Histological changes in the liver of rats under the influence of Vipera berus berus venom. *Reports of Morphology*, 29(4), 58-63. https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(4)-08

3. Turbal, L. V. (2024). Peculiarities of microscopic and histochemical changes in the structure of the liver of experimental rats under the influence of viper venom Vipera berus nikolskii. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 28(2), 204-209. https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28(2)-04

4. Turbal, L.V. (2025). Ultrastructural changes in the liver of rats under the action of vipera berus berus venom. *«Перспективи та інновації науки» (Серія «Медицина»)*, 1(47), 2006-2017. https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-1(47)-2006-2017

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

5. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2023). *Вплив отрути змій виду Vipera berus на морфофункціональні зміни печінки*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «МОРФОГЕНЕЗ ТА

РЕГЕНЕРАЦІЯ» (ІІІ ЖУТАЄВСЬКІ ЧИТАННЯ”, Полтава, 20–21 квітня 2023 року – Полтава – С. 80–81.

6. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2023). *Біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути гадюк виду Vipera berus*. Збірник наукових праць: XIX Наукова - конференція “Львівські хімічні читання – 2023”, Львів, 29–31 травня 2023 року – Львів: Видавництво від А до Я, 2023. – 254 с. (стор. 183). Львів.

7. Турбал Л.В., Маєвський Є.О., Яременко Л.М. & Коновалова Л.В. (2023). *Вплив отрути гадюки звичайної на мікроскопічний стан печінки лабораторних тварин в експерименті*. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій пам’яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю.Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці», Київ, 8-9 червня, 2023 року – Київ. – С. 143–144.

8. Турбал Л.В. (2024). *Вплив отрути гадюки Нікольського на мікроскопічний стан печінки щурів.* Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «МОРФОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ» (IV ЖУТАЄВСЬКІ ЧИТАННЯ”, Полтава, 18–19 квітня 2024 року – Полтава – С. 93–95.

9. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2024). *Гістологічні дослідження структурних компонентів печінки щурів при дії отрути гадюк виду Vipera berus.* Збірник тез науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» до 70-річного ювілею професора кафедри гістології, цитології та ембріології, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Олександра Дмитровича ЛУЦИКА, Львів, 10 травня 2024 року – Львів: – С. 144–146.

10. Турбал Л.В., Маєвський Є.О., Яременко Л.М. & Коновалова Л.В. (2024). *Вплив отрути гадюк виду Vipera berus на морфологічні зміни печінки щурів.* Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання морфології», присвяченої 100-

річчю від дня народження Лева Михайловича ЛИЧКОВСЬКОГО, Львів, 17 травня, 2024 року – Львів. – С. 221–222.

11. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2024). *Гістохімічні дослідження структурних компонентів печінки лабораторних тварин при дії отрути гадюки Нікольського*. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій 100 – річчю професора К.С. Кабака «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці», Київ, 13-14 червня, 2024 року – Київ. – С.77.

**ЗМІСТ**


стор.

**АНОТАЦІЯ** 2

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ** 22

**ВСТУП** 24

**РОЗДІЛ 1 ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ТОКСИНІВ ТВАРИННИХ ОТРУТ, В ТОМУ ЧИСЛІ ГАДЮК, НА ГІСТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)** 31

1.1 Загальні відомості щодо складу, біологічних ефектів токсинів тваринних отрут, в тому числі гадюк, на структурно-функціональні показники тканини печінки 31

1.2. Закономірності перебігу окисно-відновних процесів в тканині печінки та роль вільнорадикального пошкодження органу при впливі чинників різного генезу 42

**РОЗДІЛ 2 ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА Й ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ** 55

2.1. Загальна методика і об’єкти дослідження 55

2.2. Методи дослідження 56

2.2.1. Біохімічні і лабораторні 56

2.2.2. Гістологічні 66

2.2.3. Імуногістохімічні 66

2.2.4. Електронно-мікроскопічні. 67

2.2.5. Статистичного аналізу. 67

**РОЗДІЛ 3 БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS** 68

**РОЗДІЛ 4 МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS** 85

4.1 Морфологічна характеристика печінки щурів контрольної групи тварин 85

4.2. Морфологічна характеристика печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus berus* 90

4.3. Морфологічна характеристика печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus nikolskii* 96

**РОЗДІЛ 5 ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS** 104

5.1. Електронно-мікроскопічна характеристика печінки щурів контрольної групи тварин 104

5.2. Ультрамікроскопічні зміни печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus berus* 107

5.3. Ультрамікроскопічні зміни печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus nikolskii* 113

**АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ** 121

**ВИСНОВКИ** 130

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ** 133

**ДОДАТКИ** 167

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

АДФ – аденозиндифосфат

АМРА – асиметричний диметиларгінін

АФК – активні форми кисню

ГЦК – гепатоцелюлярна карцинома

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДСН – додецилсульфат натрію

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕПС – ендоплазматична сітка

ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності

МАТ – S-аденозилметіонінсинтетаза

МДА – малоновий діальдегід

МСМ – молекули середньої маси

НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки

OPD – о-фенілендиамін

ОС – окисний стрес

ПААГ – поліакриламідний гель

ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

СРБ – С-реактивний білок

ТМБ – тетраметилбензидин

ТХО – трихлороцтова кислота

ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень

ЦД – цукровий діабет

ЦП – цироз печінки

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

BHMT – бетаїн-гомоцистеїн-S-метилтрансфераза

CBS – цистатіонін β-синтаза

CSE – цистатіонін γ-ліаза

GP – глутатіон пероксидаза

$H_2S$ – гідроген сульфід

HMGR – гідроксиметилглутирил-КоА-редуктаза

MAPK – мітогенактивована протеїнкіназа

MMP – матриксні металопротеїнази

MS – метіоніносинтаза

MTHFR – метилентетрагідрофолатредуктаза

NF-kβ – некротичний фактор капа-β

NMDA – N-метил-D-аспартат

NO – оксид азоту

NOS – синтаза оксиду азоту

PMSF – фенілметилсульфонілфторид

SAH – S-аденозилгомоцистеїн

SAHH – S-аденозилгомоцистеїнгідролаза

SAM – S-аденозилметіонін

SDH – сукцинатдегідрогеназа

SOD – супероксиддисмутаза

TGFβ – трансформуючий фактор росту β

TIMP – тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ

TNF-α – туморонекротичний фактор α

# ВСТУП

**Актуальність теми** зумовлена широкою присутністю отруйних тварин, що часто призводить до прямого контакту людини з ними, а це, в свою чергу - до отруєнь, важких травм та смертельних випадків. Щороку реєструють близько 1,8-2,7 млн випадків зміїних укусів, що призводять до 81 000 – 138 000 смертей постраждалих, а у 100 000 з них характерним є розвиток незворотних фізичних чи психічних порушень. Широка розповсюдженість і значний відсоток летальності зумовлюють зростання уваги наукової спільноти до даної проблеми [48, 113, 114, 132, 154].

Оскільки одними з найбільш поширених отруйних тварин в світі та на території України є змії і гадюки, слід більш ретельно дослідити основні токсичні сполуки їх отрут, особливості впливу на структуру, функції органів і систем [24, 54, 60]. Серед значної чисельності активних речовин отрути змій та гадюк головну роль все ж відводять ферментам. До останніх належать гіалуронідаза, фосфоліпаза $A_2$ ($PLA_2$), нуклеотидаза, фосфодіесераза, дезокси- і рибонуклеази, оксидази L-амінокислот (LAAOs), серинові протеази (SPs), металопротеази (SV-MMP), тощо [169, 171, 223, 235, 238, 255]. Важливими складовими отрути змій і гадюк, є також білки зі спеціальними властивостями, зокрема фактор росту нервових клітин, антикомплементарний фактор [131, 168, 175, 216]. Певні токсини змій і гадюк, які мають в складі $PLA_2$ чинять гемолітичний, кардіо-, цитотоксичний ефекти [106, 166]. При цьому цитотоксичність є можливою внаслідок структурних змін плазматичних мембран клітин органів-мішеней [81, 121, 128, 218].

В даний час проводяться дослідження, присвячені біологічній активності специфічних компонентів отрути змій і гадюк, а також їх спорідненості з певними тканинами і органами. Дослідження показали, що ці токсичні речовини можуть спричиняти широкий спектр шкідливих впливів на життєво важливі системи, що призводить до пошкодження, серед іншого, легень, серця, нирок і скелетних м’язів [120, 145, 183, 207, 229]. Однак бракує обширних експериментальних досліджень того, як отрута різних видів змій

(гадюк) впливає на морфологічні та функціональні зміни в печінці. Загальновідомо, що печінка відіграє вирішальну роль у детоксикації як екзогенних, так і ендогенних токсинів. У сучасному світі люди постійно піддаються впливу токсичних речовин з різних джерел, і здатність печінки ефективно переробляти ці токсини життєво важлива для виживання та підтримки стабільного гомеостазу. Тим не менш, під час метаболізму багатьох ксенобіотиків, включаючи отрути тваринного походження, можуть відбуватися незворотні зміни в гістологічній структурі та біохімічних процесах у клітинах печінки, що в кінцевому підсумку призводить до функціонального порушення печінки, а у важких випадках – до токсичного некрозу (за рахунок утворення токсичних метаболітів під час детоксикації, які можуть пошкодити молекулярні компоненти гепатоцитів, що призводить до загибелі клітин) [156].

Існуючі наукові дослідження задокументували випадки пошкодження серцево-судинної, дихальної, видільної, ендокринної та системи згортання крові через вплив отрути змій. Незважаючи на ці відомості про гепатотоксичність, пов’язану з компонентами отрути, це питання залишається відкритим. Таким чином, ретельне дослідження гістологічних, біохімічних і гістохімічних змін печінки внаслідок дії шкідливих факторів, включаючи токсини отрут змій, є нагальною необхідністю.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційне дослідження здійснене відповідно до планів наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця і є фрагментом науково-дослідних роботи кафедри гістології та ембріології "Вивчити тканинні реакції різних відділів нервової системи та внутрішніх органів на ураження різного ґенезу, та їх модуляцію. Педагогічні аспекти викладання гістології» (номер державної реєстрації 0123U101216).

**Мета дослідження** – визначення особливості морфологічних та біохімічних змін печінки за умов впливу отрути змій виду Vipera berus, що відображають стан гепатоцитів.

**Завдання** дослідження:

1. Виявити структурні ознаки пошкодження печінки щурів за умови впливу отрути змій виду Vipera berus.

2. Визначити зміни імуно, та - гістохімічних маркерів, що відображають ураження печінки щурів при впливі отрути змій виду Vipera berus.

3. Встановити ультраструктурні зміни в печінці щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus.

4. Визначити зміни біохімічних показників, що відображають ураження печінки щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus.

*Об'єкт дослідження* – морфо-функціональні зміни в печінці щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus.

*Предмет дослідження* – гістологічні, ультраструктурні, імуногістохімічні та біохімічні зміни печінки щурів при впливі отрути змій виду Vipera berus.

*Методи дослідження:* гістологічний – для вивчення змін мікроструктури структурних елементів печінки; електронно-мікроскопічний – для вивчення змін ультраструктури складових елементів печінки; біохімічний – для визначення зміни маркерів, що відображають ураження печінки щурів; імуногістохімічний – для визначення змін експресії маркерів, що відображають ураження печінки; математичної статистики – для оцінки залежності змін між біохімічними параметрами та структурними змінами печінки щурів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В ході проведеного дослідження вперше встановлені ***гістологічні*** (у тварин, що піддавались дії отрути Vipera berus berus – порушення синусоїдних гемокапілярів з нерівномірно розширеними просвітами та стазом еритроцитів; лімфоцитарна інфільтрація сполучної тканини навколо тріад; стаз та сладжування еритроцитів в просвіті кровонаповнених міжчасточкових вен; збільшення популяції клітин Купфера в просторі Діссе. Відзначається нерівномірна активність сукцинатдегідрогенази в часточках; в центролобулярній зоні гепатоцити із низьким ступенем забарвлення, що вказує на зниження

сукцинатдегідрогенази у цитоплазмі клітин; в більшості гепатоцитів скупчення глікогену периферійно, при цьому частина цитоплазми звільнена від вмісту та має оксифільне забарвлення; окремі клітини із типовою локалізацією даної трофічної сполуки. В різних ділянках печінкової часточки виявляються популяції $CD86^+$ клітин, які залягають вздовж просвіту синусоїда, іноді виявляються у перисинусоїдих просторах. Ступінь експресії трансмембранного глікопротеїну CD86 невисокий; збільшення популяції $CD86^+$ клітин вказує на реактивні запальні процеси. У тварин, що піддавались дії отрути Vipera berus nikolskii – значні дистрофічні і запальні зміни паренхіми печінки; спостерігається пошкодження часточкової будови і порушення цитоархітектоніки печінкових часточок, втрата типової балкової структури; гепатоцити з дистрофічними змінами, особливо у центролобулярних ділянках, що проявляється локальними явищами гідропічної дистрофії; синусоїди кровонаповнені, з явищами сладжування еритроцитів та початковим тромбоформуванням; значне розширення просвітів гемокапілярів та пошкодження ендотелію; втрата цілісності будови стінки центральної вени, її стоншення та фрагментація. Значні лімфогістіоцитарні інфільтрати; вогнищеві скупчення у ділянках потральних трактів; застійні явища у судинах із формуванням тромбів. Стінка міжчасточкової жовчної протоки з нечіткими контурами; набряк аморфного компоненту пухкої сполучної тканини тріад. При гістохімічному досліджені сукцинатдегідрогенази - значне зниження ферменту; низький вміст глікогену, поодинокі клітини характеризувалися відсутністю глікогену. По всій площі печінкових часточок виявляються інтенсивно забарвленні $CD86^+$ клітини, їх цитоплазма інтенсивно коричнева, що свідчить про фіксацію вторинних антитіл. При забарвлені гематоксиліном Майера виявлялись гепатоцити печінкових балок із значними деструктивними змінами: просвітлена вакуолізована цитоплазма та пікнотизація ядер; просвіти синусоїдів значно розширені або спалися; порушена архітектоніка печінкових часточок), ***електронно-мікроскопічні*** (значні порушення ультраструктури судинного та паренхіматозного компонентів органу. Токсичний вплив отрути, що

носить судинний генез, зумовив пряме пошкодження ультраструктури стінки судин, зокрема синусоїдів, а відтак і значну альтерацію ядер і цитоплазми гепатоцитів. Як прояв захисних механізмів органу на токсичне пошкодження зросло число активних макрофагальних клітин Купфера та pit-клітин. Встановлено, що при впливі отрути Vipera berus nikolskii на печінку щурів зміни деструктивно-денеративного характеру були значно вираженішими), ***та біохімічні*** (зниження вмісту загального білка та білкових фракцій різної молекулярної маси: знижувався вміст білків вищої молекулярної маси на фоні зростання вмісту білків нижчої молекулярної маси; зростання активності протеолітичних ферментів; зростання відносного вмісту молекул середньої маси; значна активація протеолітичних процесів в досліджуваному органі; характер цих процесів відрізняється в залежності від отрути: вплив отрути *Vipera berus nikolskii* має більш виражений характер в бік зростання вмісту металоматриксних протеїназ) зміни в структурі печінки щурів при впливі отрути *Vipera berus*.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані дані морфологічного, морфометричного та біохімічного досліджень тканини, зразків крові та гомогенату печінки щурів за умов дії отрути гадюк виду Vipera berus свідчать про розвиток негативних гістологічних та біохімічних змін структури цього органу, що зумовлює необхідність в подальшому продовження досліджень щодо використання відповідних корегуючих заходів.

Результати досліджень використовуються в лекційних курсах та в ході проведення практичних занять на кафедрах: гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувач брала участь у постановці та проведенні експериментального дослідження. Самостійно провела забір і підготовку матеріалу для гістологічного дослідження. Здобувачем особисто виконано патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури та написаний її аналітичний огляд, описані всі глави власних досліджень дисертаційної роботи, здійснено розробку основних теоретичних та практичних положень проведеного дослідження. Разом з науковими керівниками проведено аналіз отриманих результатів і сформульовані висновки. Гістологічне дослідження виконано за консультативною допомогою д.б.н., проф. З. М. Небесної (кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського). Біохімічні дослідження виконані за консультативною допомогою д.б.н, проф. О. М. Савчука (кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка). У сумісних з науковими керівниками та колегами публікаціях здобувачці належать основні результати стосовно гістологічних, морфометричних та біохімічних змін у печінці щурів за умов дії отрути гадюк виду Vipera berus.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи викладені та обговорені на: науково-практичній конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (ІІІ Жутаєвські читання)" (Полтава, 2023 р); XIX науково – практичній конференції "Львівські хімічні читання – 2023" (Львів, 2023 р); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці» (Київ, 2023 р); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (IV Жутаєвські читання)" (Полтава, 2024 р); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» (Львів, 2024 р); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання морфології» (Львів, 2024 р); всеукраїнській науково-практичній конференції з

міжнародною участю «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці» (Київ, 2024 р).

**Публікації.** Опубліковано 4 наукові статті (з яких 2 – в виданнях, що відносяться до міжнародної наукометричної бази Scopus; 1 стаття – в науковому фаховому журналі, що відноситься до міжнародної наукометричної бази Web of Science), з яких 3 статті – в наукових фахових журналах України, 2 – самостійні, а також 7 тез в матеріалах науково-практичних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 178 сторінках. Робота складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, аналітичного огляду літератури, загальної методики й основних методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, списку літературних джерел, з яких 19 викладені кирилицею і 252 – латиницею, та додатків. Дисертаційне дослідження ілюстровано 37 рисунками та 8 таблицями.

# РОЗДІЛ 1
# ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ТОКСИНІВ ТВАРИННИХ ОТРУТ, В ТОМУ ЧИСЛІ ГАДЮК, НА ГІСТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПАРАМЕТРИ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

## 1.1. Загальні відомості щодо складу, біологічних ефектів токсинів тваринних отрут, в тому числі гадюк, на структурно-функціональні показники тканини печінки.

В процесах еволюційного пристосування значна кількість як безхребетних, так і хребетних тварин набули властивостей отруйності. Отрути їх відіграють чисельні функції, забезпечуючи адаптацію, захист та необхідні для полювання на здобич і міжвидової конкуренції. Сукупність екологічних, генетичних, кліматичних та біогеографічних факторів протягом мільйонів років породили захоплюючу різноманітність їх складових токсичних компонентів, що стали ключовою ознакою даних видів тварин [40, 148, 213]. Тваринні отрути містять цілий комплекс сполук, серед яких наявні пептиди, білки, а також інші органічні молекули та солі. Токсини їх здатні викликати виражені порушення у функціонуванні фізіологічних систем, призводячи до появи патологічних станів, ускладнень, чи навіть смерті [56].

Внаслідок значного розповсюдження отруйних тварин людство перебуває з ними в постійному контакті, що часто стає причиною отруєнь, серйозних травм або летальних наслідків. Серед всієї різноманітності отруйних тварин найчастіше зустрічаються змії, гадюки, павуки та скорпіони. Згідно літературних джерел, щороку реєструють близько 1,8-2,7 млн випадків зміїних укусів, що призводять до 81 000 – 138 000 смертей постраждалих, а у 100 000 з них характерним є розвиток незворотних фізичних чи психічних порушень. Найбільш поширеними отруєння внаслідок укусів змій і гадюк є в країнах Азії,

Африки, півдня Сахари та Латинської Америки. Така широка розповсюдженість і значний відсоток летальності зумовлюють зростання уваги наукової спільноти до даної проблеми. Зокрема, ВООЗ включила отруєння внаслідок зміїних укусів до переліку занедбаних тропічних хвороб [48, 99, 104, 114, 133, 156, 175, 244]. В окремих регіонах світу актуальною проблемою охорони здоров'я є скорпіонізм, випадки якого складають до 1,2 млн за рік, що призводять до загибелі понад 3000 постраждалих [28]. Не зважаючи на досягнення у вивченні видової різноманітності отруйних тварин, їх поширеності, не вирішеною все ще залишається низка питань. Так, обмеженими є знання щодо повного переліку складових отрути багатьох їх представників. Останній факт належить до пріоритетних, оскільки вміст тваринних отрут значно варіює, що зумовлено географічними та онтогенетичними детермінантами [266]. Широка мінливість токсичних компонентів має безпосередній вплив на ефективність дії протиотрут, а, отже, на частоту розвитку важких ускладнень. Саме тому більш поглиблене вивчення зазначеної проблеми може надати цінну інформацію представникам наукової сфери та практикуючої медицини, що покращить методи лікування і профілактики отруєнь при укусах тварин [38, 63, 136, 211, 229, 245, 246, 253, 260].

За літературними даними, отруйні тварини поділяються на первинно-отруйні та вторинно-отруйні. Первинно-отруйні види продукують токсини за допомогою спеціальних залоз або ж здатні виділяти отруйні продукти їх метаболізму. Вторинно-отруйні тварини лише накопичують токсини екзогенного походження, тому отруйність властива їм, проявляється у випадку споживання їх в їжу. В наукових джерелах зазначено, що первинно-отруйні тварини класифікують на активно- та пасивно-отруйних [269]. Перші володіють спеціалізованим апаратом, що оснащений засобами для нанесення рани. В цьому випадку такі тварини ще носять назву озброєних. Зазвичай даними пристосуваннями є отруйні залози з вивідними протоками та апарат для поранення жертви, а саме – зуби змій і гадюк, жало комах, колючки та шипи риб. Активно-отруйні тварини, що не мають засобів для прямого пошкодження

належать до неозброєних. Зокрема, прикладом є амфібії і їх шкірні залози з отруйним секретом, анальні залози комах, токсичний ефект яких проявляється у випадку контакту їх з зовнішніми покривами живих організмів. В пасивно-отруйних тварин токсичні продукти обміну виробляються та накопичуються в різноманітних тканинах і органах (риби, молюски, комахи). Тому вони разом із вторинно-отруйними тваринами проявляють небезпеку лише у випадку потрапляння їх до травної системи жертви. При цьому для перших характерною видовою ознакою є постійна токсичність, а для других вона спорадична [80, 106].

Токсини тваринних отрут є структурно різноманітними, відрізняються за хімічним складом, ступенем токсичності та особливостями патогенетичного впливу на організм постраждалих. В наукових джерелах зазначено, що «отрутами» або «токсикантами» слід вважати суміші декількох відмінних за будовою сполук, які при впливі на живий організм здатні викликати значні порушення його нормальної життєдіяльності та навіть стати причиною смерті [54, 58, 64, 90]. Необхідно відмітити, що належність одних або інших речовин до переліку отрут часто є умовним. Іноді окремі сполуки не володіють ознаками токсичності, однак у випадку їх взаємодії з іншими компонентами отрути, чинять пошкоджуючий вплив. Під «токсичністю» розуміють властивість певних хімічних речовин проявляти згубну дію на живий організм. Встановлено, що чим вищою є концентрація токсичної сполуки, тим швидше настає отруєння, що має значно виражені прояви. Крім того, на ступінь токсичності впливає розчинність речовини – чим більша остання, тим вищою є токсичність. Ретельний аналіз наукової літератури показав, що у випадку дослідження тваринних отрут надзвичайно важливим є встановлення так званої смертельної дози (lethal dose – LD), що вважать кількістю речовини, яка викликає летальний наслідок в результаті потрапляння до організму. Вирізняють абсолютну та середню смертельну дози. Абсолютна смертельна доза або $LD_{100}$ є найменшою кількістю речовини, що зумовлює загибель 100 % піддослідних тварин. Середня смертельна доза або $LD_{50}$ – кількість токсичної

речовини, що призводить до смерті лише 50 % експериментальних тварин. Відповідно до останньої, отрути тваринного походження можна класифікувати на надзвичайно токсичні ($LD_{50}$ < 15 мг/кг маси тіла жертви), високо токсичні ($LD_{50}$ – 15-150 мг/кг), помірно токсичні ($LD_{50}$ – 151-1500 мг/кг) та мало токсичні ($LD_{50}$ > 1500 мг/кг) [105].

Тваринні отрути в залежності від їх хімічної структури поділяють також на сполуки білкової та небілкової природи. Подекуди зазначають, що зоотоксини також класифікують на такі, що є ксенобіотиками або чужорідними для постраждалих речовинами та ті, які за нормальних умов продукуються в організмі. Серед першої групи виділяють аліфатичні та гетероциклічні сполуки, алкалоїди, стероїди, ферменти і неферментні поліпептиди. До других зазвичай належать ацетилхолін, гістамін, адреналін, норадреналін, дофамін, похідні індола, природні ферменти та їх інгібітори. Токсична дія останніх зумовлена надмірною кількістю, яка значно перевищує фізіологічні допустимі межі діючих концентрацій [65, 199, 201, 265].

Ступінь токсичності отрути тварин визначається також шляхом її введення в живий організм. Зазвичай білкові зоотоксини змій, скорпіонів, павуків доставляються парентерально за допомогою озброєного апарату і не проявляють отруйних властивостей у випадку потрапляння в шлунково-кишковий тракт, оскільки вони руйнуються травними ферментами. Токсини ж небілкової природи здатні згубно впливати навіть при ентеральному шляху введення, наприклад, токсичні алкалоїди амфібій, риб, молюсків. Після надходження до організму постраждалих зоотоксини розподіляються нерівномірно. Важливу роль в даному випадку відіграють біологічні бар’єри, зокрема, стінки судин, плазматичні мембрани, тощо. Відомо, що в місцях укусів відбувається формування так званого депо отрути, звідки здійснюється подальше її транспортування в кровоносну і лімфатичну системи [42, 152].

Результати експериментальних досліджень доводять той факт, що залежно від механізму патологічного впливу тваринні токсини можуть класифікувати на токсини місцевої та системної дії. Місцеві проявляють свій ефект в ділянці

інокуляції отрути, а системні, дренуючись з первинного депо, потрапляють до різних органів і систем, порушуючи або втручаючись в процеси їх функціонування [55, 74, 101, 150, 182]. Однією з важливих ознак тваринних отрут є вибірковість їх дії, що полягає в можливості уражати лише окремі клітини або органи-мішені. Прикладом є нейротоксини змій, скорпіонів, що впливають на передачу нервових імпульсів в синапсах або ж на потенціал-залежні $Na^+$ і $K^+$-канали; гемотоксини гадюк та гримучих змій, що проявляють дію відносно ланок коагуляційної системи, тощо [21, 115, 190, 191].

Тваринні отрути білкової природи є зазвичай нативними отрутами, що містять в структурі пептиди, мінорні білкові компоненти та цілий ряд органічних і неорганічних сполук, які в сукупності визначають фізіологічну активність, і характер токсичної дії [31, 44, 47, 72, 164, 200, 226]. Згідно даних наукових джерел, отрути білкового походження класифікують відповідно до виду тварин, що їх продукують, характеризуючи при цьому найбільш значимі токсичні компоненти. Оскільки одними з найбільш поширених отруйних тварин в світі та на території України є змії і гадюки, слід більш ретельно досліджувати основні токсичні сполуки їх отрут, особливості впливу на структуру, функції вітальних органів, і систем [24, 53, 60, 97]. Серед значної чисельності активних речовин отрути змій та гадюк головну роль все ж відводять ферментам. До останніх належать гіалуронідаза, фосфоліпаза $A_2$ ($PLA_2$), нуклеотидаза, фосфодіестераза, дезокси- і рибонуклеази, оксидази L-амінокислот (LAAOs), серинові протеази (SPs), металопротеази (SV-MMP), тощо [50, 69, 111, 171, 174, 216, 225, 237, 243, 259, 262]. Важливими складовими отрути змій і гадюк є також білки зі спеціальними властивостями, зокрема фактор росту нервових клітин, антикомплементарний фактор [87, 132, 170, 177, 218]. Відповідно до характеру впливу їх токсинів на живі організми виділяють дві основні групи – нейротоксичні та гемовазотоксичні отрути. Доведеним є той факт, що переважна більшість сполук отрути кобр, мамб, бунгарусів та морських змій володіють нейротоксичною дією та поділяються на пост- і пресинаптичні нейротоксини [195, 196, 209, 210, 255]. Залежно від хімічної

будови постсинаптичні токсини змій і гадюк поділяють на коротколанцюгові, що мають в основі 60-62 амінокислотних залишків, і 4 дисульфідних містка, а також довголанцюгові. Останні містять 71-74 амінокислотних залишків та 5 дисульфідних містків. Пресинаптичні нейротоксини характеризуються менш однорідною будовою та незначно вираженою вибірковістю дії. Окремі з них, а саме тайпоксин, бунгаротоксин проявляють також фосфоліпазну активність та зумовлюють розвиток специфічних змін у процесах вивільнення нейромедіаторів та проведення нервових імпульсів. Експериментальні дослідження останніх років демонструють, що певні токсини змій і гадюк, які мають в складі $PLA_2$ чинять гемолітичний, кардіо-, цитотоксичний ефекти [22, 25, 45, 46, 108, 169, 253]. При цьому цитотоксичність є можливою внаслідок структурних змін плазматичних мембран клітин таргетних тканини і органів [59, 81, 123, 129, 144, 220].

Гемотоксини отрути гадюк і змій представлені переважно двома групами ферментів – SPs та SV-MMP [124, 130, 155, 160, 168, 238]. Перші являють собою термолабільні ендопептидази та за механізмом дії є схожими до тромбіноподібних ферментів і кініногеназ. ММР проявляють протеолітичну активність у відношенні компонентів базальних мембран та здатні руйнувати структури позаклітинниго матриксу [41, 49, 61, 86, 100, 179, 221, 224]. Обидва види гемотоксинів порушують процеси згортання крові і фібринолізу, призводячи до тромбоемболій чи геморагій. Вони діють на різні ланцюги каскаду коагуляційної системи. Цікавим є те, що на початку їх впливу спостерігають розвиток внутрішньосудинного згортання крові, згодом навпаки характерною є поява кровотеч [85, 116, 143, 197, 215]. Повідомляють також, що отруєння внаслідок укусів гадюк супроводжуються геморагічним набряком внаслідок руйнування стінок судин протеолітичними ферментами [27, 57, 193].

Розповсюдженими наразі є дослідження щодо вивчення такої групи білкових токсинів змій і гадюк, як дезінтегрини. Вони є поліпептидними цистеїн-збагаченими сполуками, що модулюють клітинну адгезію, міграцію, апоптоз, агрегацію тромбоцитів, ангіогенез. В своїй структурі дезінтегрини

містять інтегрин-розпізнавальні мотиви – RGD, WGD, VGD, MGD, RTS, KTS та поділяються на декілька груп. Одна з переважаючих груп представлена коротколанцюговими молекулами, що складаються з 41-51 амінокислотних залишків та стабілізовані 4 цистеїновими містками. Друга за чисельністю група включає дезінтегрини з 70 амінокислотними залишками та 6 цистеїновими містками. Представники третього виду даних токсинів містять в своїй структурі близько 84 амінокислотних залишки та 7 цистеїнових містків. Четверта група являє собою макромолекулярні комплекси з ідентичною (гомодимери) чи відмінною (гетеродимери) послідовністю впорядкування мономерів в поліпептидному ланцюгу. Останній, як правило, складається з 67 амінокислотних залишків. В основі таких комплексів наявні 10 молекул цистеїну, що беруть участь в утворенні внутрішньоланцюгових та міжланцюгових містків. Більшість мономерних дезінтегринів містять мотиви RGD, KGD, MVD, MGD, WGD та проявляють антагоністичну активність у відношенні таких інтегринів, як αIIbβ3 (рецептори фібриногену), αvβ3 (рецептори вітронектину), α5β1 (рецептори фібронектину). Деякі RGD інгібують α3β1, α6β1 і α7β1 рецептори ламініну, впливаючи на міграцію нейтрофілів, функціональну активність скелетних м’язів, стимулюють розвиток злоякісних новоутворень. MLD-вмісні дезінтегрини, взаємодіючи з α4β1, α4β7 та α9β1 лімфоцитів, змінюють особливості їх нормальної діяльності. Види зазначених токсинів, що мають послідовності KTS / RTS виступають в ролі селективних інгібіторів рецептора колагену α1β1 [31, 60, 126, 128, 131, 132].

Доволі поширеними компонентами отрути змій та гадюк є так звані трьохпетельні токсини – 3FTXs. В основі будови їх вирізняють 60-74 амінокислотних залишки і 4-5 дисульфідних містків. В дослідах було показано, що ці токсини мають широкий спектр молекулярних мішеней, а саме нікотинові та мускаринові ацетилхолінові рецептори, кальцієві канали L-типу. Тому прийнято вважати, що при впливі отрути змій, що містить 3FTXs можливим є розвиток значної різноманітності біологічних ефектів. Так, кальцисептин, що був отриманий з отрути чорної мамби (Dendroaspis polylepis polylepis) є

блокатором $Ca^{2+}$-каналів L-типу та проявляє вазорелаксуючу і гіпотензивну дії. Мускариновий токсин α (МТα) – потужний антагоніст адренорецептора α2B, що перешкоджає констрикції кровоносних судин, а, отже, знижує артеріальний тиск. Деякі 3FTXs, що наявні в отруті Naja kaouthia пригнічують агрегацію тромбоцитів, діючи через рецептори АДФ, розміщені на поверхні плазмолеми кров'яних пластинок [146, 169].

На сьогоднішній день в наукометричних базах даних наявні окремі дослідження щодо біологічної активності тих, чи інших компонентів отрути змій і гадюк, особливостей тропності їх до певних тканин і органів. Встановлено, що токсичні речовини їх проявляють широкий спектр патологічних ефектів у відношенні більшості життєво важливих систем, зумовлюючи ураження легень, серця, нирок, скелетних м'язів, тощо [36, 62, 121, 146, 151, 185, 210, 231, 251]. Однак наразі надто лімітованою є кількість експериментальних робіт щодо впливу отрути різних видів змій і гадюк на морфо-функціональні зміни печінки. Беззаперечним є той факт, що саме печінка займає одне з головних місць в процесах детоксикації екзогенних та ендогенних токсичних сполук. В сучасних умовах існування світу, організм людини перебуває в постійному контакті з токсикантами різноманітного походження, а здатність печінки до їх швидкої утилізації визначає певним чином спроможність до виживання та підтримання на відносно постійному рівні параметрів гомеостазу. Проте, в ході метаболізму багатьох ксенобіотиків, в тому числі отрут тваринного походження, можливими є незворотні зміни особливостей гістологічної організації та перебігу біохімічних процесів в клітинах печінки, що в кінцевому рахунку призводить до її дисфункції в цілому, а у важких випадках до розвитку токсичного некрозу. Науковці припускають, що зазначений стан виникає внаслідок формування токсичних метаболітів під час детоксикації, які згубно діють на молекулярні структури гепатоцитів, зумовлюючи їх загибель [158].

Asmari A. K. та ін. [32] досліджували серологічні маркери гострої гепатотоксичності, спричиненої дією отрути змій Echys pyramidum у щурів.

Через 3-6 годин після інтраперитонеального введення її дослідним тваринам виявляли виражені зміни функціональної активності органу. Зокрема, реєстрували зростання в сироватці крові рівнів АЛТ, лужної фосфатази, гамаглутамілтранспептидази (GGT) та білірубіну. Ураження печінки супроводжувалось значним і дозозалежним зниженням активності ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ), а саме супероксиддисмутази (SOD) і каталази (CAT) в тканині печінки. Авторами повідомлялось про активацію перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) внаслідок генерації значної кількості активних форм кисню (АФК), що призводило до апоптозу гепатоцитів. Крім того, характерним було зростання маркерів окисного стресу (ОС), активності цитоплазматичних, лізосомальних та позаклітинних матрикс-деградуючих ферментів, рівнів прозапальних медіаторів.

За даними окремих досліджень, токсини гадюк Crotalus durissus terrificus спричиняють розвиток гострого ураження печінки. Введення її щурам в дозі 100 мг/кг зумовлювало зростання активності АСТ, АЛТ, лужної фосфатази, GGT через 3 години експерименту. Гістологічні дослідження тканини печінки за даних умов в різні терміни (від 3 до 12 годин) продемонстрували наявність дезорганізації структурних компонентів органу, набряк гепатоцитів, подекуди їх некроз. Виявляли також гістіолейкоцитарну інфільтрацію, застійні явища в судинах та значне підвищення функціональної активності клітин Купфера [89]

Результати досліджень Ghosh R. та співавторів [96] щодо гепатотоксичності отрути гадюки Vipera russelli підтвердили розвиток деструктивно-дистрофічних змін будови печінки за умов введення її експериментальним тваринам. При гістологічному дослідженні зразків органу спостерігали ознаки каріопікнозу, каріорексису гепатоцитів, їх вакуольну та жирову дистрофію. Іноді відмічали характерні прояви некрозу клітин печінки, виражене розширення синусоїдних капілярів, застійні явища центральних вен. Властивою була лейкоцитарна інфільтрація тканини печінки. В крові піддослідних щурів реєстрували підвищення активності АЛТ та АСТ.

Al-Quraishy та ін. [26] вивчаючи вплив отрути змій Naja haje на структурно-функціональні параметри печінки лабораторних щурів, довели її гепатотоксичну дію та здатність спричиняти розвиток ОС. В сироватці крові тварин підвищувались рівні АСТ, АЛТ, GGT, білірубіну. Характерними були активація ПОЛ та зростання NO в гомогенатах печінки. При цьому значно знижувався вміст глутатіону в плазмі крові і тканині органу та активність таких ферментів, як глутатіонредуктази (GR), глутатіон-S-трансферази (GST), CAT. Водночас виявляли високі рівні SOD і глутатіон пероксидази (GPx). Автори зазначають, що за даних умов порушувалось функціонування комплексів дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів, зокрема II, III та V. Гістологічні дослідження виявили лейкоцитарну інфільтрацію тканини печінки навколо центральних вен, розширення синусоїдних капілярів, вакуолізацію цитоплазми гепатоцитів, зростання активності клітин Купфера. Подекуди відмічали важкі некрози або апоптоз клітин печінки. Імуногістохімічні дослідження встановили виражену активність каспази-3 в гепатоцитах, що демонструє їх високу готовність до апоптозу.

Проблема зміїних укусів є також актуальною для МОЗ України. Згідно статистичних даних кількість випадків отруєнь за зазначених умов зростає щороку. Станом на липень 2022 року зареєстровано близько 45 звернень до закладів охорони здоров'я, в той час як в 2021 році ця цифра становила 30. Серед зафіксованих випадків уражень зазнали як дорослі, так і діти. Летальних наслідків у постраждалих за період 2021-2022 років не виявлено, однак клінічні симптоми отруєнь значно варіювали від легких до важких із ускладненим перебігом [http://medstat.gov.ua/ukr/statdanMMXIX.html].

Популяція змій на території України представлена одинадцятьма видами, серед яких отруйними властивостями володіють лише п'ять, а саме гадюка звичайна (Vipera berus), гадюка східна або степова (Vipera ursinii), гадюка Нікольського (Vipera nikolskii), гадюка Ренарда (Vipera renardi), гадюка носата (Vipera ammodytes) [9]. Зазначені види найчастіше трапляються в південних і східних областях, менше в західних і північних. Джерела наукової

літератури повідомляють, що Vipera berus є найбільш розповсюдженою в Україні та часто виступає об'єктом експериментальних досліджень. Варто відмітити, що у вітчизняних та іноземних наукометричних базах даних знайдено результати вивчення токсинологічного складу отрути гадюк Vipera berus, однак як зазначають науковці велика кількість питань стосовно її біологічних ефектів, структурних компонентів, особливостей впливу на гістологічну будову органів та систем залишаються на сьогоднішній день відкритими [8, 9, 19].

Досліженням якісного та кількісного складу отрути гадюк Vipera berus та Vipera nikolskii присвячені роботи співробітників кафедри мікології та фітоімунології біологічного факультету Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Науковцями встановлено наявність широкого діапазону токсичних компонентів зазначених видів гадюк, які в організмі постраждалих здатні спричиняти розвиток уражень майже всіх органів та систем. Ними виділено в значній кількості $PLA_2$, SV-MMP, SPs, брадикінін-потенціюючі пептиди (BPPs), LAAOs, лектиноподібні пептиди C-типу, дезінтегрини, інгібітори протеїназ типу Кунітц. Зазначені компоненти проявляють нейро-, кардіо-, міо-, цитотоксичну, гемолітичну активність, призводячи до важких наслідків, ускладнень чи інвалідизації.

Таким чином, актуальність проблеми отруєнь внаслідок зміїних укусів є надзвичайно високою як на території України, так і всього світу. Різноманіття токсинів отрут змій і гадюк робить їх надто небезпечними для здоров'я і життя людей, при цьому серед постраждалих велика частка припадає на дитяче населення. Останній факт підлягає найбільш ретельному вивченню, оскільки незрілість дитячого організму стає часто тригером появи важких наслідків. Серед наявних на сьогоднішній день наукових експериментів, доведеними є випадки уражень отрутами змій та гадюк серцево-судинної, дихальної, видільної, ендокринної, коагуляційної систем. Не дивлячись на наявність описаних вище прикладів гепатотоксичності компонентів гадюк і змій, дана проблема наразі не є всебічно висвітленою. Особливої уваги заслуговують

дослідження морфологічних змін структури печінки за умов укусів гадюк виду Vipera berus на світлооптичному та електронно-мікроскопічному рівнях. Відсутність даних з приводу цієї проблеми робить наше дослідження важливим та своєчасним.

## 1.2. Закономірності перебігу окисно-відновних процесів в тканині печінки та роль вільнорадикального пошкодження органу при впливі чинників різного генезу.

Печінка є одним з провідних органів, що забезпечують метаболізм майже всіх класів біомолекул і нутрієнтів, детоксикацію, утилізацію екзогенних та ендогенних речовин. Різноманітні пошкоджуючі фактори, серед яких токсини природного чи штучного походження, радіаційне випромінювання, полютанти навколишнього середовища зумовлюють розвиток структурно-функціональних порушень в тканині органу, які часто носять непередбачуваний характер. На сьогоднішній день доведено, що в основі ураження печінки за умов впливу чинників різного генезу головну роль відводять ОС та асоційованим з ним морфологічним і біохімічним змінам [69]. Зазначений факт пов’язаний з надзвичайно високою чутливістю клітин паренхіми органу до дії вільних радикалів. Органели останніх такі, як мітохондрії, пероксисоми в процесі їх нормальної функціональної активності здатні продукувати певну кількість АФК, що підлягають утилізації компонентами антиоксидантної системи. Однак, при патологічних станах характерним є зростання і накопичення надмірної кількості вільних радикалів, порушення окисного гомеостазу та розвиток стресу, який стає наслідком не лише гістологічних перебудов структурних елементів печінки, але також викликає незворотні зміни метаболізму ліпідів, білків, вуглеводів, модулює шляхи відповідальні за транскрипцію, експресію генів, апоптоз клітин, тощо

[29, 30].

АФК містять в своїй структурі неспарені електрони в атомах, які надають їм надзвичайної реакційної здатності та можливості взаємодіяти з такми молекулами, як білки, ліпіди, ДНК. Зокрема, молекулярний кисень завдяки унікальності своєї будови може приймати загалом чотири електрони та брати участь у формуванні вільних радикалів. АФК та реактивно здатні форми азоту (RNS – reactive nitrogen species) належать жо найбільш важливої групи вільних радикалів, що утворюються в живих системах. Серед АФК виділяють, головним чином, супероксидний радикал ($O_2^{\cdot -}$), гідроксильний радикал ($OH^{\cdot}$), перекис водню ($H_2O_2$). Зазначені сполуки проявляють властивості взаємодії з NO, формуючи більш потужні види АФК, як пероксинітрит або ж зумовлюють окислення гемпротеїнів. Вказані процеси сприяють синтезу надзвичайно сильних окисників, які можуть сприяти структурним модифікаціям всіх класів біомолекул організму людини [23, 112, 183, 228].

За умов відсутності патологічних станів компоненти АОЗ значно пригнічують процеси окислення, знижують концентрацію окисників, запобігають утворенню реакційно здатних частинок. В літературних джерелах зазначено, що елементи антиоксидантної системи умовно класифікують на неферментні, що є низькомолекулярними сполуками, а саме аскорбінова кислота, α-токоферол, глутатіон, флавоноїди та ферментні, серед яких особливо важливі SOD, GPx і CAT [71, 113]. Науковці вирізняють три форми SOD – SOD-1, SOD-2 і SOD-3. Перша містить в своїй структурі іони таких металів, як Cu і Zn, тому часто її позначають Cu-ZnSOD. Характерним місцем її локалізації є цитозоль клітини, але іноді зустрічається і в ядрі. Відповідно до хімічної будови SOD-1 є гомодимерним білком з молекулярною масою 32,5 кДа. Мідь в даному випадку виступає в ролі неорганічного коферменту ензиму, оскільки необхідна для власне каталітичного процесу, в той час, як цинк стабілізує білкову структуру молекули. SOD-2 є залежною від марганцю – MnSOD та розміщена в матриксі мітохондрій, маса її становить 86-88 кДа.

SOD-3 – екстрацелюлярний ензим, що володіє найбільшою молекулярною масою 135 кДа. Основна функція SOD полягає в дисмутації супероксидного радикалу з формуванням $H_2O_2$ та кисню [52, 250]. CAT є гомотетрамерною молекулою масою 240 кДа, біологічна роль якої – перетворення $H_2O_2$ на воду та молекулярний кисень [73, 204]. GPx відносять до переліку головних ферментів АОЗ. Наразі відомими є клітинний та позаклітинний види GPx. Вона має молекулярну масу 85 кДа, є тетрамерним білком та потребує для каталітичної активності чотири атома селену, що пов'язані з амінокислотою цистеїном. Слід зазначити, що неферментний компонент системи АОЗ глутатіон або γ-глутамілцистеїнгліцин вважають потужним регулятором внутрішньоклітинного окисно-відновного гомеостазу, який наявний в усіх клітинах живих організмів, зосереджуючись переважно в цитоплазмі, ядрі, мітохондріях. Даний трипептид існує у відновленій або окисленій формі, виконує функцію кофактора для низки ферментів, серед яких GPx, GST, а також забезпечує утилізацію гідроксильного радикалу та пероксинітриту [102, 239].

Пригнічення адаптивних реакцій системи АОЗ при впливі пошкоджуючих факторів зумовлюють розвиток ОС та активують процеси ПОЛ. В свою чергу це призводить до системної мембранопатії та синдрому регенераторно-пластичної недостатності. Високий ступінь активності метаболізму в клітинах печінки значно підвищує ризик надмірної продукції в них АФК, а, отже, переважна більшість як гострих, так і хронічних станів в даному органі супроводжується ОС та ПОЛ. Ураження структурних елементів клітинних мембран гепатоцитів при дії вільних радикалів порушує їх бар'єрну, детоксикаційну функції, призводить до гіпоксії, появи і прогресування фіброзу, запалення, некрозу чи апоптозу [212]. ОС, що розвивається внаслідок невідповідності між прооксидантними та антиоксидантними ресурсами клітини виступає в якості провідного патогенетичного компонента цитолітичного синдрому за умов впливу несприятливих факторів. Пошкодження ліпідного бішару плазмолеми гепатоцитів та асоційованих з

ними змінами її в’язкості, як правило, тісно взаємопов’язані з активацією ПОЛ та виснаженням внутрішньоклітинних резервів АТФ в мітохондріях. За даних умов спостерігають зростання в сироватці крові маркерних ферментів як цитозолю (АЛТ, АСТ, ЛДГ, GGT), так і ензимів біліарного полюса клітин печінки, а саме лужної фосфатази, лейцинамінопептидази і 5′-нуклеотидази. В основі цитолізу, який зумовлений ПОЛ, що запускається при ураженні органу факторами різного генезу, виділяють декілька визначальних механізмів [153]. Вільні радикали такі, як супероксид аніон, гідроксильний радикал, синглетний кисель на фоні зниження активності елементів АОЗ (CAT, SOD, GPx) спричиняють структурні зміни ліпідів клітинних мембран та підвищують проникність останніх. В подальшому, накопичення АФК призводить до деструкції плазмолеми гепатоцитів та майже всіх органел, однак найбільш вразливими в цих умовах є мітохондрії. Зазначені органели, як відомо, містять значну кількість білків, що кодуються мітохондріальною ДНК (м-ДНК) та відіграють ключову роль в низці біохімічних процесів, в тому числі – організації дихального ланцюга, який забезпечує енергетичні потреби клітин організму. Вільні радикали порушують структуру м-ДНК, зумовлюючи чисельні мутації та, як результат, мітохондріальну дисфункцію. Крім того, АФК пригнічуючи функціональну активність мітохондрій, інгібують продукцію НАДФН, знижуючи рівень глутатіону та редокс-потенціал клітинної мембрани гепатоцитів, тим самим поглиблюючи окисне пошкодження тканини органу [134, 165, 176]. Комплексні сполуки ПОЛ взаємодіють з макромолекулами клітин, зокрема білками, ферментами, зумовлюючи зміни їх фізико-хімічних властивостей, зниження каталітичної здатності [76].

За даними наукових джерел, розвиток ОС неухильно призводить до запуску перекисного окислення поліненасичених жирних кислот клітинної оболонки. При фізіологічних умовах аутоокислення останніх забезпечує так зване оновлення ліпідного складу плазмолеми та є повільним процесом, однак дія патологічного чинника значно прискорює його, посилює інтенсивність,

роблячи таким, що здатен спричиняти виражені модифікації цих біомолекул. Дослідники зазначають, що важливу увагу необхідно приділяти вивченню структури та біологічних ефектів продуктів ПОЛ. Серед останніх найбільш дослідженими наразі є ліпідні пероксиди, малоновий діальдегід (МДА), 2-алкенали, 4-окси-2-алкенали. У випадку участі в процесах ПОЛ арахідонової кислоти характерною є продукція 4-оксиноненалу, ліпідних епоксидів. Останні володіють ознаками відносної стабільності, що надає їм змогу проникати у глибокі компартменти клітин або навіть в інші клітини, що пояснює факт пошкодження тканин, які не піддавались безпосередньому впливу ОС і ПОЛ [125, 198]. Вірогідність залучення тієї чи іншої поліненасиченої жирної кислоти плазмолеми до ПОЛ зростає зі збільшенням числа ненасичених зв'язків між вуглецевими фрагментами в ланцюгу молекули ліпіда. До переліку основних жирних кислот, що піддаються легкому окисленню належать лінолева та арахідонова, що є важливими структурними компонентами клітинних оболонок [34].

Попередньо зазначалось, що ПОЛ є джерелом продукції різноманітних сполук, що чинять виражену цитотоксичну дію. Головну роль серед даних сполук відіграє МДА. Взаємодія його з ліпідами і білками призводить до формування нерозчинних кон'югованих основ Шиффа, що здатні накопичуватись в лізосомах. Експериментально встановлено, що МДА сприяє перехресному зв'язуванню і полімеризації компонентів мембран, впливаючи на такі їх функції, як текучість, транспорт іонів, ферментативну і рецепторну активності, агрегаційну здатність окремих елементів поверхні плазмолеми. Крім того, МДА часто зв'язується з азотними основами нуклеотидів ДНК, саме тому прийнято вважати, що він проявляє генотоксичність, а також мутагенну дію [207, 208, 235].

Стрімко розширюється кількість експериментальних досліджень, які доводять факт модифікації білкових молекул в більшості органів, в тому числі печінці при розвитку ОС та надмірній продукції АФК. Надзвичайна сприйнятливість їх до дії вільних радикалів обумовлена, головним чином,

особливостями амінокислотного складу, послідовністю останніх в поліпептидному ланцюгу, функціональною важливістю. Встановлено, що білки, які містять сірковмісні амінокислоти більш активно піддаються впливу реактивних форм кисню. При розвитку ОС структурно-функціональних змін, як правило, зазнають білки, в складі яких виявляють триптофан, тирозин, фенілаланін, гістидин, метіонін, цистеїн. Варто зазначити, що активність ферментів, які мають в основі своєї організації перераховані амінокислоти, зокрема, гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогеназа значно пригнічується чи інгібується за умов впливу АФК. Окремі ензими, які в активному центрі містять кластери заліза або сірки є дуже чутливими до дії супероксидного радикалу. Науковцями доведено, що фермент мітохондрій аконітаза блокується при посиленій продукції даного виду АФК, а оскільки він залучений до циклу трикарбонових кислот, то порушення його нормальної активності асоціюють з цілою низкою патологічних ефектів [248]. Пригнічення циклу Кребса сприяє ще більшій продукції супероксид аніону, формуючи ніби замкнене коло. Як і у випадку з ліпідами взаємодія АФК з білками призводить до синтезу проміжних продуктів, які значно посилюють пошкодження клітинних структур [217]. Так, в літературі зазначено, що окислення триптофана в складі білкових молекул зумовлює утворення N-формілкінуреніну та $H_2O_2$. N-формілкінуренін при зв'язуванні зі сполуками, які містять аміногрупу, сприяють продукції основ Шиффа. $H_2O_2$ при цьому вступає в реакцію з компонентами клітинних мембран безпосередньо або ж стає тригером нових біохімічних перетворень, в ході яких формується ще більша кількість вільних радикалів, що чинять негативну дію на важливі для життєдіяльності органи та системи [159, 221].

Шляхом проведення ретельного аналізу та узагальнення інформації наукових джерел можна дійти висновку, що всі відомі на сьогоднішній день структурні зміни білків при розвитку ОС поділяють на три групи – фрагментацію, агрегацію та підвищену сприйнятливість до дії різноманітних протеолітичних ферментів. У випадку процесів фрагментації окремих

білкових молекул, серед яких γ-глобуліни, альбуміни, колаген, перебудов зазнають залишки проліну, гістидину, аргініну. При цьому, особливу роль в даному випадку відіграє саме гідроксильний радикал. Така вибірковість дії зазначеного виду АФК зумовлена тим, що перераховані амінокислоти часто зв'язані з металами зі змінною валентністю (мідь, залізо), які виступають в ролі кофакторів, сприяючи подальшій продукції гідроксильного радикалу. Агрегація білків внаслідок впливу АФК в більшості випадків характеризується формуванням перехресних зв'язків між ними та, як результат, утворенням великих агрегатів. In vitro дослідження продемонстрували, що сформовані агрегати представлені молекулами з нативною структурою, тобто, вони не підлягали поділу на фрагменти. Білки цитоплазми чи клітинних мембран здатні також формувати між собою дисульфідні зв'язки або ж взаємодія відбувається на рівні амінокислотних залишків, які були значно модифіковані реактивними формами кисню. Останній вид фізико-хімічних змін будови цих макромолекул характеризується підвищенням чутливості їх до дії протеолітичних ферментів, внаслідок чого спостерігають процеси денатурації [95].

Дослідження вітчизняних та іноземних вчених свідчать на користь того факту, що АФК змінюють особливості структурної організації вуглеводів і найбільш активно даний процес відбувається в клітинах печінки за умов ряду захворювань, серед яких одне з основних місць посідає цукровий діабет [33, 110]. Вільнорадикальне окислення глюкози лежить в основі патогенезу цукрового діабету [268]. Встановлено, що вуглеводні сполуки з α-оксиальдегідною групою при наявності металів зі змінною валентністю зазнають процесів енолізації та перетворюються в кетоальдегіди. Також відомо, що окислення моносахаридів супроводжується утворенням $H_2O_2$ і дикарбонільних сполук. Ці продукти формують взаємозв'язки з іншими молекулами, при чому цікавість за даних умов привертають механізми неферментного глікування білків. В основі його лежить взаємодія між ε-аміногрупою лізину, окисно-модифікованими моносахаридами та

кетоальдегідами. Внаслідок цього утворюються також проміжні сполуки – основи Шиффа, що в свою чергу впливають на структуру пептидів, формуючи надзвичайно стійкі, однак не активні у функціональному відношенні продукти [78].

Нуклеїнові кислоти, головним чином ДНК, є також важливими мішенями для вільних радикалів. Ключова роль в їх ураженні належить гідроксильному радикалу. Особливості будови ДНК створюють умови для того, щоб гідроксильний радикал був здатен впливати на азотисті основи, вуглеводні фрагменти, фосфатну групу. Дія зазначеного АФК на азотисті основи проявляється у вигляді гідроксилування, розкручування спіралі ДНК або ж її фрагментації. Результат такої взаємодії полягає в значному пошкодженні молекули та утворенні 8-окси-2-дезоксигуанозину і 2,6-диаміно-4-окси-5-формамідопіримідину. Останні належать до маркерів вільнорадикального ушкодження нуклеїнових кислот. З азотистих основ часто формуються також нестабільні проміжні сполуки, що здатні з'єднуватись з іншими макромолекулами ковалентними зв'язками з утворенням агрегатів, наприклад, ДНК-білкові конгломерати [154, 236].

На сьогоднішній день вже доведено, що переважна більшість хвороб печінки супроводжується розвитком в органі ОС та запуском вільнорадикальних процесів. Найбільш яскраво механізми цього явища описані на прикладі алкогольної хвороби печінки, токсин- та медикаментозно-індукованого пошкодження органу, фібропроліферативних змін, дії радіаційного випромінювання та температурного чинника. Алкогольна хвороба печінки включає цілий ряд патологічних змін, а саме стеатоз, гепатит, цироз, що можуть призвести до гепатоцелюлярної карциноми. За даних умов характерними є запалення та ОС [138]. В печінці етанол піддається розщепленню до ацетальдегіду. Даний продукт є реакційно здатним, часто взаємодіє з ДНК, а також в ході його метаболізму продукуються АФК, які є причиною пошкодження тканини печінки. Похідне ацетальдегіду – МДА зв'язується з білками, формуючи так звані гібридні продукти. Останні

розпізнаються клітинами Купфера, ендотеліоцитами, які є регуляторами синтезу в органі цитокінів та запуску запальних механізмів [84]. Етанол в печінці метаболізується також мікросомальною системою та системою цитохрому Р450. Активність цитохрому Р450 асоціюється з продукцією АФК (супероксидних аніонів, гідроксильних радикалів), які зумовлючи розвиток в гепатоцитах ОС, призводять до їх апоптозу. Експериментально встановлено, що вільні радикали через сигнальні шляхи стимулюють підвищення продукції TNF-α. В результаті синтезу ацетату з етанолу в мітохондріях гепатоцитів зростає співвідношення НАДН / $НАД^+$, а як відомо надлишок НАДН викликає пригнічення мітохондріального β-окислення жирних кислот та накопичення ліпідів всередині клітин [206]. Крім того, АФК, що генеруються системою цитохрому Р450 можуть індукувати пероксидацію ферментів мітохондрій, пероксисом, що залучені до процесів β-окислення жирних кислот (ацил-КоА дегідрогеназа, карнітин пальмітоїл трансфераза-1). Це призводить до розвитку жирового стеатозу печінки за даних умов [93, 188, 270]. Наразі відомо, що етанол також знижує експресію рецепторів активаторів проліферації пероксисом 1α (PPAR). Ці ядерні транскрипційні фактори модулюють активність ензимів, які беруть участь в утилізації АФК, а, отже, зниження рівня останніх призводить до ще більшого накопичення вільних радикалів. У мітохондріях гепатоцитів, що зазнають впливу постійно високих рівнів АФК при алкогольному ураженні печінки, відбуваються незворотні зміни у вигляді пошкодження м-ДНК, рибосом, що призводить до порушення чи повного пригнічення синтезу білків [247]. Деякі види вільних радикалів значно змінюють проникність мембран мітохондрій, що зумовлює вивільнення проапоптотичних факторів – цитохрому С, каспази-3 та зниження продукції АТФ [145]. Дисбаланс між виробленням та знешкодженням АФК в мітохондріях також є причиною посиленого утворення індукованого гіпоксією фактора-1α (HIF-1α), який стимулює секрецію TNF-α, формування імунної відповіді, поглиблення ураження тканини печінки [137]. За зазначених умов вільні радикали здатні змінювати також проникність і мембран лізосом та

спияти вивільненню з їх компартментів таких ферментів, як катепсини. Разом з цим активуються металозалежні ММР, відбувається посилена проліферація міофібробластів, що в кінцевому рахунку сприяє фіброзу та цирозу органу [37].

Переважна більшість патологічних станів в печінці завершується розвитком фіброзних змін, а вільні радикали відіграють в цьому процесі одну з важливих ролей. Так, АФК та продукти ПОЛ сприяють вивільненню профіброгенних факторів, цитокінів, простагландинів. Доведено, що трансформуючий фактор росту β (TGFβ) , який належить до переліку фіброз-стимулюючих факторів, є редокс-залежним і експресія його зростає при розвитку ОС в печінці. При цьому саме зірчасті клітини відповідальні за посилення його продукції. TGFβ в свою чергу сприяє збільшенню синтезу нових АФК фібробластами шляхом активації НАДФН-оксидази мітохондрій та патологічних зрушень у функціонуванні IV комплексу дихального ланцюга цих органел [77, 79, 168, 194, 267].

Чисельні клінічні спостереження доводять, що ОС лежить також в основі ураження гепатоцитів при гіпоксії / реперфузії, що часто супроводжують хірургічні втручання. Активні окислювальні агенти, що надзвичайно швидко утворюються при відновленні кровопостачання ішемізованих тканин кардинально змінюють активність комплексів дихального ланцюга мітохондрій, що і стає причиною надпродукції АФК. За цих умов зростає синтез ксантиноксидази, яка реагуючи з молекулярним киснем збільшує продукцію вільних радикалів. Слід зазначити, що відповідальними за окисно-відновний стан в печінці при зазначених станах є клітини Купфера, нейтрофіли, які в ході своєї функціональної активності виділяють сполуки, що є маркерами окисного ураження печінки [82, 162].

Печінка проявляє виражену сенситивність до дії медикаментозних лікарських засобів. На сьогоднішній день наявні дослідження, що демонструють токсичний вплив препаратів для лікування різного роду захворювань на тканину органу шляхом стимуляції синтезу вільних радикалів

та розвитку ОС. До переліку гепатотоксичних відносять, зокрема, нестероїдні протизапальні засоби, анальгетики, препарати для терапії онкологічних захворювань, антидепресанти, тощо [75, 166, 205, 219, 230]. Було встановлено, що пероральний прийом сульфосалазину зумовлює зниження активності SOD, однак при цьому реєстрували зростання рівня CAT [202]. Дослідження дії золедронової кислоти, що є азотвмісним біфосфонатом та використовується в пацієнтів з канцер-асоційованою гіперкальціємією, показали її здатність підвищувати рівні МДА, NO та знижувати вироблення глутатіону [66]. Експерименти на лабораторних мишах встановили токсичну дію парацетамолу на тканину печінки. Лікарський засіб стимулював синтез МДА, нітритів, нітратів в органі з одночасним пригніченням активності SOD [180, 184, 203]. Деякі науковці зазначають, що прийом морфіну у окремої категорії пацієнтів супроводжується підвищенням рівнів в сироватці крові АЛТ, АСТ, ЛДГ, МДА в печінці та інгібуванням SOD, GST, CAT [192]. В щурів такі препарати, як доксорубіцин, паклітаксел, доцетаксел зумовлювали розвиток ОС, що супроводжувався посиленим синтезом тіобарбітурової кислоти, яка є одним з ключових маркерів ПОЛ [20, 178, 181].

Забруднювачі навколишнього середовища, такі як важкі метали також асоціюються з гепатотоксичністю, яка була доведена в різних експериментальних моделях на щурах [189]. Так, система АОЗ печінки тварин зазнавала виражених патологічних змін при введенні їм хлориду ртуті в дозі 0,1 мк/кг. Дане явище пов’язане зі значним зниженням активності SOD (Mn, Cu, Zn-залежних), CAT, GPx, а також спостерігали пригнічення експресії в гепатоцитах глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. При біохімічному дослідженні за цих умов виявляли ріст в сироватці крові таких показників, як АЛТ та GGT [94, 135].

Радіаційне випромінювання, дія різних температур, наночастинок металів, як було показано, призводять до вільнорадикального пошкодження печінки [39, 157, 223]. Вплив радіаційного випромінювання супроводжується продукцією МДА, NO, зниженням активності SOD, мієлопероксидази та GPx

в гомогенатах печінки морських свинок. Науковці зазначають, що важкість ураження зростає разом з тривалістю випромінювання [271]. Також встановлено, що у щурів холодовий стрес, який моделювали шляхом утримання тварин при температурі $10^0$ С протягом тижня супроводжувався пригніченням CAT, SOD, GPx в печінці [141, 142, 263].

В літературних джерелах також зустрічаються дослідження щодо впливу на печінку хімічних сполук та певних наночастинок металів, які запускають продукцію АФК і ПОЛ. Так, бензоїлпероксид, що володіє потужними окислювальними властивостями та має доволі широкий спектр застосування в промисловості, згубно діє на систему антиоксидантного статусу, та діяльність АТФ-ази. В гомогенатах печінки дослідних тварин знижувалась продукція SOD за умов дії цієї сполуки, а також активність $Ca^{2+}$-АТФ-ази і $Mg^{2+}$-АТФ-ази. Крім того, процес супроводжувався накопиченням значної кількості МДА [120].

Таким чином, ОС та ПОЛ виступають в ролі ключових патогенетичних механізмів ураження печінки за умов розвитку і прогресування різного роду захворювань органу та при впливі пошкоджуючих екзогенних факторів. Протягом останніх десятиліть активно досліджуються концепції антиоксидантної терапії, докладаються зусилля для глибокого та всебічного вивчення системи АОЗ, її функціональної активності в нормі, та при патології. Не зважаючи на таку підвищену увагу науковців світу до зазначеної проблеми, залишається все ще багато нез'ясованих фактів участі тих, чи інших компонентів антиоксидантної системи в захисті тканини печінки від пошкоджуючої дії вільних радикалів. Значною проблемою є також складна роль АФК в процесах нормального функціонування організму та відсутність достовірної інформації щодо факту виснаження резервів системи АОЗ в нормі та переключення її на патологічний стан. Лімітованість досліджень всередині людських популяцій та важкість трансляції даних, що отримані на різних моделях лабораторних тварин значно ускладнює та уповільнює процес отримання комплексних знань, що можуть сприяти розробці алгоритмів

виявлення і лікування асоційованих з ОС захворювань печінки. Отже, наразі, перед дослідниками постає актуальне питання ролі ОС в розвитку низки патолічних станів органу, в тому числі при дії токсинів різного походження та пошуку ефективних методів терапії з урахуванням впливу її на основні ланки антиоксидантної системи організму.

# РОЗДІЛ 2
# ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА Й ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

## 2.1. Загальна методика і об’єкти дослідження

Дослідження відповідає міжнародним рекомендаціям щодо проведення медико-біологічних досліджень із залученням тварин, викладених у «Загальних принципах використання тварин», затверджених І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001). Воно також відповідє положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986) [16]. Етичні стандарти, використані в роботі, атестовано Комісією з біоетики НМУ імені О. О. Богомольця (протокол № 162 від 31.10.2022 та протокол № 194 від 21.04.2025).

Щури містилися у віварії зі стандартною дієтою в окремих місцях перебування. Перед введенням досліджуваних речовин піддослідні тварини акліматизувалися в дослідницькій кімнаті мінімум 5 днів.

Тварини були розділені на три групи:

1 – контрольна (отримували внутрішньоочеревинне введення фізіологічного розчину об’ємом 0,5 мл).

2 – тварини отримували внутрішньоочеревинну ін’єкцію отрути гадюки Vipera berus berus у дозі $ED_{50}$ 1,576 мкг/г.

3 - внутрішньочеревенне введення отрути гадюки Vipera berus nikolskii при $ED_{50}$ 0,972 мкг/г.

*Таблиця 2.1*

**Розподіл щурів за групами експерименту.**

| Група | Кількість тварин | Речовини, які вводили тваринам |
|---|---|---|
| Контроль | n=10 | NaCl в об'ємі 0,5 мл |
| Дослід | підгрупа 1 (n=20) | отрута гадюки Vipera berus berus в дозі $ED_{50}$ 1,576 мкг/г |
| | підгрупа 2 (n=20) | отрута гадюки Vipera berus nikolskii $ED_{50}$ 0,972 мкг/г |

Через добу тварин піддавали евтаназії шляхом декапітації. Після цього проводився розтин, макроскопічне дослідження та опис внутрішніх органів. Усі спостережувані патологічні зміни були задокументовані та згодом проаналізовані за допомогою біохімічних, гістологічних, імуногістохімічних та електронно-мікроскопічних методів.

### 2.2. Методи дослідження

#### 2.2.1. Біохімічні і лабораторні.

*Реактиви та обладнання.* В роботі були використані такі реактиви: казеїн, 0,05 М фосфатний буфер (pH 7.4), трихлороцтова кислота, ЕДТА, тріс(3-гідроксиметиламіноетан), гліцин, хлорид натрію, спирт етиловий 96%, бета-меркаптоетанол, акриламід, N,N´-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, ТЕМЕД, додецилсульфат натрію (ДСН), LMW маркери молекулярної маси білків для електрофорезу, барвник Coomassie Brilliant Blue G-250, льодяна

оцтова кислота. Решта хімічних реактивів (солі, кислоти, луги) була кваліфікації «чда» та «хч».

При проведенні досліджень використовували наступне обладнання: Апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, США), центрифуга СМ-6М «ELMI»; центрифуга Allegra 64R «Beckman Coulter»; мікропланшетний рідер виробництва фірми «BioTec» США; спектрофотометр «Smart Spec Plus» виробництва фірми «BioRad», США; автоматичні піпетки та дозатори «Humapette»; магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати і т.д. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001; пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу; планшети з несорбуючою поверхнею; еппендорфи, пробірки та інше отримано від фірми Sente-Lab; скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

*Отримання гомогенату тканин щурів.*

Всі операції в період виділення проводили при температурі 1-4ºС.

Для приготування гомогенату з тканин їх швидко екстрагували, промивали 0,9% NaCl у чашці Петрі. Зразок органу масою 0,5 г зважували, дрібно нарізали ножицями, переносили в скляний гомогенізатор і змішували з 50 мМ трис-HCl буфером (містить 1 мМ EDTA і 0,1 М трис-HCl, pH 7,4) у співвідношенні 1:10 (тканина/ буфер). Процес змішування тривав 15 хвилин. Потім гомогенат центрифугували при 2500 об/хв протягом 20 хвилин. Отриманий супернатант був використаний для подальших досліджень [11].

*Кількісне визначення білку.*

Кількість білку визначали за методом Bradford [51]. Даний метод ґрунтується на здатності барвника Кумасі діамантово-синього G-250 змінювати забарвлення при зв’язуванні з білком, при цьому максимум поглинання зміщується відповідно з 465 до 595 нм. За таких умов концентрація барвника, що зв’язалась з білком прямопропорційна кількості білку в пробі.

Для визначення концентрації білка до проби додавали 30% розчин NaOH, дистильовану воду та робочий розчин реактиву Бредфорд. Для приготування робочого розчину змішували стоковий розчин реактиву, 95% етанол та 88% ортофосфорну кислоту за співвідношення 2:1:2 та доводили водою до об'єму 100 мл. Стоковий розчин містив 10 мл 95% етанолу, 20 мл 88% ортофосфорної кислоти та 35 мг кумасі діамантового синього. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду. Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

*Приготування проб для електрофорезу.*

Для одержання чіткої картини у ПААГ застосовують метод концентрування зразків за допомогою трихлороцтової кислоти (ТХО). Для цього зразки в мікропробірках змішують з 55% ТХО у співвідношенні 1:1 і залишають на 10 хвилин. Після п'яти хвилинного центрифугування при 10 000g зливають надосадову рідину. Додають 0,5 мл ацетону на пробу і знову центрифугують. Процедуру з ацетоном повторюють 2-3 рази, після чого зразки залишають на ніч для випаровування залишків ацетону.

Після випаровування зразки розчиняють у буфері для електрофорезу, що містив 0,01 М трис-HCl буфер, pH 6.8, 2% додецилсульфат натрію, 10% сахарозу та 0,01% бромфенолового синього, у співвідношенні 1:1. Для диск-електрофорезу зразки прогрівали впродовж 2 хв, у той час як проби для ензим-електрофорезу нагріванню не піддавали.

*Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію.*

Для отримання електрофореграми проводили диск-електрофорез за методом Леммлі [43]. Процедури проводилися у камері для вертикального електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Камера для вертикального електрофорезу є пластиковим резервуаром з анодними та катодними

буферними відсіками, в яких містяться відповідні електроди (Bio-Rad laboratories inc., 2015). Для дослідження готували пластини гелю товщиною 1 мм, застосовували 12% поліакриламідний гель (ПААГ) в якості гелю для розділення макромолекул, а також використовували 4% ПААГ в якості гелю для концентрації досліджуваних зразків. Для проведення електичного струму через електроди в камері для форезу готували електродний буфер, котрий містив Tris, гліцин та додецилсульфатнатрію (ДСН).

Гель для розділення макромолекул (12% ПААГ) вносили між двома зафіксованими в положенні скельцями, котрі були зафіксовані бортами знизу та по бокам. Після внесення гелю очікували 1 год до повної полімеризації останнього. Зразки, котрі містять білки поміщали у лунки, сформовані в ПААГ для концентрації, котрий вносили над гелем для розділення, в якому вже відбулась полімеризація. Електроди камери для вертикального електрофорезу (матеріал - платина) підключали до гнізда джерела живлення PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad). При проведенні досліду застосовували силу струму 19 мА в в час проходження білкового вмісту зразків через гель для концентрації. В фазі проходження білкового вмісту зразків через гель для розділення – застосовували силу струму 38 мА (Bio-Rad laboratories inc., 2015).

По проходженню вищеописаних процедур, отриманий гель забарвлювали розчином кумасі G-250 (0,125%), котрий містить 96 етанол, ізопропанол, а також концентровану оцтову кислоту. Після забарвлення, пластину гелю промивали в 8% розчині оцтової кислоти протягом години. За допомогою камери CANON IXUS 185 фотографували в цифровому форматі. За допомогою програмного забезпечення від лабораторії TotalLab - CLIQS Gel Image Analysis Software аналізували досліджувані зразки.

*Ензим-електрофорез*

Розділяючий гель полімеризували за присутності желатину, фібриногену та колагену з розрахунку 1 мг/мл. Концентрація розділяючого гелю становила 12 %. Розділення зразків проводили за сили струму 19 мА.

Кінцевим етапом було відмивання гелів у 2,5% розчині тритону Х-100 протягом години для видалення залишків ДСН. Після цього гелі заливали 0,05 М трис-HCl буфером, pH 7,4, що містив 0,13 М NaCl, та інкубували протягом 12 годин. Фарбування та фіксацію гелів здійснювали відповідно до стандартного протоколу проведення електрофорезу (розділ «*Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію*»).

Проби попередньо не прогрівали за для попередження втрати білками ферментативної активності.

*Виділення та характеристика плазміногена*

Глу-плазміноген людини виділяли із цитратної плазми донорської крові методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі [67]. Перевагою цього методу є зручність роботи, висока відтворюваність результатів і забезпечення необхідної чистоти та нативності білка. Також цей метод дозволяє одержувати препарати плазміногена позбавлені чи з дуже низькою спонтанною активністю.

Для одержання цитратної плазми до крові додавали консервант: на 1 л крові – 100 мл розчину, що містить 3,8% цитрату Na, 50 мМ ЕДТА, 50 мМ фосфатного буферу pH 7,4. Для видалення форменних елементів кров центрифугували на центрифузі РС-6 при 2,5 тис. об/хв. протягом 40 хв.

Всі операції проводили при температурі 4°С. Одержану плазму розбавляли у 2 рази 0,1 М фосфатним буфером pH 7,4, додавали контрикал з розрахунку 10 тис. од. на 1 л плазми. Колонку врівноважували 0,05 М фосфатним буфером, pH 7,4. Розчин плазми наносили зі швидкістю 30 мл/год. Відмивку від неспецифічно зв'язаних білків проводили 0,05 М фосфатним буфером, pH 7,4 з 0,25 М NaCl до поглинання $E_{280}$ менше 0,01. Елюювали 0,2 М ε-АКК в 0,05 М фосфатному буфері, pH 7,4 зі швидкістю 40-50 мл/год. Об'єднували фракції з концентрацією білка вище за 0,05 мг/мл. Для подальшої очистки препарат, отриманий методом афінної хроматографії, висолювали

$(NH_4)_2SO_4$ з розрахунку 0,41 г на 1 мл елюату. Центрифугували (на центрифузі РС–6 при 2,5 тис. об/хв, 40 хв), осад розчиняли в 0,05 М фосфатному буфері, рН 7,4 та обробляли протягом 2 годин 5 мМ ДФФ при кімнатній температурі, з метою інгібування спонтанної активності домішкового плазміну. Потому проводили гель-фільтрацію на сефакрилі S-200. Отриманий таким чином препарат плазміногена зберігали при -20°С.

Чистоту одержаного препарату контролювали методом диск-електрофорезу у 10% ПААГ з ДС-Na. На електрофореграммі з зразком у відновлених умовах виявилась одна смуга, яка відповідає молекулярній масі плазміногена - 92кДа (рис.2.1.). Для встановлення форми отриманого препарату плазміногена було проведено електрофорез у 10 % ПААГ з оцтовою кислотою та сечовиною за рН 3,2 (Рис. 2.1.) [172]. Це дозволило стверджувати, що отриманий препарат є Глу-формою плазміногена.

Визначення протеолітичної активності отриманого препарату Глу-плазміногена показало, що вона складає 18 казеїнолітичних одиниць/мг білку [186]. В разі інкубації отриманого плазміногена протягом 6 годин з хромогенним субстратом $S_{2251}$ спонтанної активності у препараті не виявлено.

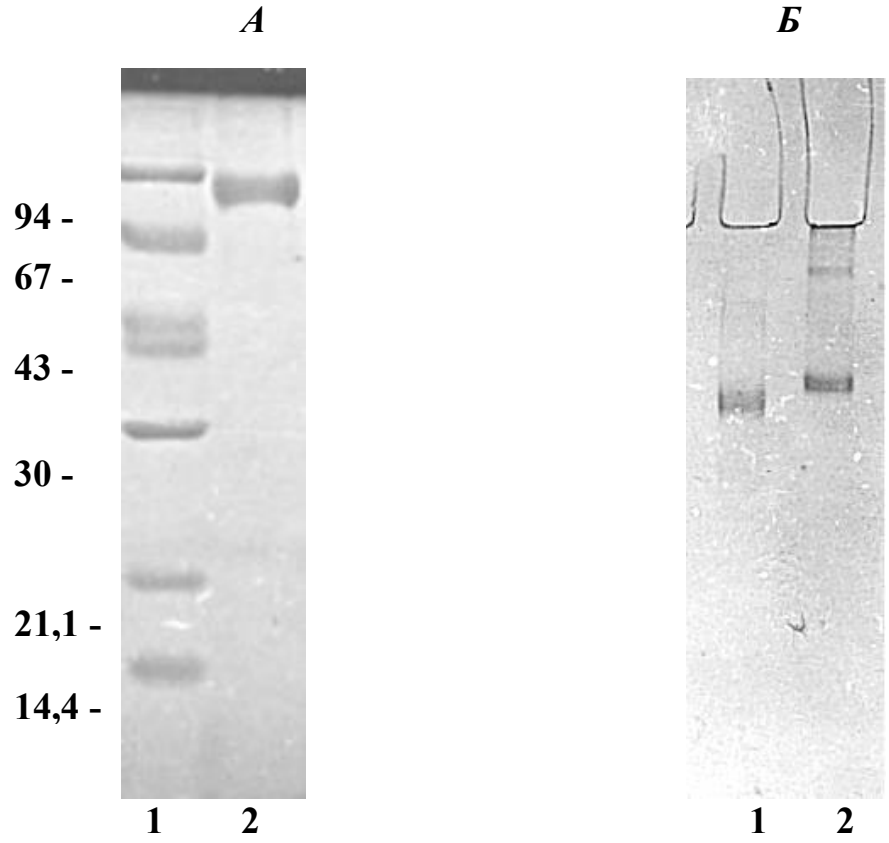


**Рис. 2.1.** *А* - Електрофореграма препаратів Пг в 8% ДС-Na-ПААГ за присутності β-меркаптоетанолу: 1 - білкові маркери (94, 67, 43, 30, 21,1; 14,4 кДа), 2 - Пг людини.

*Б* - Електрофореграма препаратів 1- Ліз-Пг, 2 - Глу-Пг в 10% ДС-Na-ПААГ pH 3,2.

*Одержання плазміну.*

Для активації плазміногена до плазміну було обрано метод з використанням іммобілізованої урокінази. Використання іммобілізованого активатора, завдяки його багаторазовості, значно спрощує та здешевлює методику. Окрім того, за такого підходу не потрібна додаткова очистка одержаного препарату плазміну від домішок активатора чи активаційних комплексів.

Плазмін одержували з препаратів Глу-плазміногена за стандартною методикою [252] з використанням імобілізованої на BrCN-сефарозі 4B урокінази. Плазміноген інкубували з імобілізованою урокіназою протягом 1 години при температурі 37$^{o}$C у 0,05 М трис-HCl буфері, pH 7,4 з вмістом 0,15

M NaCl, 25% гліцерину. Зберігали препарат плазміну в гліцерині, розведеному до концентрації від 25% до 50%, при температурі -18°С.

*Виділення та характеристика фібриногену.*

Фібриноген виділяли з оксалатної плазми крові людини шляхом висолювання сульфатом натрію. Фібриноген очищали від домішок плазміногена, обробляючи розчином лізину з наступним спиртовим переосадженням білка, чи афінною хроматографією на лізин-сефарозі [2]. Вміст фібриногену, що згортався під дією тромбіну, становив 96-98 %.

Препарати фібриногену були електрофоретично гомогенними за даними електрофорезу у 10% ПААГ (Рис.2.2.). Одержані препарати зберігали при -20°С.

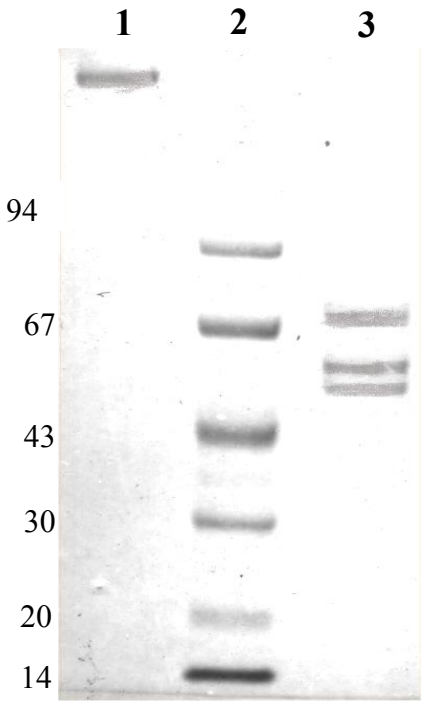


**Рис. 2.2.** Електрофореграма препаратів фібриногену.

1 - Фг людини за відсутності відновлюючого агента β-меркаптоетанолу; 2 - молекулярні білкові маркери; 3 - Фг людини за присутності відновлюючого агента β-меркаптоетанолу.

*Визначення кількості молекул середньої молекулярної маси.*

Для отримання фракції молекул середньої молекулярної маси, а також визначення їх вмісту в тканині використовували метод за Ніколайчиком. При проведенні досліду, всі маніпуляції проводилися на льоду, та на кожному кроці проводилася інкубація впродовж 15 хв. Високомолекулярні комплекси в біологічних матеріалах осаджували застосуванням 1,2 М HClO4 (співвідношення 1:1), на наступному етапі центрифугували при 5000 g впродовж 20 хвилин. Надосад нейтралізували застосуванням 5М КОН до pH 7,0, а потім суміш знову центрифугували, але вже при 2500 g впродовж 20 хвилин. Потім вносили етанол до фінальної концентрації 80%, та знову центрифугували при наступних умовах: 2500 g, 15 хвилин. Далі проводили вимірювання оптичної щільності на спектрофотометрі при довжині хвилі 210, 238, 254 нм. Довжини хвиль, на яких вимірювали оптичну густину використовуються для дослідження пептидів: 210 нм – це є максимумом поглинання пептидних зв'язків, 238 нм – амінопептидна фракція або низькомолекулярні пептиди, 254 нм – пептидна фракція у складі молекул середньої та низької маси.

*Отримання фракції пептидного пулу плазми крові.*

Виділення пептидного пулу проводилося за методом Ніколайчик. Всі операції проводилися на льоду. Після кожної маніпуляції проби витримували протягом 15 хв.

Плазму розморожували прогріванням на водяній бані (37 ˚С) протягом 20 хв, після чого розмішували обережним перевертанням пробірки та негайно поміщали на лід. Плазму осаджували у співвідношенні 1:1 1,2 М $HClO_4$ і центрифугували 15 хв за 10 тис. обертів/хв. На наступному етапі надоосадову рідину нейтралізували 5 Н КОН до pH 7,0. Суміш перемішували і центрифугували протягом 15 хв за 10 тис. обертів/хв. Надоосадову рідину переносили в мікропробірки і додавали у співвідношенні 1:5 96 % етиловий спирт і центрифугували протягом 15 хв за 10 тис. обертів/хв.

*Очищення пептидного зразка від високомолекулярної фракції білків.*

Для очищення розчиненого зразка пептидного пулу від залишків високомолекулярних білків використовували білкові концентратори – ультрафільтраційні пристрої для центрифугування з поліефірсульфоновою мембраною, що застосовуються для відділення молекул менше 10 кДа і можуть бути застосовані для зразків від 5 до 20 мл.

Центрифугували зразок пептидного пулу протягом 40 хв при 2000 обертів/хв.

*Діаліз.*

Пептидні зразки були розчинені у 0,1% розчині фосфатної кислоти або у буферному розчині Б, що можуть перешкоджати електрофоретичному аналізу та подальшому дослідженню пептидів. Для переведення пептидних зразків у воду проводили діаліз. Метод базується на здатності низькомолекулярних речовин проходити через напівпроникну мембрану на відміну від пептидів та високомолекулярних білків. Використовують діалізну мембрану, яка є полімером і має пори певної величини.

Для діалізу використовували напівпроникні мембрани SERVAPOR® з розміром пор 25 Å, через які пептиди не дифундували і залишалися всередині діалізного мішку. Молекули з меншим розміром проходили через пори діалізної мембрани і переходили у діалізат. Діаліз провидили проти води протягом 24 год, воду змінювали двічі.

*Ліофілізація.*

Пептидні зразки після діалізу заморожували при -20 °С перед проведенням ліофільного висушування. Проводили висушування зразків в замороженому стані під вакуумом, при цьому вода видаляється із заморожених об'єктів шляхом сублімації льоду, тобто перетворення його на пару, минаючи рідку фазу. Ліофільне висушування проводили протягом 6 год.

*Статистична обробка результатів*

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили, використовуючи комп'ютерні програми Origin 7.0, TotalLab 2.01. та Microsoft Exel. Достовірними вважали відмінності при $p<0,05$.

### 2.2.2. Гістологічні.

Для мікроскопічного дослідження забирали шматочки печінки у попередньо зважених тварин всіх груп. Шматочки фіксували в 10 % розчині формаліну, при цьому тривалість експозиції не перевищувала 1 – 2 доби. Застосований фіксуючий розчин запобігає процесу аутолізу та стабілізує клітини і тканини для їх подальшої обробки, та використання в процедурах забарвлення. Далі проводили дегідратацію шматочків в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафінові блоки. Виготовлені зрізи, товщиною 4 – 5 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином, метиленовим-синім та проводили імпрегнацію сріблом за методом Гордона-Світса (для виявлення базальних мембран, ретикулярних та незрілих колагенових волокон). Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виводу зображення з гістологічних препаратів [22].

### 2.2.3. Імуногістохімічні.

Для детекції субпопуляції CD86+ клітин у печінці експериментальних тварин використовували імуногістохімічний метод дослідження. Зрізи печінки (товщиною 4 мкм), що виготовляли з парафінових блоків за допомогою роторного мікротому AMR-400 (Amos scientific, Австралія), піддавали депарафінізації, повторно гідратували. Відновлення антигенів проводили в гістопроцесорі KOS (Milestone, Італія). У протоколі імуногістохімічного фарбування застосовували мишачі моноклональні первинні антитіла Anti-CD86 (BP2-44514-0,1 мг, Novus Biologicals, США) та полімерну систему детекції Mouse/Rabbit PolyVue™ HRP/DAB (Diagnostic BioSystems, США). Зрізи контрастно дофарбовували гематоксиліном Майєра (Biognost, Хорватія).

### 2.2.4. Електронно-мікроскопічні.

Для проведення субмікроскопічних досліджень печінки експериментальних щурів забирали зразки органу розміром 1 мм та фіксували в 1 % розчині чотирьохокису осмію за Колфільдом. Далі проводили зневоднення у спиртах зростаючої концентрації (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) та ацетоні. Отриману суміш заливали в епон-аралдит, відповідно до стандартних методик. З блоків виготовляли напівтонкі зрізи, які забарвлювали толуїдиновим синім і за Хаят. Після попередньої орієнтації на напівтонких зрізах на ультратомах LKB III (Швеція) та Reihart (Австрія) виготовляли ультратонкі зрізи, які контрастували 2 % розчином уранілацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К при збільшеннях в 4–10 тисяч раз.

### 2.2.5. Статистичного аналізу.

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили, використовуючи комп'ютерні програми Origin 7.0, TotalLab 2.01. та Microsoft Exel. Достовірними вважали відмінності при $p<0,05$.

# РОЗДІЛ 3
# БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS

Отрути змій, що є складною сумішю пептидів і білків, діють на різні життєво важливі системи організму. Одними з основних мішеней токсичних компонентів отрут змій є серцево-судинна система, нервова система, печінка та нирки. Присутні в отрутах білки та пептиди можуть діяти різноспрямовано, виявляючи як токсичні так і протекторні ефекти. Гемотоксичні отрути мають в основному змії сімейства *Viperidae*, що включає гадюк, щитомордників, гримучих та деяких інших змій. До складу гемотоксичних отрут входять переважно протеолітичні ферменти, що викликають різнонаправлені ефекти по відношенню до систем організму, які є ключовими мішенями впливу отрут. В літературі дуже багато приділено уваги до потенційного впливу зміїних отрут на дію систем гемостазу, нервової системи. В той же час дослідженнь потенційного впливу компонентів зміїних отрут на функцінування печінки досить мало, але зважаючи на ключові функції в організмі цього органу представляє певну актуальність досліження тих змін в печінки, які можуть бути спричиненні впливом зміїної отрути.

На першому етапі дослідження було проаналізовано вміст загального білка у гомогенаті печінки щурів з моделлю гострої токсичності, індукованої введенням зміїних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. Відповідно до одержаних результатів (табл.3.1), введення отрути призводить до зниження вмісту загального білка в досліджуваному органі.

*Таблиця 3.1*

Вміст загального білка в тканині печінки, мг/г тканини

| | Контроль | *Vipera berus berus* | *Vipera berus nikolskii* |
|---|---|---|---|
| Печінка | 112,23±1,87 | 78,15±3,53* | 50,19±2,53* |

* – $p<0,05$ порівняно зі значеннями в контролі

Так, вміст білка в гомогенаті печінки тварин, яким вводили отруту *Vipera berus berus,* був нижчим у 1,43 рази у порівнянні зі значенням у групі контрольних тварин; введення отрути *Vipera berus nikolskii* обумовлювало більш виражені зміни досліджуваного показника – вміст білка знижувався у 2,23 рази і становив 50,19±2,53 мг/г органу у порівнянні з 112,23±1,87 мг/г органу у групі контрольних тварин.

Враховуючи важливість підтримання білкового гомеостазу та відносно високу стабільність показника вмісту білка за умов розвитку патологій різної етіології, виявлене нами зниження вмісту загального білка в печинці є свідченням ураження даного органу у відповідь на введення зміїної отрути. Печінці відводиться ключова роль у процесах знешкодження сполук, саме детоксикаційна активність печінки визначає здатність організму протистояти розвитку токсичних синдромів у відповідь на зростання вмісту ендо- чи екзогенних токсинів. Тому зниження вмісту білка у печінці тварин з моделлю гострої токсичності, індукованої введенням зміїної отрути, може призвести до зниження активності мікросомальних ферментів, а відтак, зниження швидкості елімінації токсичних метаболітів. Варто зазначити, що зниження вмісту загального білка є однозначним свідченням зниження метаболічної активності органу.

Зниження вмісту загального білка може бути сигналом того, що в досліджуваному органі активізувались механізми катаболізму і ці механізми почали переважати процеси анаболізму та можуть негативно вплинути як на функціонування самого органу, так і на функціонування орагнізму вцілому. Це

в свою чергу може призвести до запуску нефізіологічних біохімічних механізмів, що можуть ініціювати розвиток різноманітних станів як досліджуваного органу так і орагнізму, що мають патологічну спрямованість.

Таким чином, беручи до уваги ключову роль печінки у підтриманні та координації метаболізму, а також її детоксикаційну функцію, виявлені нами порушення слугують негативним прогностичним критерієм.

Для більш детальної оцінки білкової складової було досліджено білковий профіль у печінці тварин з моделлю гострої токсичності, зокрема проаналізовано співвідношення фракцій білків різної молекулярної маси. Результати електрофоретичного аналізу представлено у таблиці 3.2 як відносний вміст білків різної молекулярної маси.

*Таблиця 3.2*

Аналіз білкової складової печінки за допомогою диск-електрофорезу

| | Контроль | | Vipera berus berus | | Vipera berus nikolskii | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій |
| ≥ 150 кДа | — | — | - | - | — | — |
| 150-100 кДа | 4,27 | 1 | 8,96 | 1 | — | — |
| 100-67 кДа | 18,86 | 3 | | - | 4,32 | 1 |
| 67-35 кДа | 28,02 | 3 | 28,99 | 2 | 20,63 | 3 |
| 35-10 кДа | 29,25 | 2 | 62,06 | 2 | 57,96 | 3 |
| ≤ 10 кДа | 19,61 | 1 | - | - | 17,09 | 1 |

Встановлено, що у гомогенаті печінки (табл.3.2) відносний вміст білків з молекулярною масою 10-35 кДа та 35-67 кДа становив 29% і 28%, а відносний вміст білків з молекулярною масою менше 10 кДа та 67-100 кДа був на рівні 19% та 18%. У тварин з моделлю гострої токсичності, індукованої введенням зміїної отрути, спостерігалися зміни вмісту білкових фракцій різної молекулярної маси, зокрема знижувався вміст білків вищої молекулярної маси на фоні зростання вмісту білків нижчої молекулярної маси.

У гомогенаті печінки було виявлено зростання відносного вмісту білків з молекулярною масою 10-35 кДа – у 2,13 рази за введення тваринам отрути *Vipera berus berus* та у 1,99 рази за введення отрути *Vipera berus nikolskii.* Варто зазначити, що на відміну від ефектів, що спостерігалися за введення отрути *Vipera berus nikolskii*, введення щурам отрути *Vipera berus berus* супроводжувалося зростанням відносного вмісту білків з молекулярною масою 100-150 кДа. Так, даний показник перевищував значення контролю у печінці в 2 рази.

Однією з причин виявленого нами зниження вмісту загального білка може бути посилення деградації клітинних білків внаслідок посилення протеолізу. Окрім того, зниження вмісту білка може бути результатом посилення процесів видалення структурно-модифікованих білків, накопичення яких зазвичай спостерігається за умов гострого оксидативного стресу. У сучасній науковій літературі з даної проблематики представлено низку робіт, де автори демонструють значне зростання вмісту активних кисневих метаболітів у відповідь на введення отрут, а відтак цілком можливою є окисна деструкція білків та активізація протеосомного шляху видалення пошкоджених білкових молекул.

Проте беручи до уваги виявлені у ході нашого дослідження зміни білкового профілю, а саме зростання частки низькомолекулярних білків на фоні зниження рівня білків з вищою молекулярною масою, більш вірогідною причиною зниження вмісту загального білка видається посилення протеолізу, спричинене активізацією клітинних протеїназ. Для перевірки даного

припущення, зразки гомогенату печінки тварин з моделлю гострої токсичності, викликаної введенням зміїних отрут, було проаналізовано методом ензим-електрофорезу в ПААГ з використанням низки субстратних білків заполімеризовних безпосередньо у гель. Обраний методичний підхід дозволяє досить швидко та інформативно оцінити загальний стан протеолізу в органі. Для більш повної характеристики як субстратні білки нами було обрано желатин, фібриноген та колаген. Результати ензим-електрофоретичного аналізу, отримані в ході дослідження, дозволяють говорити про зростання активності протеолітичних ферментів в досліджуваному органі у відповідь на введення зміїних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. Результати даних досліджень представленно в таблицях 3.3-3.5.

*Таблиця 3.3*

Аналіз складу ензимів в тканині печінки методом ензим-електрофорезу (субстрат желатин)

| | Контроль | | Vipera berus berus | | Vipera berus nikolskii | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій |
| ≥ 150 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 150-100 кДа | -- | -- | 37,4 | 1 | 63,16 | 1 |
| 100-67 кДа | 57 | 1 | 29,22 | 1 | 7,58 | 1 |
| 67-35 кДа | 43 | 1 | 33,38 | 2 | 29,26 | 3 |
| 35-10 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| ≤ 10 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

*Таблиця 3.4*

Аналіз складу ензимів в тканині печінки методом ензим-електрофорезу (субстрат фібриноген)

| | Контроль | | Vipera berus berus | | Vipera berus nikolskii | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій |
| ≥ 150 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 150-100 кДа | 71,85 | 2 | 72,82 | 3 | 76,11 | 3 |
| 100-67 кДа | 1,51 | 1 | 18,7 | 1 | 6,77 | 2 |
| 67-35 кДа | 26,63 | 3 | 8,48 | 4 | 17,14 | 3 |
| 35-10 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| ≤ 10 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

*Таблиця 3.5*

Аналіз складу ензимів в тканині печінки методом ензим-електрофорезу (субстрат колаген)

| | Контроль | | Vipera berus berus | | Vipera berus nikolskii | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій | Band % | К-сть фракцій |
| ≥ 150 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 150-100 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| 100-67 кДа | 43 | 1 | 22,46 | 2 | 37,18 | 4 |
| 67-35 кДа | 57 | 1 | 77,55 | 2 | 62,81 | 2 |
| 35-10 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| ≤ 10 кДа | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

Подібно до результатів визначення вмісту загального білка, більш виражені ефекти спостерігалися за умов токсичності, викликаної введенням отрути *Vipera berus nikolskii.* У цілому, за введення зміїних отрут було відмічено два типи ефектів – введення отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* призводило до зростання активності ферментів, що присутні в органах за фізіологічних умов. Свідченням цього є більш інтенсивні зони гідролізу у зразках гомогенату печінки тварин з моделлю гострої токсичності у порівнянні з результатами у групі контрольних тварин. Окрім того, введення отрут призводило до появи у площині гелі смуг гідролізу, що відсутні у печінці контрольних тварин. Так, за введення отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* на ензим-електрофореграмах з використанням як субстрату желатину з'являються смуги, що відповідають фракції білків з молекулярною масою 100-150 кДа.

Зважаючи на те, що більшість протеолітичних ферментів мають молекулярну масу нижче 100 кДа, можливо припустити, що поява даних активних зон за дії досліджуваних зміїних отрут є наслідком дії захисних механізмів та систем організму на підвищення активності протеолітичних ферментів та утворення ковалентних комплексів з цими ферментними білковими молекулами, які не є їх інгібіторами, але які можуть зв'язуватись з цими молекулами та не дозволяти їм виконувати сові функції, що в свою чергу може приводити до певної нормалізації білкового метаболізму в даному органі.

Ми можемо ідентифікувати ці потенційні нові білкові молекули/білкові комплекси використовуючи метод ензим-електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію тому, що ми створюємо штучні умови для прояву цими білковими молекулами/комплексами ферментативної активності відносно тих субстратів, що було використано.

Таким чином, введення тваринам зміїних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* призводить до ураження печінки, що виявляється у зниженні вмісту загального білка та активізації процесів протеолізу.

Отримані дані стосовно підсилення процесів протеолізу, перерозподілу білкових фракцій та зниження вмісту загального білка можуть говорити про появу більшої кількості молекул білкового походження ,що мають молекулярну масу нижче 10 кДа, а ще вирогідніше – 5 кДа та які за своєю будовою представляють собою пептиди чи низькомолекулярні фрагменти білкових молекул.

В той же час токсичний вплив досліджуваних зміїних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* може призводити до появи так званих «молекул средньої маси», які сукупно характеризують патологічний метаболізм, тому наступним епатом даного дослідження є аналіз рівня цих молекул та аналіз якісного складу пептидної складової цих молекул у гомогенаті печінки тварин з моделлю гострої токсичності, індукованої введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*. Згідно сучасної парадигми, накопичення у тканинах та біологічних рідинах організму МСМ є універсальним і неспецифічним маркером, що відображає рівень патологічного метаболізму, зокрема білків, та корелює з основними клінічними і лабораторними прогностичними критеріями метаболічних порушень. З літератури відомо, що токсичні синдроми незалежно від їх етіології супроводжуються розвитком гострого ендотоксикозу, спричиненого активізацією катаболізму, некротичною загибеллю клітин на фоні зниженням детоксикаційного резерву. Саме тому визначення вмісту МСМ як типового маркера, що характеризує стан ендогенної інтоксикації, є особливо доцільним в умовах нашого дослідження. Аналіз кількісних і якісних показників молекул середньої молекулярної маси дозволить визначити ступінь вираженості ендогенної інтоксикації, що може бути використано як критерій об'єктивної діагностики змін метаболічного статусу організму за токсичних станів, спричинених отруєнням.

Пул МСМ є гетерогенним за складом і включає низку молекул різної хімічної природи - пептиди, вільні амінокислоти, продукти розпаду білків, ліпідів, пуринові і піримідинові основи, аміноцукри і т.д. Тому для детальної

характеристики загального пулу МСМ виміри доцільно проводити за різних довжин хвиль. Такий підхід дозволяє оцінити внесок окремих класів сполук у зміни вмісту загальної фракції МСМ. Так, за довжини хвилі 210 нм визначаються пептидні молекули з молекулярною масою до 5 кДа; за 254 нм - неароматичні сірковмісні сполуки, у тому числі амінокислоти цистеїн, цистин, метіонін. Виміри за довжини хвилі 254 нм дозволяють оцінити внесок продуктів деградації нуклеїнових кислот. Результати визначення відносного вмісту МСМ у печінці щурів наведено, відповідно, у табл. 3.6

Як видно з представлених даних, гомогенат печінки контрольних тварин містить фракції МСМ, що реєструються за всіх трьох довжин хвиль. Найбільшим є вміст пептидних молекул - їх відносний вміст становить 11,05±0,97 ум.од/г органу, вміст молекул, що реєструються за довжини 254 нм є найменшим і становить 0,53±0,03 ум.од/г тканини для печінки.

*Таблиця 3.6*

Вміст МСМ в тканині печінки, ум.од./г тканини

| | Контроль | Vipera berus berus | Vipera berus nikolskii |
|---|---|---|---|
| 210 нм | 11,05±0,97 | 15,63±1,87* | 18,17±1,22* |
| 238 нм | 1,30±0,08 | 13,17±2,69* | 21,76±0,88* |
| 254 нм | 0,53±0,03 | 10,80±1,55* | 14,02±0,26* |

* – $p<0,05$ порівняно зі значеннями в контролі

За умов гострої токсичності, індукованої введенням отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii*, спостерігається зростання відносного вмісту МСМ в досліджуваному органі. В гомогенаті печінки тварин з моделлю гострої токсичності, викликаної введенням отрути *Vipera berus berus,* відносний вміст МСМ, що реєструються при 210 нм, 238 нм, 254 нм перевищував значення контролю у 1,42 рази, 10 та 20 разів, відповідно. Введення отрути *Vipera berus nikolskii* призводило до ще більш виражених змін

досліджуваних показників - у 1,65 рази (при 210 нм), 16,7 рази (при 238 нм) та 2,64 рази (при 254 нм).

За нормальних умов більшість МСМ, зокрема гідрофільної природи, видаляються переважно шляхом гломерулярної фільтрації, при цьому основна частина МСМ розщеплюється та інактивується у проксимальних тубулах нирок. Елімінація гідрофобних ендотоксинів, які виявляють високу спорідненість до біологічних структур, здатні легко проникати крізь клітинні мембрани, а тому є особливо небезпечними, відбувається за участі монооксигеназної системи гепатоцитів. З цих позицій виявлене нами значне зростання відносного вмісту МСМ у печінці та нирках тварин за умов введення зміїних отрут є негативним прогностичним критерієм, який вказує на зміни метаболічного профілю досліджуваних органів та розвиток гострого патологічного процесу. Слід зазначити, що накопичення МСМ - це не лише свідчення розвитку ендогенної інтоксикації, а й чинник, що ускладнює перебіг захворювання та сприяє генералізації патологічного процесу. МСМ виявляють низку біологічних ефектів, у тому числі нейротоксичну активність; окремі компоненти пулу МСМ здатні пригнічувати реакції біосинтезу білка, модулювати активність ряду ферментів; доведеною є їх здатність роз'єднувати процеси окиснення та фосфорилювання у мітохондріях. Виявляючи тропність до клітинних рецепторів МСМ здатні впливати на інтенсивність та спрямованість клітинних реакцій.

Відповідно до літературних джерел, основна частина пулу МСМ представлена продуктами розпаду білків, зокрема пептидами. З огляду на високу біологічну активність пептидів та їх здатність впливати на перебіг окремих обмінних процесів, нами було виділено та проаналізовано якісний та кількісний склад пептидного пулу печінки тварин за введення зміїних отрут. Одержання пептидного пулу проводили за стандартною методикою, яка включає осадження білкової компоненти $HClO_4$ та подальше доосадження пептидів охолодженим етиловим спиртом. Для підтвердження відсутності у пробах домішок з молекулярною масою вище 5 кДа отримані пептидні фракції

було проаналізовано методом електрофорезу у пластинах 18% поліакриламідного гелю. Результати проведеного аналізу представлено на рисунку 3.1.

Пептиди відрізняються багатьма характеристиками, такими як розмір, гідрофобність і заряд. Дана фізико-хімічна різноманітність також зростає завдяки пост-трансляційним модифікаціям, включаючи окислення, ацетилювання, фосфорилювання і глікозилювання. Як наслідок цього природного різноманіття, досягнення виділення специфічних пептидів з комплексної суміші одним методом очищення є доволі складним.

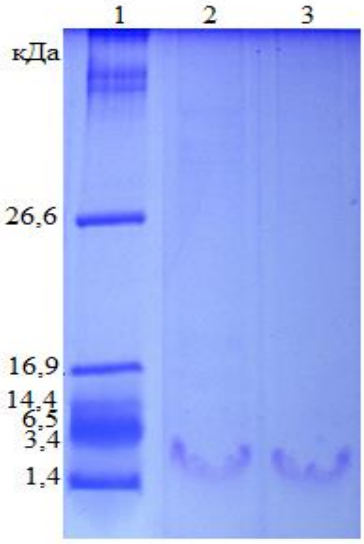


**Рис. 3.1.** Типова електрофореграма фракцій пептидних пулів, отриманих з:

1 – набір стандартів молекулярної маси РР;

3 – гомогенат печінки

Для вирішення цієї проблеми, кілька методів очищення пептидів можна виконувати послідовно над одним зразком [91], однак цей підхід збільшує час підготовки і аналізу зразків, а також ймовірно обмежує відтворюваність методу.

Доступні різні методи для виділення специфічних пептидних фракцій. Було розроблено декілька протоколів екстракції для очищення пептидів, що містять специфічні амінокислоті залишки, включаючи цистеїн [140], триптофан [88] або метіонін [98]. Різноманітні методи доступні для ізоляції фосфопептидів, які засновані на диференційній взаємодії фосфопептидів з металами, включаючи діоксид титану [227]. Нещодавно показано, що аденозин трифосфат, використовуваний в якості металевого носія, забезпечує високочутливу і селективну фосфопептидну екстракцію [264]. Глікопептиди були отримані з комплексних зразків численними методами. Для екстракції пептидів використовують гідрофільну рідинну хроматографію з різними стаціонарними фазами, включаючи мікрокристалічну целюлозу [242], цвітеріонні матеріали [163] та моносахариди [261]. Глікопептиди також можуть бути екстраговані матеріалами на основі боронових [256] і гідразинових [139] речовин. Лектини також зазвичай використовують для виділення глікопептидів, що містять специфічні моносахариди в їх гліканфрагменті [117].

У подальшому отриманий пептидний пул було фракціоновано методом хроматографії, що поділяє за розмірами (таблиця 3.7).

*Таблиця 3.7*

Якісно-кількісний склад пептидної фракції в тканині печінці

| Стан/кількість піків | Площа піку, ум.од. | Молекулярна вага, Да |
|---|---|---|
| Контроль | | |
| 1 | 0,10263 | 1986 |
| 2 | 0,07391 | 1378 |
| 3 | 0,00562 | 1107 |
| Vipera berus berus | | |
| 1 | 0,06495 | 2019 |
| 2 | 0,10006 | 1391 |
| Vipera berus nikolskii | | |

| | | |
|---|---|---|
| 1 | 0,15659 | 1910 |
| 2 | 0,0782 | 1307 |
| 3 | 0,00478 | 1067 |
| 4 | 0,00312 | 1026 |
| 5 | 0,0074 | 798 |

Аналізуючи отримані результати можемо відмітити певні порушення у складі пептидного пулу печінки за введення зміїних отрут, які виявляються у зміні відносного вмісту пептидів певної молекулярної маси та появи молекул, відсутніх у зразках контрольної групи. Згідно одержаних результатів, печінка контрольних тварин містить набір пептидів з молекулярною масою від 1107 Да до 1986 Да, які представлено трьома домінуючими фракціями. Відсоток пептидів з найвищою молекулярною масою становить 56% для даного органу.

Аналіз якісного складу пептидів за введення отрути *Vipera berus berus* виявив, що кількість піків, що відповідають фракціям пептидів певної молекулярної маси, знижувалась з 3 піків у печінці контрольних тварин до 2 піків у печінці тварин з моделлю гострої токсичності та молекулярна маса цих фракцій пептидних молекул була відмінною від показників у тварин з контрольної групи. Аналіз пептидного пулу тварин, що зазанали впливу отрути *Vipera berus nikolskii* показало збільшення фракцій пептидних молекул до 5 та певний перерозподіл молекулярної маси цих піків по відношенню до групи контрольних тварин.

Отримані результати стосовно складу пептидного пулу даного органу показує, що за дії досліджуваних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* ми спостерігаємо значну активацію протеолітичних процесів в досліджуваному органі та характер цих процесів відрізняється в залежності від отрути, яка вводилась досліджуваним тваринам. З огляду на все вишевикладене представляє певний інтерес дослідження кількісного складу металоматричних протеїназ в досліджуваному органі.

Активність даних ферментів у тканинах залежить від рівня активності їх генів та від наявності безпосередніх активаторів та інгібіторів ферментів у навколишньому середовищі [241]. *In vivo* активність MMPs контролюється на кількох рівнях. Зазвичай ці ферменти експресуються в дуже невеликих кількостях і їх транскрипція регулюється, як у позитивну, так і негативну строну гормонами, цитокінами і факторами росту, такими як інтерлейкіни (IL 1, IL 4, IL 6), що трансформують фактори росту (EGF, HGF, TGFβ) або фактором некрозу пухлин альфа (TNF-α). Деякі з цих молекул можуть інактивуватися протеолітичним шляхом за допомогою MMPs (ефект зворотного зв'язку). На посттранскрипційному рівні активність ММР обмежується їх латентністю, що підтримується пропептидом, розташованому на N кінці молекули новоствореного проферменту. Активація MMPs, що йде за їх секрецією з клітини, залежить від руйнування продомену, що взаємодіє з каталітичним сайтом, яке може статися при конформаційних змінах або при протеолітичному відщепленні продомену. MMPs, які містять фурин-подібні домени розпізнавання у своїх пропептидах (ММР 11, MT-MMPs, ММР 28) можуть активуватися в транс-відділі комплексу Гольджі членами сімейства серинових протеїназ [*MT-MMPs*]. Позаклітинна протеолітична активація секретованих MMPs може здійснюватися за допомогою серинових протеїназ, таких як плазмін. Після активації ММР їх функції далі регулюються ендогенними інгібіторами, аутодеградацією і селективним ендоцитозом. Показаний ендоцитоз ММР-2, -9 та -13 за допомогою протеїну, що відноситься до рецептора ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ). При подальшій секреції клітини ММР 9 здатна зв'язуватися на поверхні клітини, і таким чином вона захищена від впливу локальних інгібіторів [241]. Безпосередньо пошкодження або сам інфекційний агент можуть активувати систему ММР через підвищене утворення вільних радикалів та/або недостатню їх інактивацію. Активація MMPs вільними радикалами здійснюється прямою дією супероксиду на алостеричний центр ферменту та активацією факторів транскрипції NF-κB, що підвищує транскрипцію генів MMPs [257]. Відомо, що

статеві стероїди (естрогени і особливо прогестерон) контролюють продукцію та активність ММР через розгалужену мережу локальних регуляторів, включаючи цитокіни. Ця мережа оберігає інтеграцію ендометрію під час секреторної та проліферативної фаз. Була вивчена експресія генів деяких MMPs та їх інгібіторів у різні фази менструального циклу, і були отримані дані, що гени ММР 1, ММР 2, ММР 3, ММР 7, TIMP 1, TIMP 2 і TIMP 3 максимально експресуються під час менструації. Експресія мРНК ММР 1, ММР 8 і ММР 3 збільшена в менструальну фазу, на відміну від експресії мРНК ММР 7, найбільш широко представлена в проліферативну фазу. Високі рівні мРНК ММР 10 у пізніх секреторних зразках надалі підвищуються ще більше, досягаючи піку в менструальну фазу, таким чином, ММР 10 є специфічною менструально асоційованою ММР. А мРНК ММР 7 експресується на високому рівні під час ранньої проліферативної фази і не зменшується так само, як мРНК ММР 1 і ММР 3 в секреторну фазу циклу. Механізм регуляції експресії генів MMPs стероїдами яєчників пояснюється наявністю в промоторних ділянках генів, що кодують MMPs, спеціальних зв'язувальних послідовностей, включаючи активаторний білок (АР 1), ССААТ/енхансер-зв'язуючий білок (ПЕВР) та Е26 специфічний транскриптор. Однак ці послідовності, організовані в різному порядку в промоторах ММР 1, ММР 3, ММР 10 порівняно з такими ММР 8 і ММР 7, і, таким чином, здійснюють здатність різної взаємодії між цими генами [240].

Ми проаналізували вміст металоматриксних протеїназ в досліджуваному органі за дії отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* та також вміст їх інгібітору – ТІМП (таблиця 3.8). Ми спостерігаємо поступове зростання вмісту всіх досліджуваних ММП та їх інгібітору за дії обох досліджуваних отрут. Результати показують, що вплив отрути *Vipera berus nikolskii* має більш виражений характер в бік зростання вмісту металоматриксних протеїназ, що свідчить про більш агресивний влив цієї отрути в порівнянні з отрутою *Vipera berus berus*.

Отримані дані повністтю корелюють з даними, отриманими іншими методами, та показують можливі механізми появи нетипових молекул білкового походження в даному органі, так і появу фізіологічно нетипових сигнальних шляхів, в яких дані френмти відіграють ключову роль.

*Таблиця 3.8*

Аналіз вмісту металоматриксних протеїназ в тканині печинці за дією отрути *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii,*
ум. од·мг$^{-1}$ білка

| | Контроль | *Vipera berus berus* | *Vipera berus nikolskii* |
|---|---|---|---|
| ММП-1 | 43,17 ± 2,52 | 53,30 ±0,97* | 58,52 ±0,43* |
| ММП-2 | 70,21 ± 5,79 | 86,68 ±1,46* | 93,21 ±2,61* |
| ММП-3 | 81,08 ± 1,19 | 100,10 ±2,81* | 118,87 ±1,76* |
| ММП-8 | 41,67 ±3,80 | 51,44 ±1,45* | 58,52 ±1,71* |
| ММП-9 | 89,57 ± 9,54 | 110,58 ±1,28* | 124,87 ±0,83* |
| ММП-10 | 111,54 ± 7,47 | 137,70 ±1,72* | 141,34 ±1,34* |
| ТІМП | 81,46 ± 1,09 | 100,57 ±1,14* | 116,61 ±1,55* |

* – $p<0,05$ порівняно зі значеннями в контролі

Так зафіксоване зростання вмісту металоматричних протеїназ-1, -3, -8 в тканині печинці щурів, які зазнали впливу досліджуваних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* говорить про запуск певних компенсаторних механізмів, які направлені на потенційну нормалізацію функціонування даного органу. З літератури відомо, що тимчасова «надмірна» експресія ММП-1, -2, -3 та -8 в печінці ефективно послаблювала фіброз та індукувала проліферацію гепатоцитів у щурів. З цього, можна зробити припущення, що зростання вмісту ММП-1, -2, -3 та -8 в тканинах печінки щурів є сигналом до підвищення протеолітичної активності металопротеїназ для запобігання

розвитку фіброзу печінки за впливу досліджуваних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* [187].

Отримані дані по потенційному впливу досліджуваних зміїних отрут *Vipera berus berus* та *Vipera berus nikolskii* на стан білкового метаболізму тканини печінки показав суттєвий зсув процесів протеолізу в даному органі, з появою нетипових білкових молекул різного ступеня орагнізації (білки, пептиди). Це свідчить про те, що компоненти досліджуваних зміїних отрут мають прямий та/або опосередкований вплив на компоненти системи протеолізу та можуть призводити до запуску неконтрольованих та фізіологічно нетипових сигнальних шляхів та біохімічних реакцій, в яких ключовими агентами будуть відігравати як патологічне підвищення активності та вмісту окремих компонентів протеолітичної системи даного органу, так і фізіологічно нетипові білкові молекули, що з'являються в даному органі за дії досліджуваних зміїних отрут. Це все, в свою чергу може провокувати появу та прогресування різноманітних патологічних станів як досліджуваного органу, так і організму в цілому.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в одній статті журналу (США), що відноситься до наукометричної бази Scopus [161] та одних тезах науково-практичної конференції [16].

# РОЗДІЛ 4
# МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS

## 4.1. Морфологічна характеристика печінки щурів контрольної групи тварин

Гістологічні дослідження препаратів печінки тварин першої інтактної групи показали, що ззовні орган вкритий сполучнотканинною капсулою. Пухка волокниста сполучна тканина добре розвинена у ділянці портального тракту, проте погано виражена між часточками, що є структурно-функціональною одиницею печінки. Печінкові часточки мають неправильну, полігональну, гексагональну форму, межі яких не мають чіткого контуру або ледь помітні. До складу класичної часточки входять радіально орієнтовані печінкові балки, що мають звивистий хід, анастомозують між собою і сходяться до центральної вени безм'язового типу, яка розташована у її центрі (рис. 4.1).

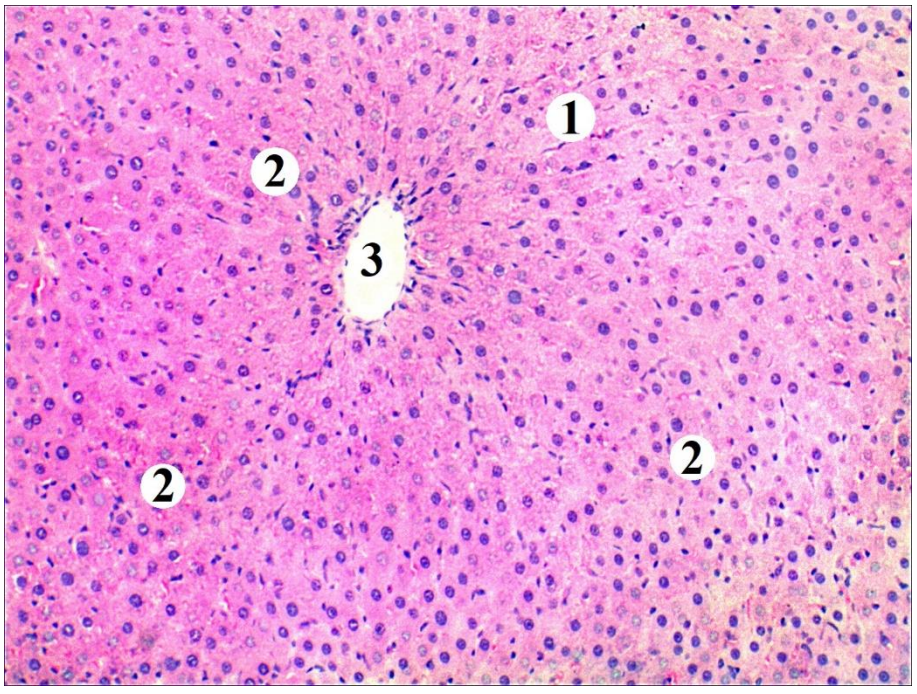

**Рис. 4.1.** Мікроскопічна будова печінки інтактної групи тварин. 1 – печінкові балки, 2 – гепатоцити, 3 – центральна вена. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Головними клітинами печінки є гепатоцити, які входять до складу печінкових балки і формують паренхіму органу. Це клітини полігональної форми із помірно оксифільною цитоплазмою, у якій виявляються одне, рідше два світлих ядра із ядерцями. Форма ядер округла, у каріоплазмі переважає еухроматин та визначаються невеликі базофільні грудочки гетерохроматину.

У складі стінки синусоїдів виявляються поодинокі зірчасті макрофаги печінки (клітини Купфера). У перисинусоїдальному просторі (простір Діссе), який сформований стінкою печінкових синусоїдних гемокапілярів та васкулярною поверхнею гепатоцитів печінкової трабекули виявляються поодинокі жиронакопичувальні клітини Іто.

Між печінковими пластинками розміщені синусоїдні гемокапіляри, у яких виявляються поодинокі формені елементи крові. Стінка синусоїдів представлена одношаровим плоским епітелієм (ендотелієм), ендотеліоцити характеризуються плоскою, видовженою формою із паличкоподібним базофільним ядром. У кутах класичної печінкової часточки локалізуються печінкові тріади, до складу яких входять міжчасточкова вена, артерія і жовчна протока, які залягають у прошарках пухкої сполучній тканині (рис. 4.2). Просвіт міжчасточкової вени широкий, це судина із слабким розвитком м’язових елементів. У стінці міжчасточкової артерії у середній оболонці наявні гладкі міоцити, що вказує на те, що це артерія м’язового типу. Стінка міжчасточкової жовчної протоки утворена одношаровим кубічним епітелієм. Крім тріад на кутах часточки виявляються лімфатичні судини, такий комплекс формує портальний простір.

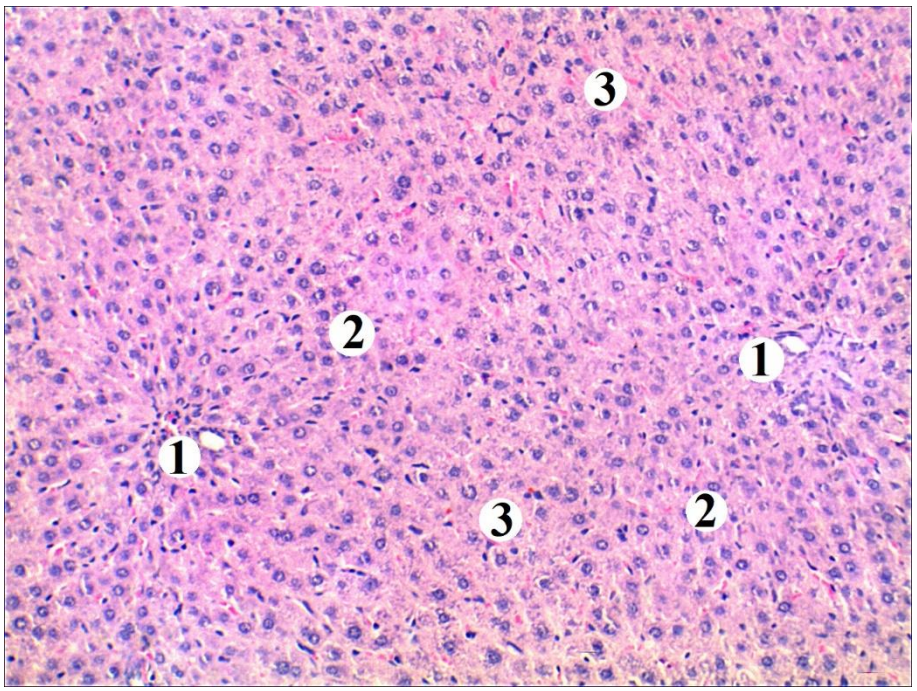


**Рис.4.2.** Мікроскопічний стан печінки інтактної групи тварин. 1 – печінкова тріада, 2 – гепатоцити, 3 – синусоїдні гемокапіляри. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Проведені морфометричні дослідження печінки інтактної групи тварин показали, що середнє значення площі гепатоцитів становить (185,21 ± 9,16) мкм², середнє значення площі ядер гепатоцитів становить (35,40 ± 1,75) мкм², тоді як середнє значення площі цитоплазми дорівнює (149,81 ± 7,48) мкм². Відповідно ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів печінки інтактної групи тварин складає 0,236 ± 0,011.

Гістохімічне дослідження сукцинатдегідрогенази, ферменту який локалізується в цитоплазмі гепатоцитів печінки і споріднений із мітохондріями показало, що за методом Нахласа нітро-синій тетразоль випадає в осад у вигляді гранул диформазану синього кольору і вказує на наявність даного ензима. У гістологічних препаратах печінки інтактної групи тварин виявляються у цитоплазмі гепатоцитів дуже багато порохоподібно-аморфного та відсутні великі гранули осаду барвника і гранули диформазану, які рівномірно розташовані по всій ділянці класичної часточки (рис. 4.3). Середнє значення цитохімічного коефіцієнта активності

сукцинатдегідрогенази у гепатоцитах печінки тварин інтактної групи дорівнює 4,83 ± 0,24.

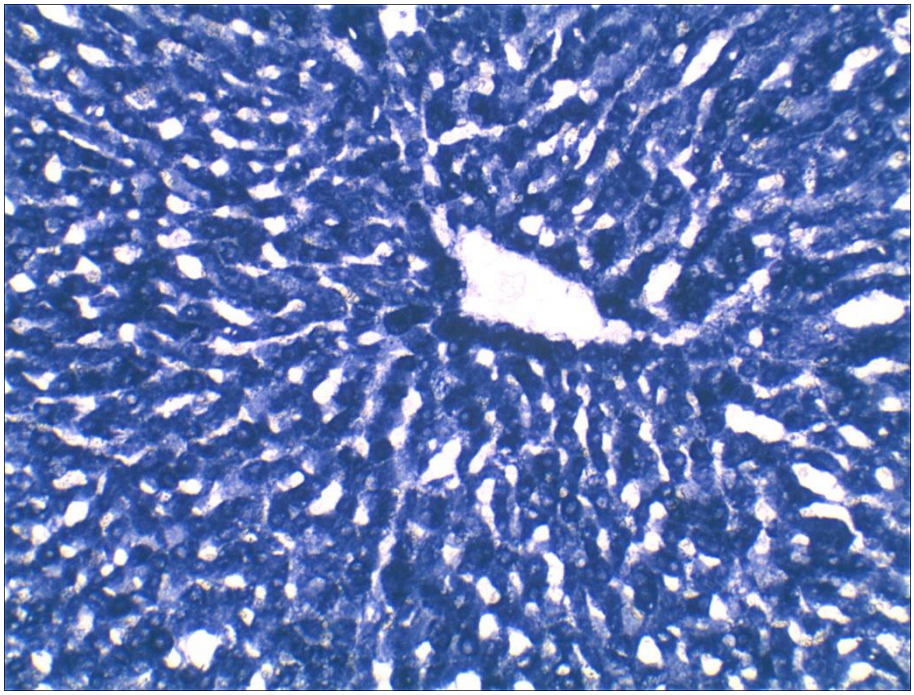

**Рис. 4.3.** Активність сукцинатдегідрогенази в гепатоцитах печінки тварин інтактної групи у вигляді інтенсивно забарвлених грудок диформазану. Метод Нахласа. Збільшення: х 200.

Гістохімічне дослідження глікогену у гепатоцитах печінки інтактної групи тварин показало, що дана трофічна сполука накопичується рівномірно у цитоплазмі клітин у вигляді великих та дрібних грудок рожево-червоного забарвлення (рис. 4.4). Середнє значення цитохімічного коефіцієнта вмісту глікогену в печінці складає 4,97 ± 0,25.

**Рис. 4.4.** Активність глікогену в цитоплазмі гепатоцитах печінки інтактної групи тварин, який локалізується у цитоплазмі та має вигляд малинових грудок. Метод Шабадаша. Збільшення: х 400.

Імуногістохімічне дослідження антигена CD86, який експресується в клітинах моноцитарно-макрофагальної лінії, що у тварин контрольної групи у перипортальних та центролобулярних ділянках класичних печінкових часточках спостерігалася слабка (+--) або негативна реакція (---). Між типовими печінковими балками, що сформовані гепатоцитами, розташовані просвіти синусоїдних гемокапілярів у стінці яких локалізуються тіла $CD86^+$ клітин із характерною світло-коричневою цитоплазмою та добре розвиненими відростками (рис.4.5).

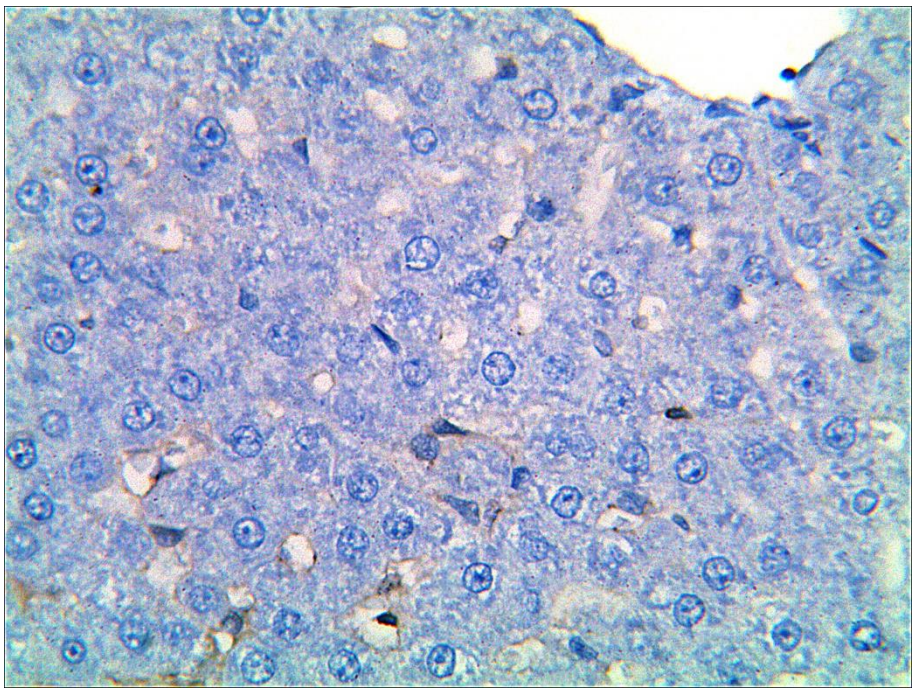

**Рис. 4.5.** Слабовиражена експресія CD86 на поверхні клітин у центролобулярній ділянці печінкової часточки щурів інтактрої групи. Імуногістохімічна реакція застосування антитіла CD86. Забарвлення гематоксиліном Майера. Збільшення: х 400.

## 4.2. Морфологічна характеристика печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus berus*

Гістологічні дослідження препаратів печінки другої експериментальної групи при укусі гадюки степової показали прояв реактивних альтеративних змін у стромі та паренхімі органу. Спостерігаються порушення мікроциркуляторного русла, а саме синусоїдних гемокапілярів, просвіти яких нерівномірно розширені, повнокровні зі стазом еритроцитів, відзначається небагато лімфоцитів. Також виявлялися синусоїди із звуженими просвітами (рис. 4.6). У сполучній тканині навколо тріад спостерігається лейкоцитарна інфільтрація. В просвіті кровонаповнених міжчасточкових вен виявляються стази та сладжування еритроцитів (рис. 4.7).

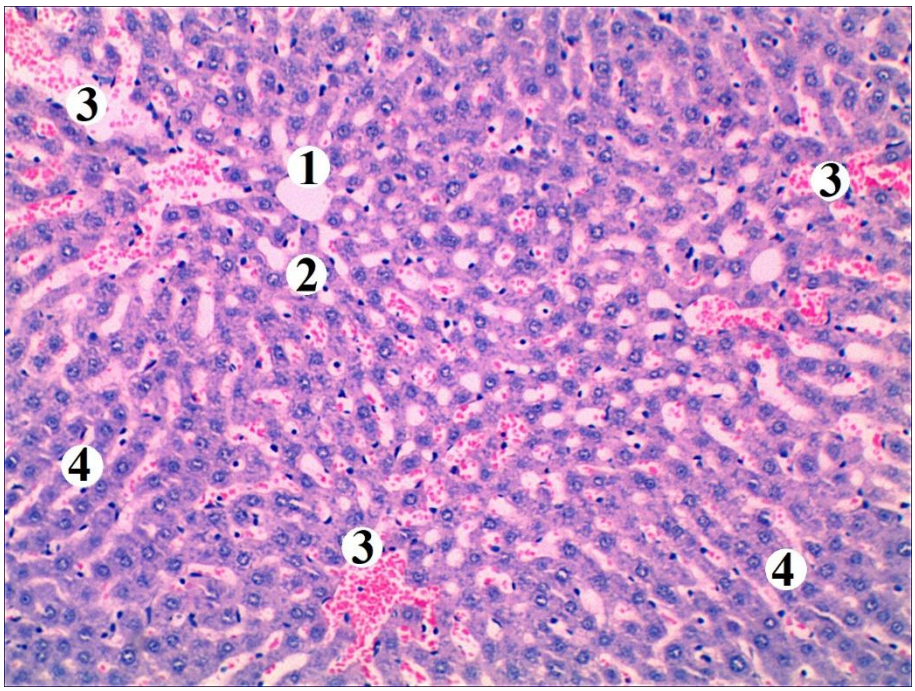


**Рис. 4.6.** Мікроскопічні зміни печінки другої експериментальної групи при укусі гадюки степової. 1 – центральна вена, 2 – розширені просвіти синусоїдних гемокапілярів, 3 – еритроцитарний стаз, 4 – печінкові балки. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

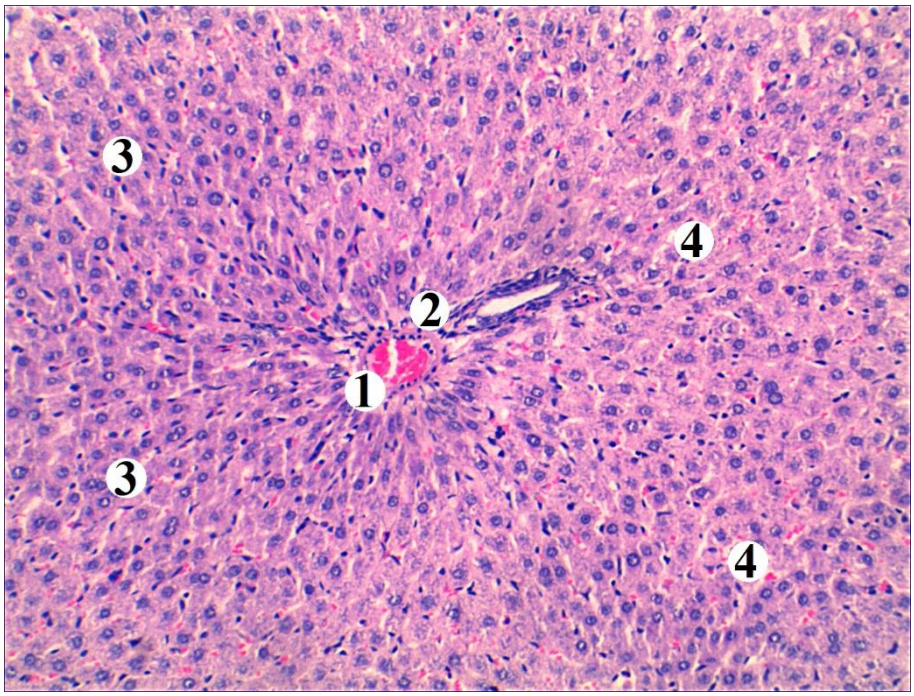


**Рис. 4.7.** Мікроскопічні зміни печінки другої експериментальної групи при укусі гадюки степової. 1 – кровонаповнена міжчасточкова вена із сладжуванням еритроцитів у просвіті, 2 – лімфогістіоцитарна інфільтрація

портального тракту, 3 – печінкові пластинки, 4 – нерівномірно розширені простори синусоїдних гемокапілярів. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Розташування гепатоцитів у вигляді печінкових пластинок, які розходяться радіально переважно збережене. У перипортальній, центролобулярній ділянках класичних печінкових часточок виявляються гепатоцити із гіперхромними ядрами. Поодиноко відзначалися клітини із пікнотичними ядрами та інтенсивно базофільною цитоплазмою, особливо у перипортальних ділянках. Багато ядер у клітинах нормохромні. Виявлялися двоядерні гепатоцити із світлими еухроматиновими ядрами у центролобулярних діляках часточки (рис. 4.8). Міжклітинні контакти гепатоцитів збережені. У просторі Діссе відзначалися збільшення популяції клітин Купфера.

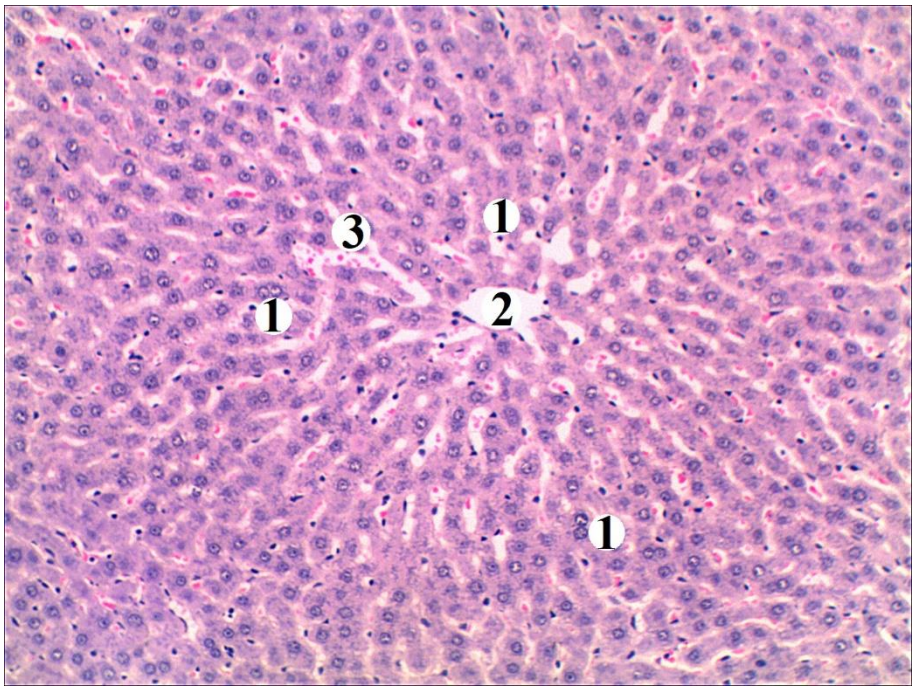


**Рис. 4.8.** Мікроскопічні зміни печінки другої експериментальної групи при укусі гадюки степової. 1 – двоядерні гепатоцити, 2 – центральна вена, 3 – розширені синусоїдні гемокапіляри із форменими елементами у просвіті. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Морфометричні дослідження печінки групи тварин при укусі гадюки степової показали, що середнє значення площі гепатоцитів становить (193,46 ± 9,65) мкм², середнє значення площі ядер гепатоцитів становить (38,72± 1,92) мкм², тоді як середнє значення площі цитоплазми дорівнює (154,74 ± 7,61) мкм². Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів печінки другої експериментальної групи тварин становить 0,250 ± 0,013.

Гістохімічне дослідження вмісту сукцинатдегідрогенази у печінці тварин другої дослідної групи за умов укусу степової гадюки показало нерівномірну активність мітохондріального ферменту у часточках. Гепатоцити із помірною активністю ферменту забарвлюються інтенсивно, характеризуються великими гранулами диформазану та порохоподібно-аморфним осадом і розташовані переважно у периферійних ділянках часточки (рис. 4.9). У центролобулярній зоні спостерігається гепатоцити із низьким ступенем забарвлення, що вказує на зниження сукцинатдегідрогенази у цитоплазмі клітин. Середнє значення коефіцієнта активності сукцинатдегідрогенази у гепатоцитах печінки другої експериментальної групи становить 3,65 ± 0,17, що достовірно ($p<0,001$) у 0,76 раза нижче аналогічного параметра інтактної групи тварин.

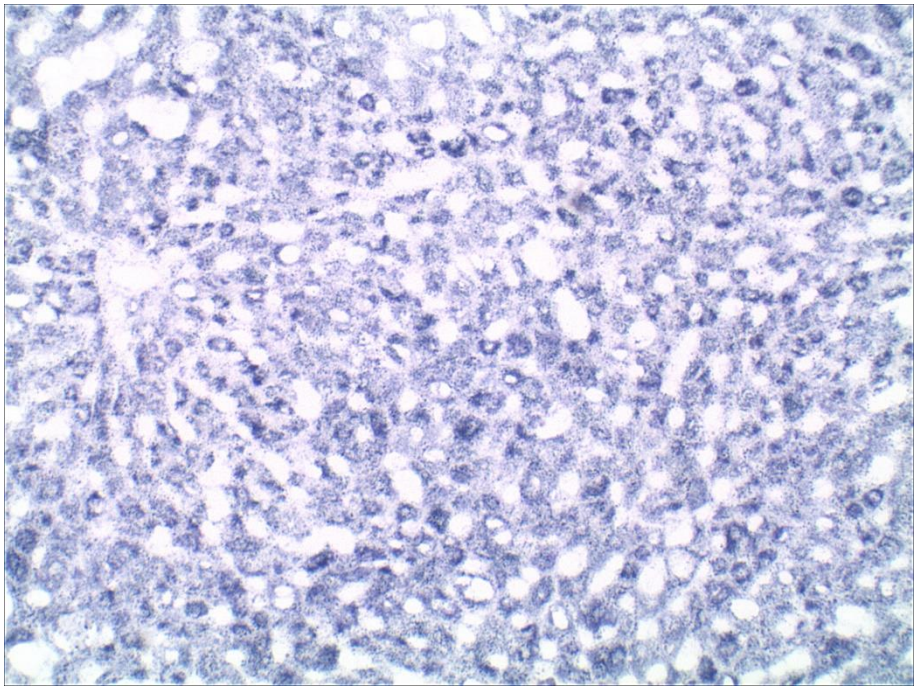

**Рис. 4.9.** Активність сукцинатдегідрогенази в гепатоцитах печінки білих лабораторних щурів при укусі степової гадюки. Осередки з низькою та високою активністю ферменту. Метод Нахласа. Збільшення: х 200.

Гістохімічне дослідження глікогену у гепатоцитах печінки другої експериментальної групи тварин за умов укусу степової гадюки показало зниження вмісту трофічних включень. У більшості гепатоцитів спостерігається скупчення рожево-червоних гранул глікогену периферійно, при цьому частина цитоплазми звільнена від вмісту та має оксифільне забарвлення (рис. 4.10). Наявні окремі клітини із типовою локалізацією даної трофічної сполуки. Середнє значення цитохімічного показника становить 3,41 ± 0,16 та знижується достовірно ($p<0,001$) у 0,69 раза відносно показника інтактної групи тварин.

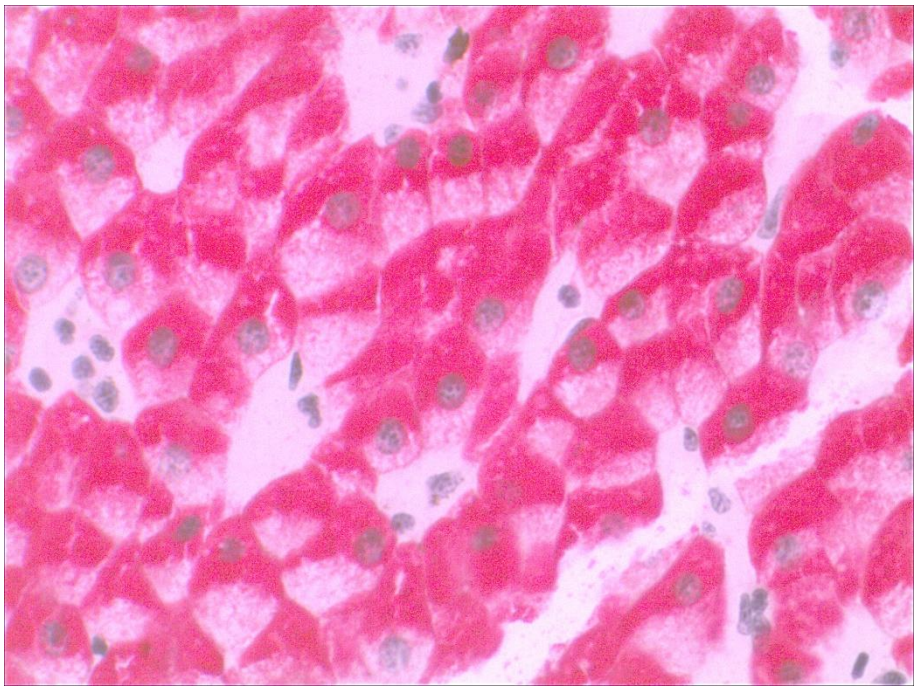

**Рис. 4.10.** Наявність глікогену в клітинах печінки другої дослідної групи тварин. Невисокий вміст трофічних включень у цитоплазмі гепатоцитів. Метод Шабадаша. Збільшення: х 400.

Імуногістохімічне дослідження печінки другої експериментальної групи тварин при укусі степової гадюки показало, що у різних ділянках печінкової часточки виявляються популяції $CD86^+$ клітин. Більшість з них мають світло-коричневу або коричневу цитоплазму із численними відростками, які залягають вздовж просвіту синусоїда, іноді виявляються у перисинусоїдих просторах (рис. 4.11). Ступінь експресії трансмембранного глікопротеїну CD86 невисокий (+--), проте у порівнянні з інтактною групою тварин інтенсивніший. Збільшення популяції $CD86^+$ клітин вказує на реактивні запальні процеси, які спостерігаються в органі внаслідок дії компонентів отрути степової гадюки.

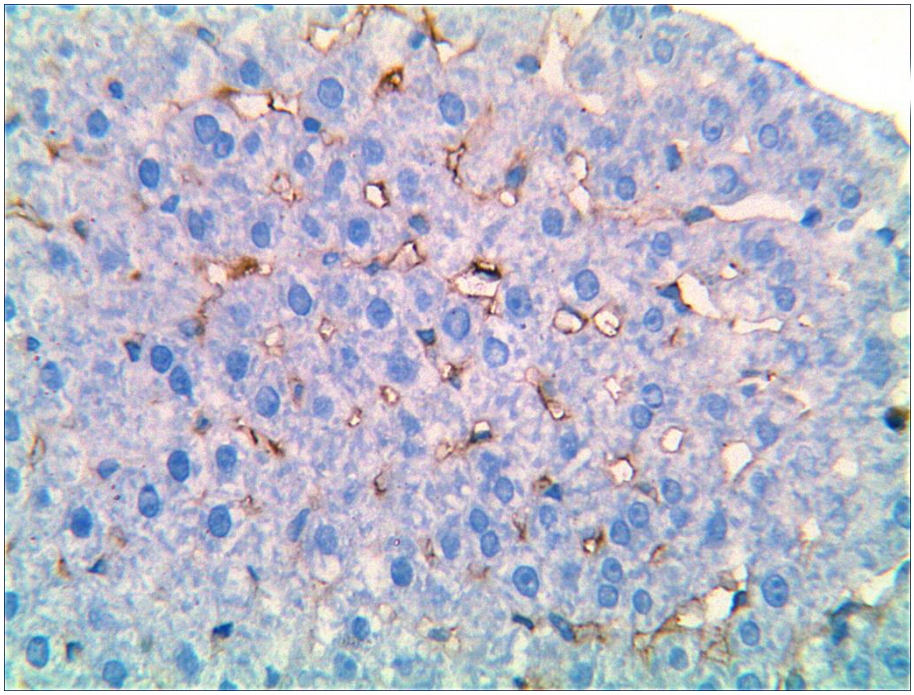

**Рис. 4.11.** Еспресія $CD86^+$ в клітинах печінкової часточки тварин другої експериментальної групи тварин при укусі степової гадюки. Імуногістохімічна реакція застосування антитіла CD86. Забарвлення гематоксиліном Майера. Збільшення: х 400.

### 4.3. Морфологічна характеристика печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus nikolskii*

Мікроскопічні дослідження печінки третьої експериментальної групи тварин при укусі гадюки Нікольського встановили значні дистрофічні і запальні зміни паренхіми органу у порівняні з другою дослідною групою тварин. Спостерігається пошкодження часточкової будови печінки і порушення цитоархітектоніки класичних печінкових часточок. Виявляються значні осередки хаотичного розташування гепатоцитів із втратою типової балкової структури. Більшість гепатоцитів характеризувалися дистрофічними змінами, особливо у центролобулярних ділянках, що проявляється локальними явищами гідропічної дистрофії. У таких клітин виявляється світла, вакуолізована, оксифільна цитоплазма. Ядра багатьох гепатоцитів пікнотичні, гіперхромні, у деяких виявляється значний набряк.

Більшість синусоїдів кровонаповнені, спостерігається явище сладжування еритроцитів та початок формування тромбів. Окремі гемокапіляри мають значно розширені просвіти та пошкоджений ендотелій. Втрачається цілісність будови стінки центральної вени, виявляється її стоншення та фрагментація (рис 4.12).

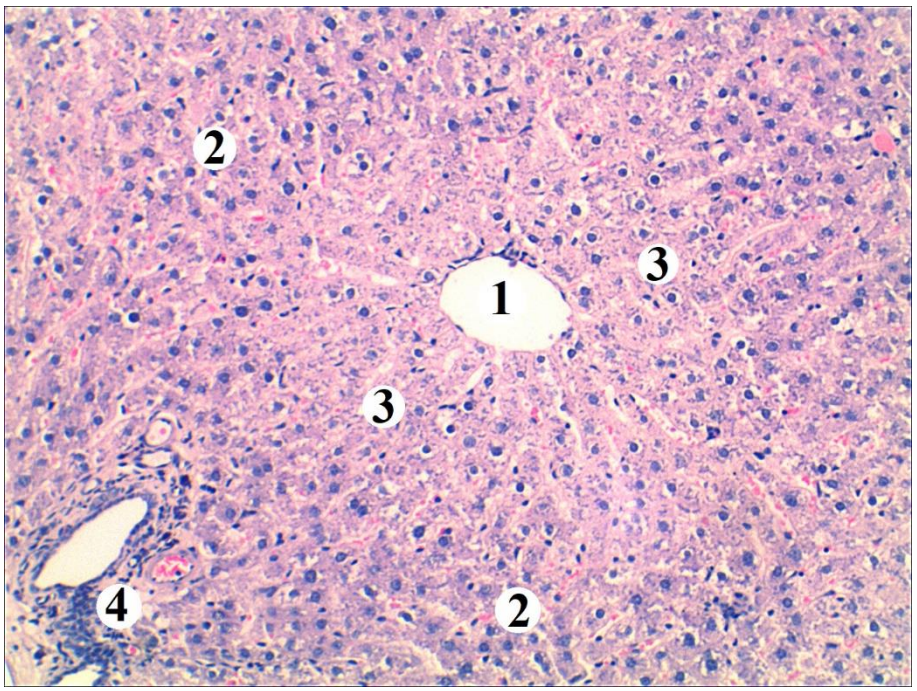


**Рис. 4.12.** Мікроскопічні зміни печінки при укусі гадюки Нікольського. 1 – розширений просвіт центральна вена, 2 – хаотичне розташування гепатоцитів, 3 – гідропічна дистрофія гепатоцитів, 4 – портальний тракт із лімфогістіоцитарною інфільтрацією. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Виявлялися значні лімфогістіоцитарних інфільтратів, що вказують на значні запальні процеси у органі (рис. 4.13). Вогнищеві скупчення відзначалися у ділянках потральних трактів, також лімфоцити спостерігалися вздовж печінкових балок у синусоїдних капілярах.

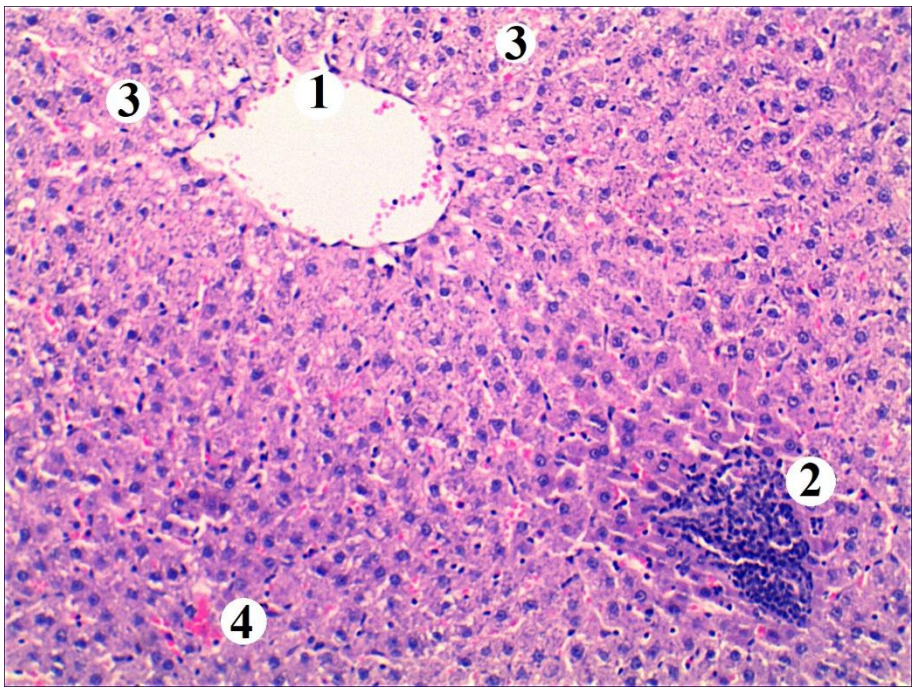


**Рис. 4.13.** Мікроскопічні зміни печінки тварин третьої експериментальної групи при укусі гадюки Нікольського. 1 – пошкоджена стінка центральної вени, 2 – лімфогістіоцитарна інфільтрація у печінковій часточці, 3 – вакуолізована цитоплазма гепатоцитів, 4 – кровонаповнені синусоїні капіляри. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Виявлялися застійні явища у судинах із формуванням тромбів. Стінка міжчасточкової жовчної протоки мала нечіткі контури. Спостерігався набряк аморфного компоненту пухкої сполучної тканини тріад (рис. 4.14).

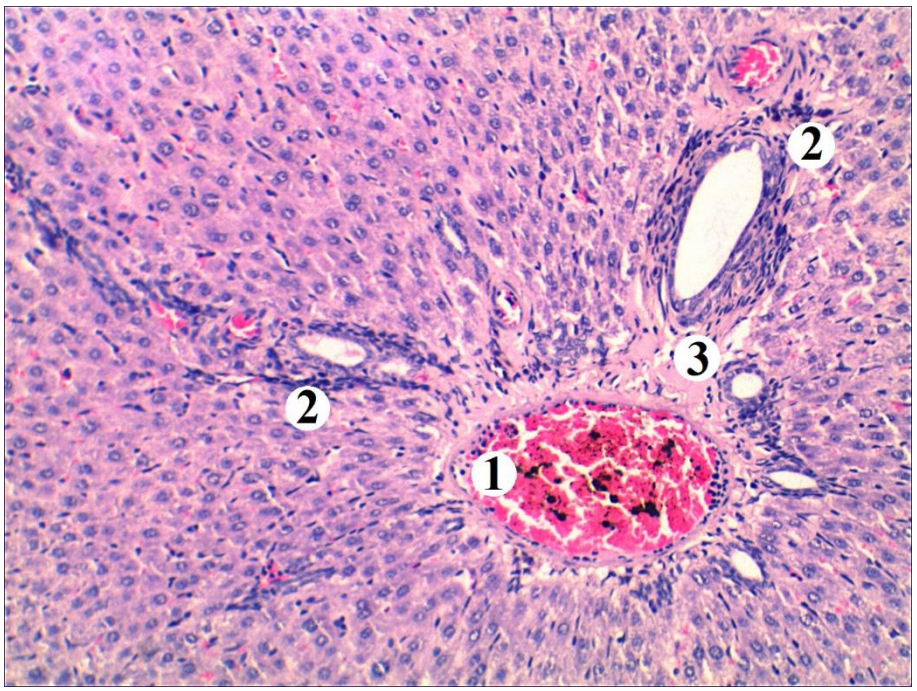


**Рис. 4.14.** Мікроскопічні зміни печінки тварин третьої експериментальної групи при укусі гадюки Нікольського. 1 – венозний тромб, 2 – лімфогістіоцитарна інфільтрація, 3 – набряк сполучної тканини. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення: х 100.

Морфометрично встановлено, що середнє значення площі гепатоцитів дорівнює (223,74 ± 11,14) мкм², що у 1,21 раза ($p<0,001$) перевищує значення інтактної групи тварин і в 1,16 раза ($p<0,05$) більше аналогічного параметра другої дослідної групи тварин. Середнє значення площі ядер гепатоцитів становить (33,67 ± 1,64) мкм², тоді як середнє значення площі цитоплазми клтіин складає (190,07 ± 9,43) мкм². Відповідно ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів печінки третьої експериментальної групи тварин при укусі гадюки Нікольського дорівнює 0,177 ± 0,009, що у 0,75 раза ($p<0,001$) нижче показника інтактної групи тварин і у 0,71 раза ($p<0,001$) менше аналогічного значення групи тварин при укусі гадюки степової.

Гістохімічне дослідження сукцинатдегідрогенази у печінці білих щурів після укусу гадюки Нікольського показало значне зниження ферменту. У цитоплазмі окремих гепатоцитів виявлялося мало великих гранул, а у переважній більшості клітин наявні локально розташований порохоподібно-

аморфний осад диформазану (рис. 4.15). Дані зміни вказують порушення процесу гліколізу у клітинах. Середнє значення цитохімічного коефіцієнта складає 2,07 ± 0,09, що достовірно значуще ($p<0,001$) у 0,42 раза знижується відносно показника інтактної групи тварин та у 0,57 раза нижче параметра другої експериментальної групи.

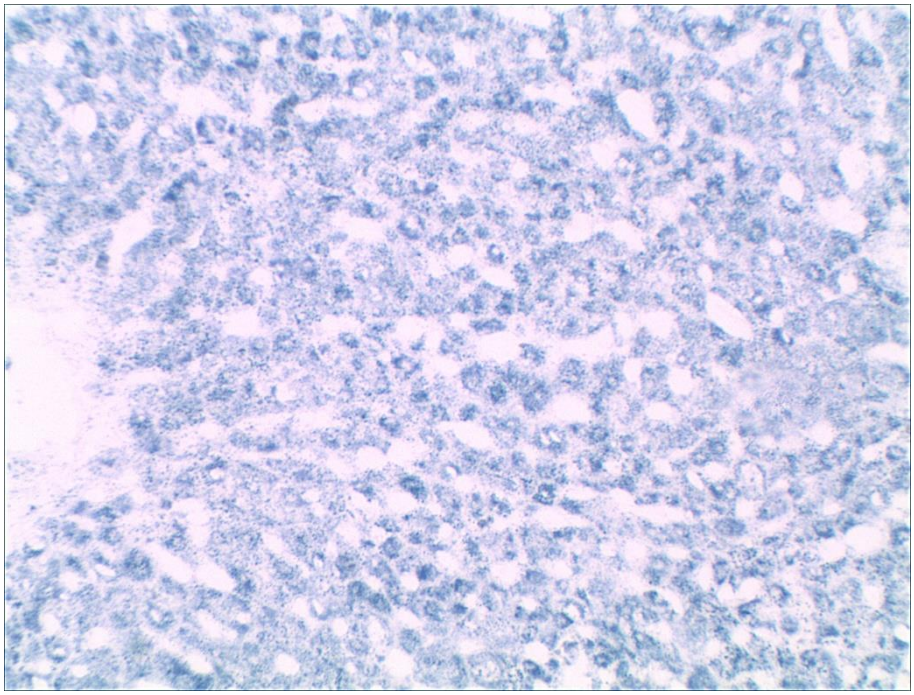

**Рис. 4.15.** Низька активність сукцинатдегідрогенази в гепатоцитах печінки білих лабораторних щурів при укусі гадюки Нікольського. Метод Нахласа. Збільшення: х 200.

Гістохімічне дослідження глікогену у гепатоцитах печінки третьої експериментальної групи тварин за умов укусу гадюки Нікольського показало низький вміст даної трофічної сполуки. У цитоплазмі гепатоцитів наявні локальні, розташовані по краю плазмолеми дрібні гранули. Поодинокі клітини характеризувалися відсутністю глікогену (рис. 4.16). Середнє значення цитохімічного показника становить 2,37 ± 0,11, що достовірно ($p<0,001$) знижується у 0,48 раза і 0,70 раза відносно аналогічного параметра інтактної групи тварин та другої експериментальної групи тварин.

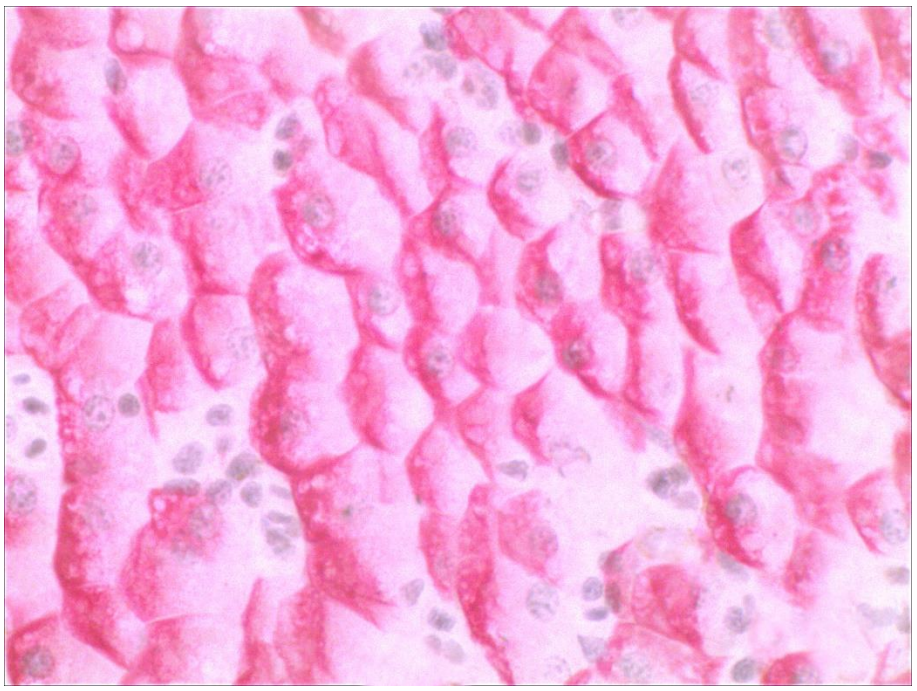

**Рис. 4.16.** Вміст глікогену в клітинах печінки тварин білих лабораторних щурів при укусі гадюки Нікольського. Небагато грудок трофічної сполуки у цитоплазмі гепатоцитів. Метод Шабадаша. Збільшення: х 400.

Імуногістохімічне дослідження печінки тварин третьої експериментальної групи показало, що по всій площі печінкових часточок виявляються інтенсивно забарвленні $CD86^+$ клітини (+++). Таке збільшення їх популяції у синусоїдах та найвищий ступінь експресії CD86 порівняно із другою дослідною групою, вказує на значні запальні реакції, які спричинені впливом отрути гадюки Нікольського на орган. Цитоплазма $CD86^+$ клітин інтенсивно коричнева, що свідчить про фіксації вторинних антитіл. Їх відростки були чисельними, локально спостерігалося заповнення ними просвіту синусоїдного гемокапілярів, а на деяких ділянках відзначалося проникнення відростків у просвіт Діссе. Також використовуючи забарвлення гематоксиліном Майера виявлялися гепатоцити печінкових балок із значними деструктивними змінами, що проявляється просвітленою вакуолізованою цитоплазмою та пікнотизацією ядер. Просвіти синусоїдів значно розширені або спалися. Порушується архітектоніка печінкових часточок (рис. 4.17)

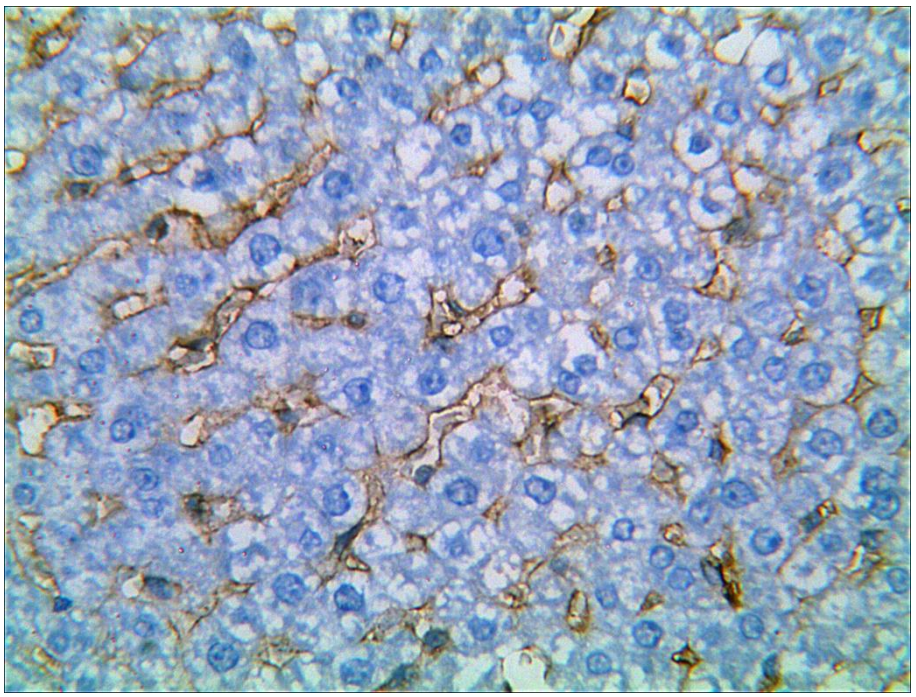

**Рис. 4.17.** Висока експресія CD86 в клітинах печінкової часточки тварин третьої дослідної групи при укусі гадюки Нікольського. Імуногістохімічна реакція застосування антитіла CD86. Забарвлення гематоксиліном Майера. Збільшення: х 400.

Таким чином, за умов впливу отрути гадюки степової мікроскопічно встановлено альтеративні зміни паренхіми печінки та судинних розладів. Встановлено появу осередків лейкоцитарної інфільтрації, що вказує на розвиток запальних процесів, виявляються в складі часточок багато двоядерних гепатоцитів, як пристосувально-компенсаторна реакція органу, також відзначаються нерівномірно та локально різко розширені синусоїдні гемокапіляри із сладж-ефектом еритроцитів.

За умов впливу отрути гадюки Нікольського у тварин третьої експериментальної групи встановлено більш значні деструктивні зміни структурних елементів печінки і ланок судинного русла, порівняно з другою експериментальною групою тварин, що підтверджується зокрема достовірною динамікою змін морфометричних показників. Відзначається розширення і кровонаповнення судин, формування тромбів, крововиливи, деструкція стінки гемокапілярів. Активація макрофагів поєднується з лейкоцитарною

інфільтрацією переважно ділянок тріад та локально в перипортальних ділянках печінкових часточок. Порушення часточково-балкової будови органу супроводжується гідропічною дистрофією гепатоцитів, а також встановлено значне зниження в них вмісту сукценатдегідрогенази та глікогену.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в двох статтях фахових журналів України (один з них також відноситься до наукометричної бази Scopus [232, 233] та в шісти тезах науково-практичних конференцій [12, 14, 15, 16, 17, 18].

# РОЗДІЛ 5
# ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ДІЇ ОТРУТИ ГАДЮК ВИДУ VIPERA BERUS

## 5.1. Електронно-мікроскопічна характеристика печінки щурів контрольної групи тварин

Електронномікроскопічне вивчення зрізів печінки тварин інтактної групи, показало, що головні клітини органу – гепатоцити включають округлі, досить великі ядра, рідше виявляються двояденні гепатоцити. Ядра містять переважно електронносвітлий еухроматин, поодиноко визначаються невеликі грудки гетерохроматину. Наявні одне або декілька осміофільних ядерець, з чітко вираженим фібрилярним та гранулярними компонентами. Каріолема клітин чітко контурована, рівна, без інвагінацій, з чисельними ядерними порами. Цитоплазма помірної електронної щільності із добре розвиненими органелами синтетичного апарату: канальці гранулярної ендоплазматичної сітки вузькі, містяться переважно парануклерно та у васкулярному полюсі клітини, агранулярна ендоплазматична сітка утворена непротяжними, розширеними канальцями, чисельними везикулами та мікропухирцями, комплекс Гольджі представлений сплющеними цистернами, вакуолями та мікропухирцями. Поблизу комплексу Гольджі та по всій цитоплазмі гепатоцита містяться осміофільні лізосоми та пероксисоми, чисельні, дрібні включення глікогену. Мітохондрії переважно невеликі, округлі, з матриксом невисокої електронної щільності, містять нечисельні кристи (рис. 5.1).

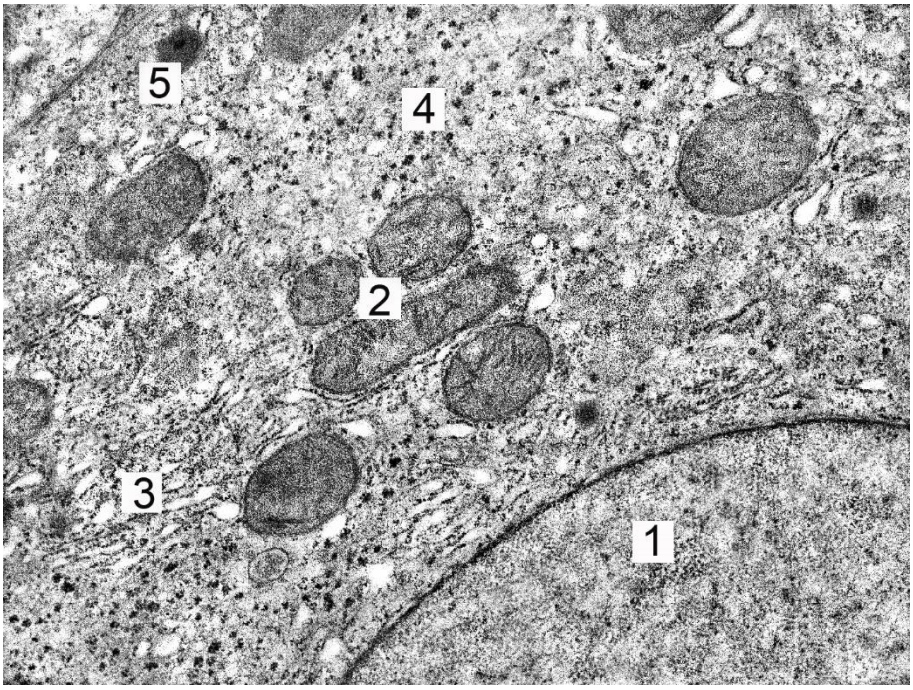


**Рис. 5.1.** Ультраструктура гепатоцита печінки тварини контрольної групи. Фрагмент ядра (1), мітохондрії (2), канальці ендоплазматичної сітки (3), гранули глікогену (4), пероксисома (5). х 19 000

Плазмолеми гепатоцитів чіткі, формують у васкулярній поверхні мікроворсинки, в контактних поверхнях та у ділянках жовчних капілярів визначаються десмосоми та щільні замикальні контакти. Просвіти жовчних капілярів помірні із добре вираженими мікроворсинками (рис. 5.2).

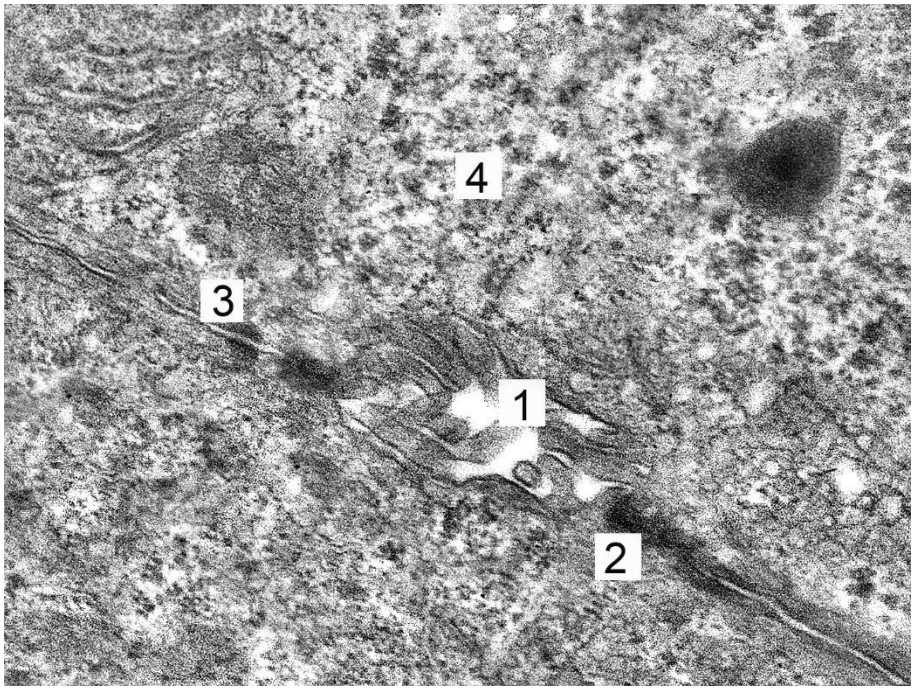

**Рис. 5.2.** Субмікроскопічний стан жовчного капіляра печінки тварини інтактної групи. Просвіт жовчного капіляра з мікроворсинками (1), щільний замикальний контакт (2), десмосома (3), фрагмент гепатоцита (4). х 21 000

Між гепатоцитами та стінкою гемокапілярів міститься перисинусоїдний простір Діссе з мікроворсинками, в якому локалізуються макрофагальні клітини Купфера, поодиноко клітини Ito-ліпоцити. Синусоїдні гемокапіляри містять ендотеліоцити із невеликим, овальним або витягнутим ядром, в периферичних, цитоплазматичних ділянках визначаються фенестри, базальна мембрана переривчаста, несуцільна, містить пори. Просвіт кровоносних капілярів неширокий містить формені елементи крові (рис. 5.3).

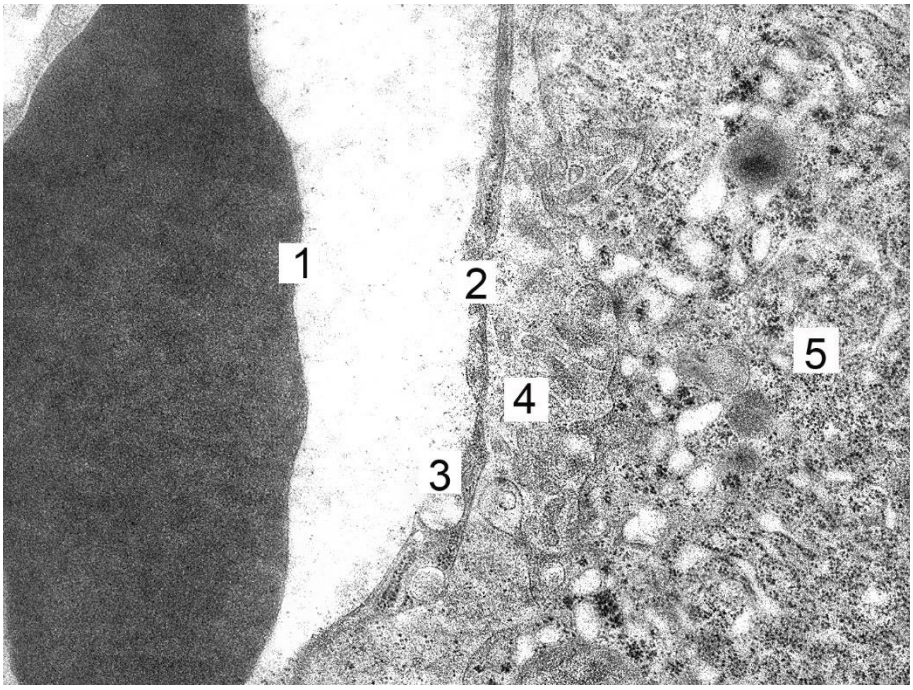


**Рис. 5.3.** Ультраструктурний стан гемокапіляра печінки тварини інтактної групи. Просвіт капіляра із еритроцитом (1), цитоплазма ендотеліоцита (2), простір Діссе з мікроворсинками (3), цитоплазма гепатоцита (4). х 21 000

## 5.2. Ультрамікроскопічні зміни печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus berus*

Електронномікроскопічне вивчення печінки експериментальних тварин за умов змодельованого укусу гадюки степової показало значні зміни ультраструктури паренхіматозного та судинного компонентів. Плазмолема гепатоцитів на багатьох ділянках була нечіткою, втрачалася цілісність міжклітинних контактів. Жовчні капіляри погано контуровані з нечисельними мікроворсинками (рис. 5.4).

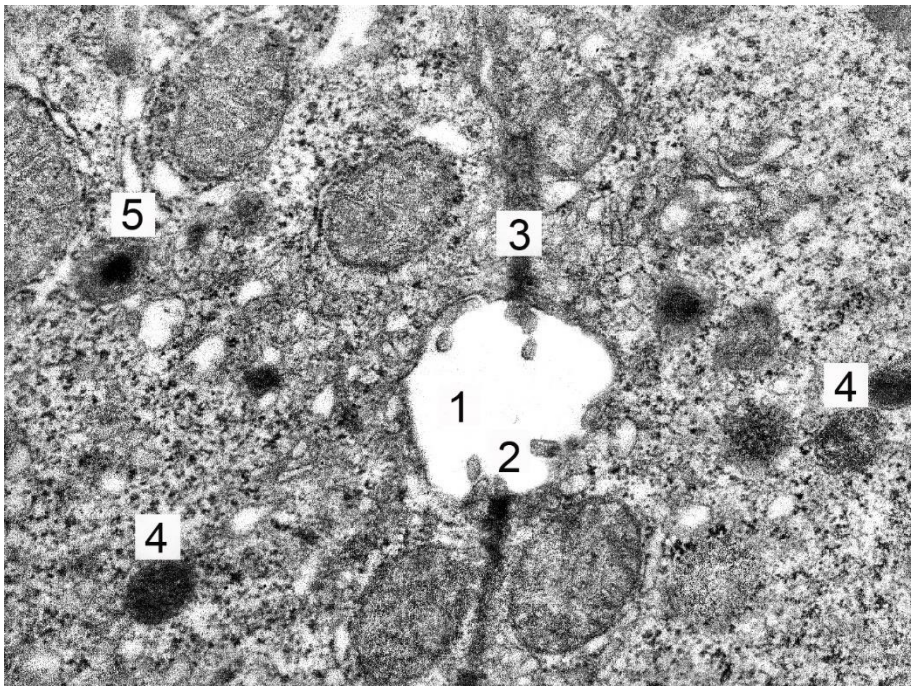


**Рис. 5.4.** Ультраструктурні зміни жовчного капіляра тварин за умов впливу отрути гадюки степової. Деструктуризований, розширений просвіт жовчного капіляра (1), поодинокі мікроворсинки (2), нечіткий щільний замикальний контакт (3), осміофільні лізосомами (4), та пероксисоми (5). х 17 000

Ядра клітин мали округлу форму, частково деформовані, з незначними інвагінаціями каріолеми, які нечіткі. Перинуклеарний простір локально розширений. Ядро містило переважно електронносвітлий еухроматин, проте

маргінально визначаються великі скупчення гетерохроматину. Ядерця невеликі, осміофільні, спостерігаються ядра без ядерець. Зменшується число двоядених клітин. Функціональна напруженість в органі за умов токсичної дії отрути гадюки степової супроводжується гетерогенністю гепатоцитів. Визначається поява чисельних "темних" клітин, в яких цитоплазма підвищеної осміофілії, містить слабо розвинені органели синтетичного та енергетичного апаратів, які в значній мірі деструктуризовані. Ендоплазматична сітка сформована непротяжними канальцями, які локально потовщені, об'ємними вакуолями та поодинокими міхурцями. Цистерни Комплексу Гольджі нечітко контуровані, локалізовані парануклеарно. Зростає число осміофільних первинних лізосом, вторинних-фагосом та пероксисом. Зменшується вміст дрібнодисперсних, осміофільних включень глікогену. Мітохондрії переважно невеликі, електроннощільні, з редукованими кристами. В цитоплазмі таких гепатоцитів спостерігались великі локуси помірної осміофілії позбавлені органел і включень (рис. 5.5).

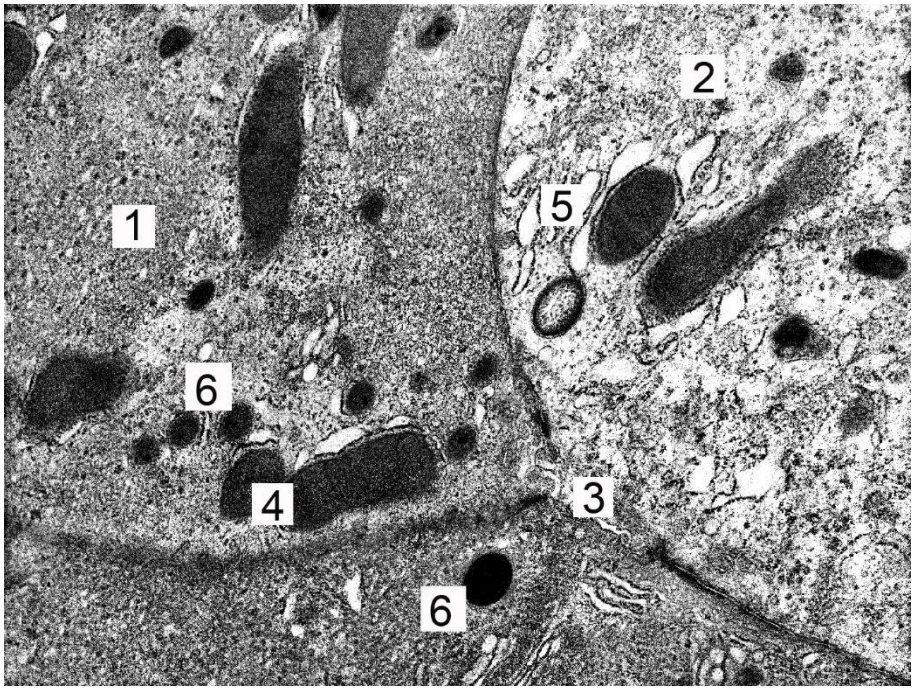


**Рис. 5.5.** Ультраструктурні зміни гепатоцитів печінки тварин за умов впливу отрути гадюки степової. Осміофільна гіалоплазма «темного» гепатоцита (1), фрагмент гепатоцита з цитоплазмою помірної осміофілії (2), нечіткий просвіт жовчного капіляра (3), осміофільні мітохондрії (4),

непротяжні, розширені канальці гранулярної ендоплазматичної сітки (5), осміофільні лізосоми (6). х 12 000

Переважна більшість гепатоцитів характеризувалась помірно електроннощільною гіало- та каріоплазмою із деструктивними змінами ядра та органел. Однак частіше ніж в контрольній групі виявлялись “світлі” гепатоцити, які містили різко електронносвітлу гіалоплазму, поодинокі мембранні органели, які були нечіткими та фрагментованими (рис. 5.6).

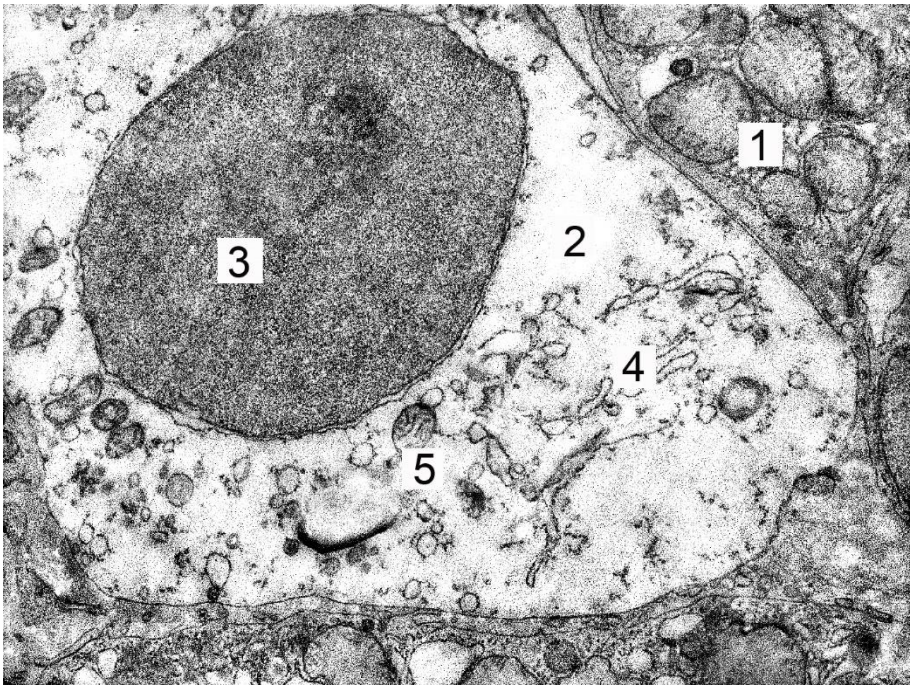


**Рис. 5.6.** Ультраструктурні зміни гепатоцитів печінки тварин за умов впливу отрути гадюки степової. Електроннощільнна гіалоплазма «темного» гепатоцита (1), гіалоплазма «світлого» гепатоцита (2), ядро (3), канальці гранулярної ендоплазматичної сітки (4), мітохондрія (5). х 1 5000

Гемотоксичний вплив отрути гадюки степової спричинив зростання кількості клітин Купфера, які втрачали зв'язок із ендотелієм та мігрували в перисинусодний простір. Для них характерною була наявність в цитоплазмі чисельних первинних та вторинних, об’ємних фагосом. Органели в цитоплазмі слабо виражені, пошкоджені, визначаються непротяжні канальці ендоплазматичної сітки. Ядро клітин округле, в каріоплазмі переважав

гетерохроматин, каріолема нечітка, ядерні пори не визначалися (рис. 7). В цей термін спостереження зростало число pit-клітин в перисинусодному просторі Діссе як прояв захисних імунних реакцій. Характерною ознакою даних клітин є наявність округлого, гетерохроматинового ядра, невелика площа цитоплазми із помірно розвиненими органелами. Часто визначалися в цитоплазмі канальці ендоплазмитичної сітки, електроннощільні, специфічні гранули та осміофільні лізосоми, оскільки дані клітини виступають в ролі натуральних кілерів (рис. 5.8). Також визначилися клітини Ito з включеннями ліпідних гранул в цитоплазмі.

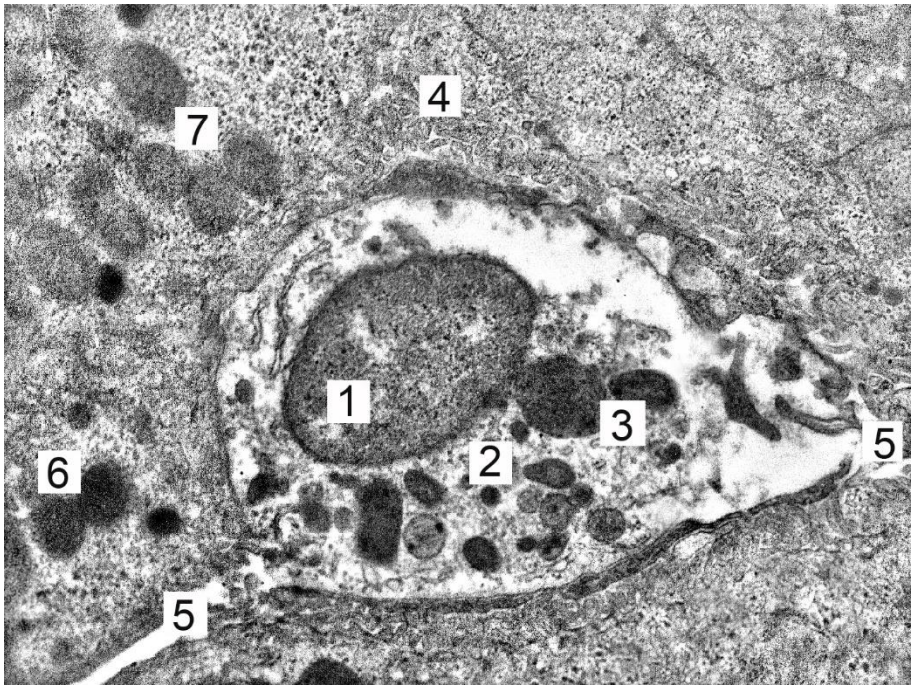


**Рис. 5.7.** Субмікроскопічні зміни печінки тварин за умов впливу отрути гадюки степової. Ядро макрофага (1), первинні лізосоми (2), вторинні лізосоми, фагосоми (3), мікроворсинки в перисинусоїдному просторі Діссе (4), пошкоджені міжклітинні контакти (5), лізосоми (6), гомогенні мітохондрії з пошкодженими мембранами (7). х 11 000

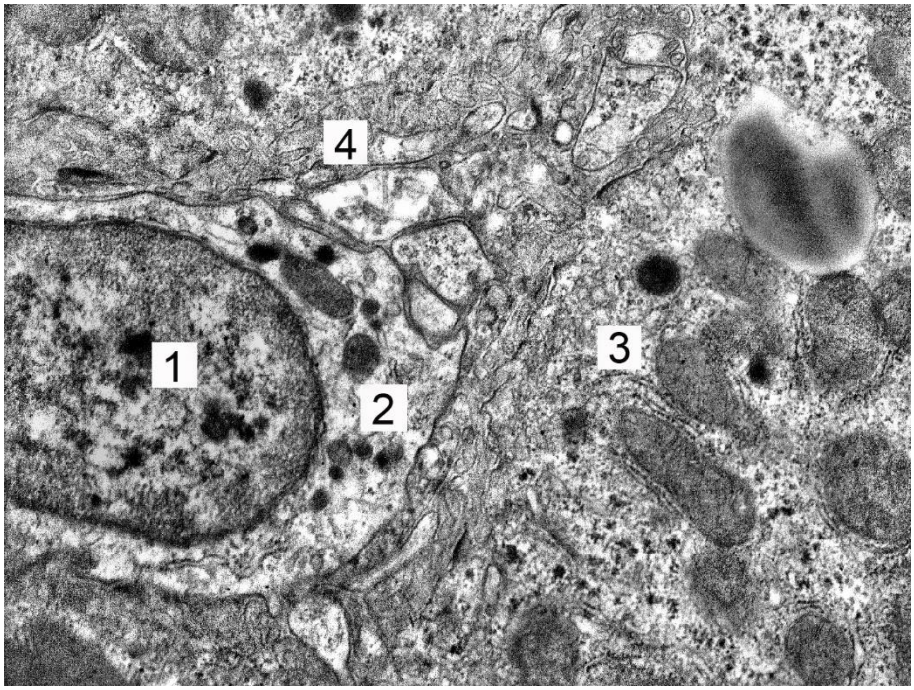


**Рис. 5.8.** Субмікроскопічні зміни гепатоцитів печінки тварин за умов впливу отрути гадюки степової. Ядро pit-клітини з осміофільними грудками гетерохроматину (1), вузька цитоплазма та специфічні електроннощільні гранули (2), фрагмент гепатоцита (3), деструктуризований перисинусоїдний простір (4). х 13 000

Дисциркуляторні зміни в органі за умов токсичного впливу отрути гадюки степової проявлялися звуженими або переважно розширеними синусоїдними гемокапілярами. У таких розширених, повнокровних гемокапілярах, містилися еритроцити, тромбоцити, лейкоцити, зокрема моноцити, що трансформуються у зрілі макрофаги для забезпечення захисних функцій печінки за умов токсичного впливу отрути гадюки степової. Стінка капілярів нечітко контурована, базальна мембрана несуцільна із широкими порами та на значних площах відсутня. Часто формує осміофільні гомогенні смужки (рис. 5.9). Ендотеліальні клітини, що вистеляють гемокапіляри переважно мали овальне, витягнуте гетерохроматинове ядро, з нечіткою каріолемою. Виявляється локальний набряк цитоплазматичних ділянок

клітин, люменальна поверхня плазмолеми також була нечітко структурована (рис. 5.10).

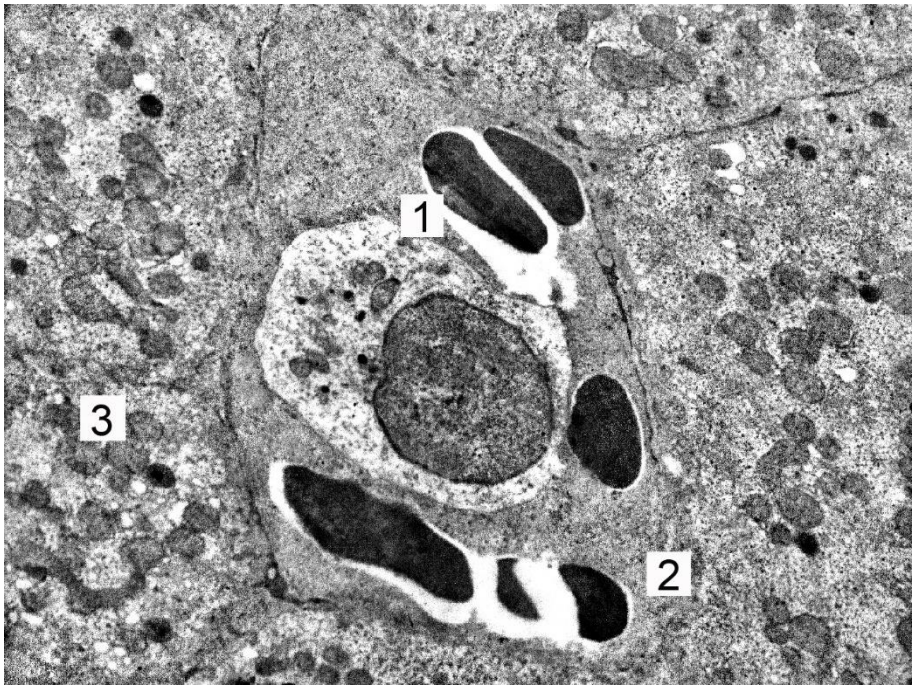


**Рис. 5.9.** Субмікроскопічні зміни печінки тварини за умов впливу отрути гадюки степової. Розширений просвіт гемокапіляра з форменими елементами крові (1), фрагментована, гомогенна стінка капіляра (2), цитоплазма гепатоцита (3). х 12 000

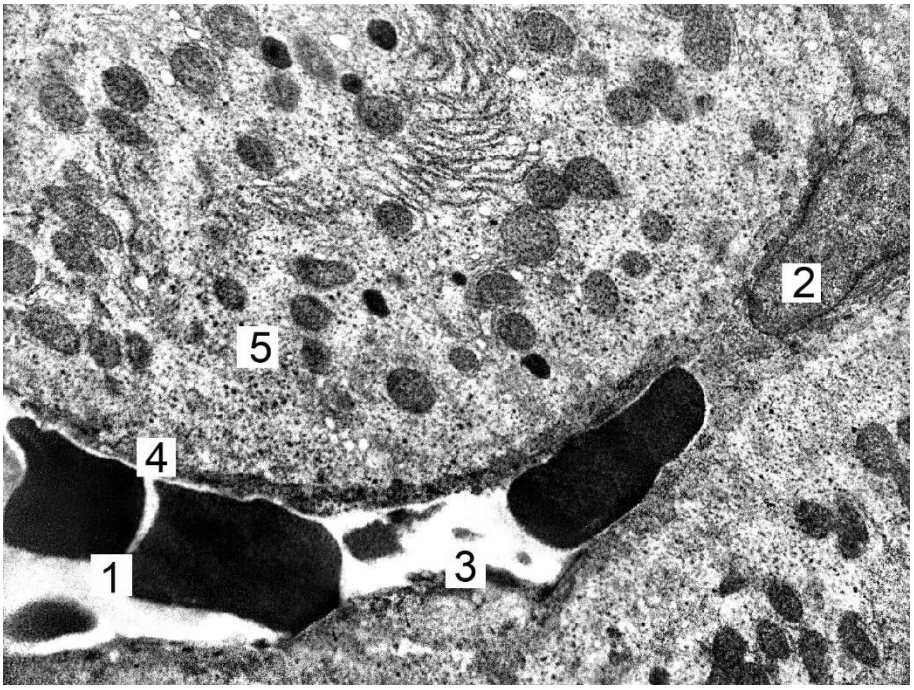


**Рис. 5.10.** Субмікроскопічні зміни печінки тварини за умов впливу отрути гадюки степової. Просвіт гемокапіляра з еритроцитами (1), ядро

ендотеліоцита (2), деструктивно змінена стінка капіляра (3), гомогенний, осміофільний перисинусоїдний простір Діссе (4), фрагмент гепатоцита (5). х 13 000

### 5.3. Ультрамікроскопічні зміни печінки щурів експериментальної групи з введенням отрути *Vipera berus nikolskii*

Субмікроскопічне вивчення печінки тварин за умов впливу отрути гадюки Нікольського показало також значні деструктивні зміни судинного та паренхіматозного компонентів органу однак ступінь їх вираженості був більшим. Ультраструктура гепатоцитів на більшості полів зору характеризувалась пошкодженням мембран плазмолеми та органел. Зростало порівняно з попередньою експериментальною групою спостереження число "темних" клітин, каріо- та гіалоплазма яких була підвищеної осміофілії, а органели деструктуризовані, гомогенні. Ядра таких клітин були невеликі за розміром, з нечіткими мембранами каріолеми. Ядерця визначалися дуже рідко і були гомогенні, осміофільні. В цитоплазмі канальці ендоплазматичної сітки деструктуризовані, спостерігалися локуси різко просвітлені, позбавлені органел. Мітохондрії невеликі, з пошкодженими мембранами, фрагментованими кристами, високої осміофілії матриксом. Лізосоми в цитоплазмі чисельні, електроннощільні, також визначалися гомогенні, ущільнені зони, позбавлені органел (рис. 5.11).

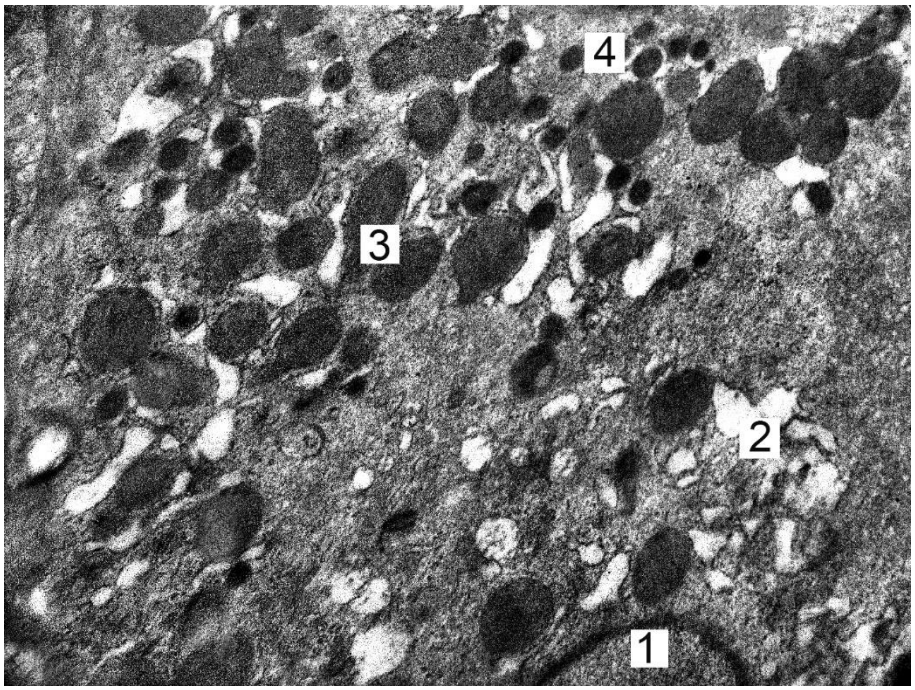


**Рис. 5.11.** Ультраструктурні зміни печінки тварин за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Фрагмент ядра (1), розширені, вакуолізовані канальці ендоплазматичної сітки (2), електроннощільні мітохондрії (3), осміофільні лізосоми (4). х 13 000

Також визначалися “світлі” гепатоцити, цитоплазма яких була низької електронної щільності із поодинокими фрагментованими органелами та великими осміофільними фагосомами. Ядра клітин містили осміофільний гетерохроматин, каріолема була нечіткою, спостерігалося відшарування її зовнішньої мембрани, ядерні пори практично не визначалися. Ядерця також були відсутні (рис. 5.12).

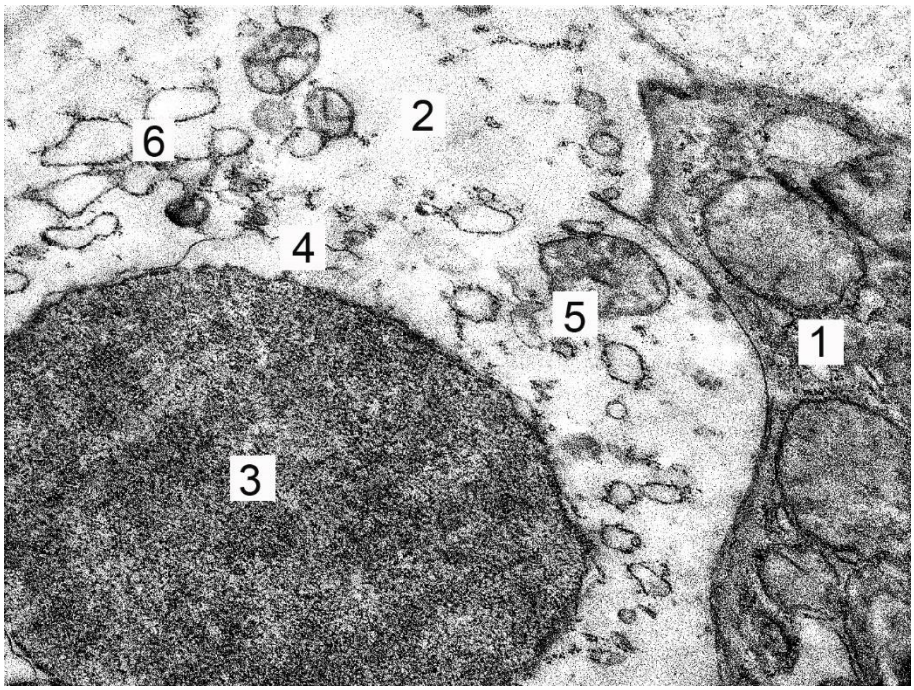


**Рис. 5.12.** Субмікроскопічні зміни гепатоцитів печінки тварин за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Цитоплазма «темного» гепатоцита підвищеної осміофілії (1), цитоплазма «світлого» гепатоцита (2), ядро (3), відшарування зовнішньої мембрани каріолеми (4), мітохондрія (5), канальці ендоплазматичної сітки (6). х 19 000

Токсичний вплив отрути гадюки Нікольського спричинив порушення міжклітинних контактів між гепатоцитами, ультраструктури жовчних капілярів, що характеризувалося переважно розширенням їх просвітів, мікроворсинки були фрагментовані, поодинокі (рис. 5.13).

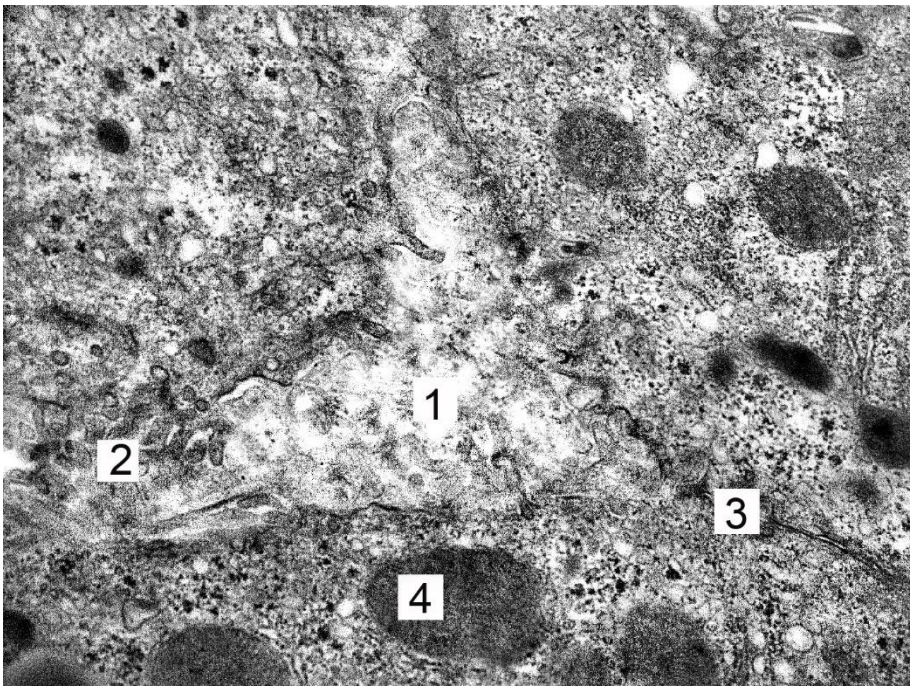


**Рис. 5.13.** Субмікроскопічні зміни жовчного капіляра тварин за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Широкий просвіт жовчного капіляра (1), нечисельні мікроворнсинки (2), погано контурований міжклітинний контакт (3), фрагмент гепатоцита з осміофільними, гомогенними мітохондріями (4). х 20 000

Значні реактивні зміни спостерігалися і в гемокапілярах органу за умов дії гемотоксину. Мікросудини мали рідко звужений просвіт, переважно визначалися повнокровні, із стазами та сладжами еритроцитів у їх просвіті, нейтрофільними гранулоцитами, лімфоцитами. Стінка пошкоджена, цитоплазма ендотелію ущільнена, формує осміофільні смужки, ядра ендотеліоцитів невеликі, видовжені, з нечіткою каріолемою та гетерохроматином по всій площі каріоплазми. Органели слабо розвинені і деструктуризовані. Погано контуруються мікроворсинки в перисинусоїдному просторі Діссе (рис. 5.14).

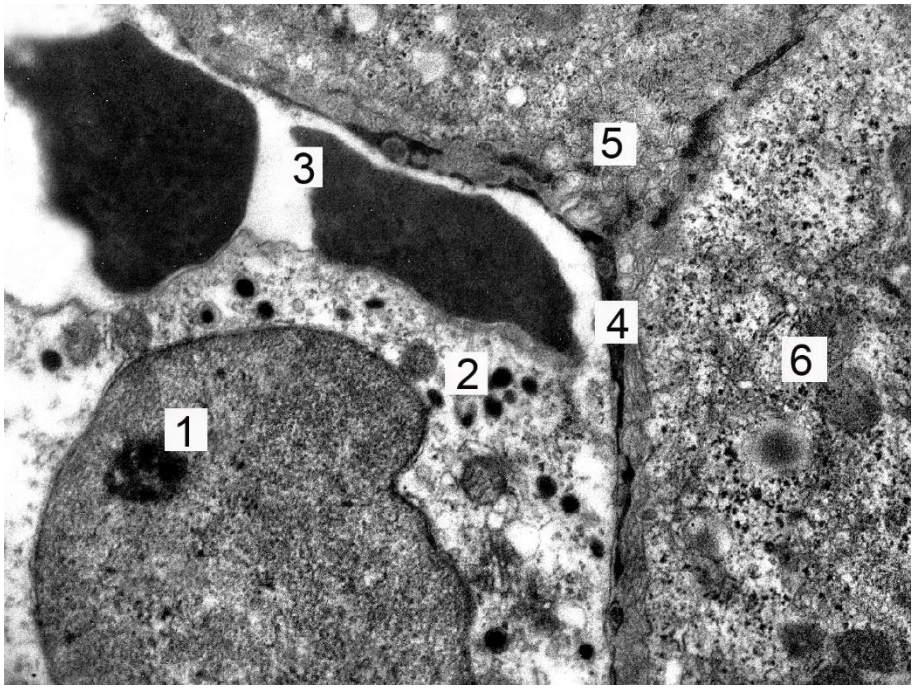


**Рис. 5.14.** Ультраструктурні зміни печінки тварини за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Ядро з ядерцем юного нейтрофіла (1), специфічна зернистість (2), еритроцити в просвіті капіляра (3), осміофільна цитоплазма ендотеліоцита (4), деструктуризований простір Діссе (5), цитоплазма гепатоцита (6). х 17 000

Також в центролобулярних ділянках виявлялися гемокапіляри з широким просвітом, деструктуризованою стінкою, в якій цитоплазма локально інтенсивно набрякла та виступає в просвіт гемокапіляра у вигляді лопатоподібних утворів (рис. 5.15).

Люменальна поверхня плазмолеми на значних ділянках пошкоджена, фрагментована, нечітка, однак є локуси ендотелію з незміненою ультраструктурою стінки.

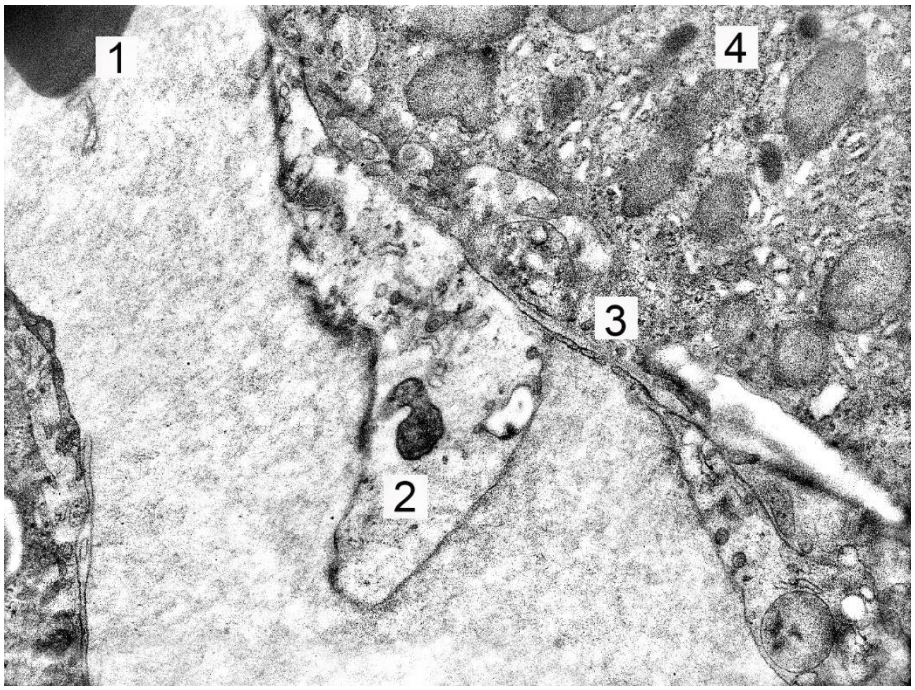


**Рис. 5.15.** Субмікроскопічні зміни печінки тварини за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Еритроцит в просвіті гемокапіляра (1), локальна набрякла ділянка ендотеліоцита в просвіті гемокапіляра (2), деструктуризований простір Діссе (3), фрагмент гепатоцита (4). х 17 000

Часто в просторі Діссе визначаються pit клітини, що свідчить про активізацію захисних механізмів у органі на дію пошкоджуючого фактору – токсину гадюки Нікольського. Для них характерне велике, гетерохроматинове ядро з осміофільною каріолемою. Цитоплазма клітин невелика за об’ємом, в ній визначаються фрагментовані органели, вакуолі, лізосоми (рис. 5.16).

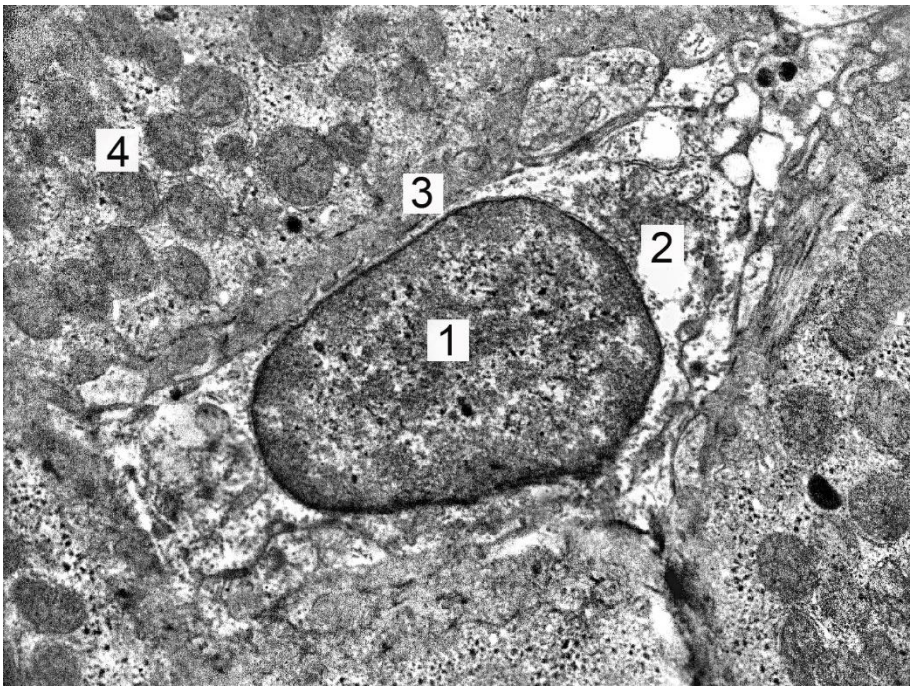


**Рис. 5.16.** Ультраструктурні зміни гепатоцитів печінки тварин за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Осміофільне ядро pit-клітини (1), деструктуризована цитоплазма (2), нечіткий перисинусоїдний простір (3), фрагмент гепатоцита (4). х 13 000

Перебіг запальних процесів у печінці піддослідних тварин за умов впливу гадюки Нікольського проявляється також зростанням числа активних макрофагальних клітин Купфера, що втрачали контакт із ендотелієм та переміщалися в перисинусоїдний простір Діссе і характеризувалися ультраструктурно наявністю в їх цитоплазмі чисельних осміофільних невеликих первинних лізосом та вторинних, об'ємних – фагосом. Цитоплазма таких клітин формує вирости та мікровирости, які сягають на значні ділянки, органели загального призначення розвинені помірно. Ядро макрофага неправильної форми з інвагінаціями каріолеми (рис. 5.17).

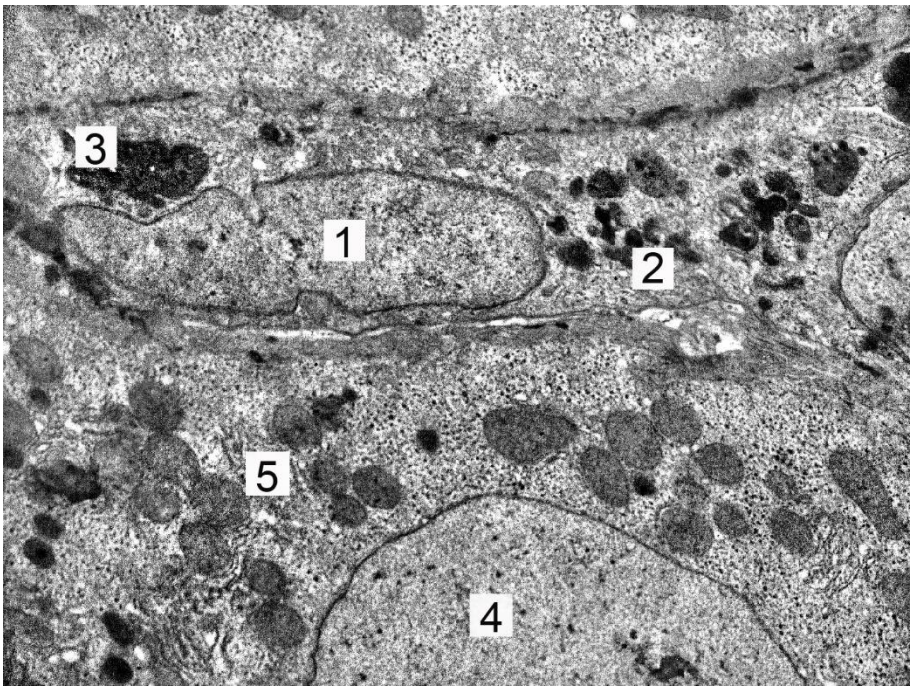


**Рис. 5.17.** Субмікроскопічні зміни печінки тварин за умов впливу отрути гадюки Нікольського. Ядро макрофага (1), первинні лізосоми (2), фагосома (3), ядро гепатоцита (4), цитоплазма гепатоцита (5). х 11 000

Результати проведеного електронномікроскопічного вивчення печінки дослідних тварин за умов дії отрути гадюки степової та гадюки Нікольського показали значні порушення ультраструктури судинного та паренхіматозного компонентів органу. Токсичний вплив отрути, що носить судинний генез, зумовив пряме пошкодження ультраструктури стінки судин, зокрема синусоїдів, а відтак і значну альтерацію ядер і цитоплазми гепатоцитів. Як прояв захисних механізмів органу на токсичне пошкодження зросло число активних макрофагальних клітин Купфера та pit-клітин.

Порівнюючи 2 і 3 експериментальні групи, тобто зміни субмікроскопічного стану печінки за умов впливу токсину гадюки степової та гадюки Нікольського встановлено, що в 3 групі зміни деструктивно-денеративного характеру були вираженішими.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в одній статті у фаховому журналі України [234].

# АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зміїні отрути - це складні та різноманітні суміші біологічно активних компонентів, які реалізують свою дію за допомогою різних механізмів. Оскільки зміїна отрута містить протеази та протеїни, тканини здобичі можуть бути серед потенційних мішеней для ферментів зміїної отрути [119, 249]. Відомо, що стабільність білкового складу тканин є важливим чинником підтримки загального гомеостазу, а будь-які порушення білкового обміну можуть призвести до тяжких наслідків, а часом і до патологічних станів. Нами встановлено, що ін'єкція отрути V. berus berus і V. berus nikolskii впливає на гомеостаз білка в печінці. Це проявлялось у зниженні рівня загального білка в досліджуваному органі. Наші результати збігаються з результатами інших дослідників. За даними [147], розпад білків у печінці щурів, яким ввели зміїну отруту Naja naja, переважає над їх синтезом. Зниження рівня білка в органах може бути результатом руйнування клітин внаслідок некрозу та виходу клітинного вмісту в позаклітинний простір [107]. Крім того, проникність судин, викликана зміїною отрутою, може сприяти втраті білків у тканинах [83]. Білковий профіль у тварин, яким вводили зміїну отруту, ми також досліджували в нирках і тонкому кишечнику. Наші результати виявили деякі зміни в білковому складі, які були більш виражені у щурів, яким вводили отруту V. berus nikolskii. Виявлено збільшення вмісту білків з молекулярною масою менше 30 кДа, одночасно зі зниженням рівня білків з молекулярною масою більше 100 кДа. Такий розподіл білків характерний для ферментативно-опосередкованої деградації білків, і може бути пояснений активацією протеаз жертви у відповідь на введення зміїної отрути, та може бути результатом прямої дії зміїної отрути.

Зміїні протеїнази, а саме металопротеїнази, можуть атакувати білки базальної мембрани або компоненти позаклітинного матриксу в тканинах жертв, збільшуючи поширення отрути в тканинах. Ферментативна деградація

білків може призвести до появи молекул, які втратили свою біологічну активність і тому не можуть виконувати притаманні їм функції. У той же час, деякі з цих усічених молекул можуть зберігати ферментативну активність завдяки збереженню активного центру [68]. Однак, будучи структурно дефектними, вони можуть уникнути інгібування класичними інгібіторами. У світлі отриманих результатів, нами досліджено інтенсивність протеолізу у щурів, яким ввели зміїну отруту, у печінці. Наші дані показали, що введення зміїної отрути викликало як підвищення активності ферментів, так і появу активних ферментів, яких в цьому органі немає в фізіологічних умовах.

Одним із механізмів шкідливої дії отруйних змій вважають зміну активності тканинних протеаз. Точні молекулярні механізми, за допомогою яких зміїна отрута викликає активацію протеази в тканинах жертв, досі невідомі. Можна припустити, що зміни в протеолітичному паттерні в печінці частково пов'язані із запаленням і окислювальним стресом, які розвиваються у відповідь на вплив зміїної отрути. Активні форми кисню через регуляцію редокс-чутливих шляхів впливають на експресію як протеаз, так і їх інгібіторів, що, можливо, призводить до аномальної активації протеаз [92]. Крім того, ферментативні компоненти зміїної отрути можуть безпосередньо активувати зимогени в тканинах жертви з переходом їх в активні форми. Неконтрольований і надмірний протеоліз може спровокувати дисфункцію клітин і навіть їх загибель, в основному через некроз.

Отруєння зміїною отрутою характеризується розвитком гострої інтоксикації. Серед проявів інтоксикації – накопичення низькомолекулярних речовин (НМР) у тканинах і біологічних рідинах постраждалих, що є маркером цього стану [118]. Фракція НМР неоднорідна і складається з речовин з молекулярною масою до 5000 Да [35]. Більшість цих молекул є типовими для нормального обміну речовин і виявляються в мінімальних концентраціях у фізіологічних умовах. Проте підвищення їх концентрації вище фізіологічних значень, або поява надлишкової кількості продуктів порушеного метаболізму

можуть бути потенційно шкідливими для клітин, оскільки впливають на біохімічні процеси [258].

Щоб з'ясувати, чи викликає отрута V. berus berus і V. berus nikolskii появу НМР, ми оцінювали рівні цих речовин у печінці. Накопичення НМР, особливо пептидів, однозначно свідчить про інтенсифікацію катаболічного процесу і може бути свідченням стану інтоксикації в органах щурів, яким вводили зміїну отруту. Оскільки найбільш значні зміни були виявлені в пептидному компоненті НМР, пептидну фракцію додатково аналізували за допомогою ексклюзійної хроматографії. Поява пептидів середньої молекулярної маси в печінці щурів відповідає зниженню рівня білка. Це може побічно вказувати на посилення протеолітичної деградації білків.

Слід зазначити, що зміни якісного та кількісного складу пептидів є не лише результатом метаболічних порушень, опосередкованих зміїною отрутою, але й можуть бути однією з причин подальших ускладнень у постраждалих. За сучасними уявленнями сукупність пептидів у тканині (пептидний пул) бере активну участь у підтримці та регуляції тканинного гомеостазу. У фізіологічних умовах пептиди регулюють ріст, ремоделювання, відновлення та розвиток тканин [109]. Однак інтенсифікація протеолізу одночасно з порушенням кліренсу пептидів може призвести до накопичення пептидів, які можуть мати біологічну активність і впливати на клітинні процеси. Будучи структурно подібними до природних пептидів, ці біологічно активні пептиди можуть зв’язуватися з клітинними рецепторами, впливаючи на внутрішньоклітинний метаболізм. Пептиди можуть збільшити токсичність отрути, викликаючи та посилюючи запалення або індукуючи транскрипцію ферментів, а саме металопротеаз.

Отруєння, як результат укусів змій та гадюк, супроводжуються морфологічними зрушеннями в організмі постраждалих. Вчені досліджували серологічні маркери гострої гепатотоксичності, спричиненої дією отрути змій Echys pyramidum у щурів. Через 3-6 годин після інтраперитонеального введення її дослідним тваринам виявляли виражені зміни функціональної

активності органу. Зокрема, реєстрували зростання в сироватці крові рівнів АЛТ, лужної фосфатази, гамаглутамілтранспептидази (GGT) та білірубіну. Ураження печінки супроводжувалось значним і дозозалежним зниженням активності ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ), а саме супероксиддисмутази (SOD) і каталази (CAT) в тканині печінки. Авторами повідомлялось про активацію перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) внаслідок генерації значної кількості активних форм кисню (АФК), що призводило до апоптозу гепатоцитів. Крім того, характерним було зростання маркерів окисного стресу (ОС), активності цитоплазматичних, лізосомальних та позаклітинних матрикс-деградуючих ферментів, рівнів прозапальних медіаторів [32].

За даними окремих досліджень, токсини гадюк Crotalus durissus terrificus спричиняють розвиток гострого ураження печінки. Введення її щурам в дозі 100 мг/кг зумовлювало зростання активності АСТ, АЛТ, лужної фосфатази, GGT через 3 години експерименту. Гістологічні дослідження тканини печінки за даних умов в різні терміни (від 3 до 12 годин) продемонстрували наявність дезорганізації структурних компонентів органу, набряк гепатоцитів, подекуди їх некроз. Виявляли також гістіолейкоцитарну інфільтрацію, застійні явища в судинах та значне підвищення функціональної активності клітин Купфера [89].

Результати досліджень щодо гепатотоксичності отрути гадюки Vipera russelli підтвердили розвиток деструктивно-дистрофічних змін будови печінки за умов введення її експериментальним тваринам. При гістологічному дослідженні зразків органу спостерігали ознаки каріопікнозу, каріорексису гепатоцитів, їх вакуольну та жирову дистрофію. Іноді відмічали характерні прояви некрозу клітин печінки, виражене розширення синусоїдних капілярів, застійні явища центральних вен. Властивою була лейкоцитарна інфільтрація тканини печінки. В крові піддослідних щурів реєстрували підвищення активності АЛТ та АСТ [96].

Вивчаючи вплив отрути змій Naja haje на структурно-функціональні параметри печінки лабораторних щурів, вчені довели її гепатотоксичну дію та здатність спричиняти розвиток ОС. В сироватці крові тварин підвищувались рівні АСТ, АЛТ, GGT, білірубіну. Характерними були активація ПОЛ та зростання NO в гомогенатах печінки. При цьому значно знижувався вміст глутатіону в плазмі крові і тканині органу та активність таких ферментів, як глутатіонредуктази (GR), глутатіон-S-трансферази (GST), CAT. Водночас виявляли високі рівні SOD і глутатіон пероксидази (GPx). Автори зазначають, що за даних умов порушувалось функціонування комплексів дихального ланцюга мітохондрій гепатоцитів, зокрема II, III та V. Гістологічні дослідження виявили лейкоцитарну інфільтрацію тканини печінки навколо центральних вен, розширення синусоїдних капілярів, вакуолізацію цитоплазми гепатоцитів, зростання активності клітин Купфера. Подекуди відмічали важкі некрози або апоптоз клітин печінки. Імуногістохімічні дослідження встановили виражену активність каспази-3 в гепатоцитах, що демонструє їх високу готовність до апоптозу [26].

За даними наших досліджень, при дії отрути Vipera berus berus відбуваються реактивні альтеративні зміни у стромі та паренхімі органу; порушення синусоїдних гемокапілярів, просвіти яких нерівномірно розширені, повнокровні з стазом еритроцитів, відзначається небагато лімфоцитів; в сполучній тканині навколо тріад лейкоцитарна інфільтрація; в просвіті кровонаповнених міжчасточкових вен стази та сладжування еритроцитів. Відзначається нерівномірна активність сукцинатдегідрогенази у часточках; гепатоцити із помірною активністю ферменту забарвлюються інтенсивно, характеризуються великими гранулами диформазану та порохоподібно-аморфним осадом і розташовані переважно у периферійних ділянках часточки. У центролобулярній зоні гепатоцити із низьким ступенем забарвлення, що вказує на зниження сукцинатдегідрогенази у цитоплазмі клітин. У більшості гепатоцитів скупчення рожево-червоних гранул глікогену периферійно, при цьому частина цитоплазми звільнена від вмісту та має

оксифільне забарвлення; окремі клітини із типовою локалізацією даної трофічної сполуки. В різних ділянках печінкової часточки виявляються популяції $CD86^+$ клітин, більшість з них мають світло-коричневу або коричневу цитоплазму із численними відростками, які залягають вздовж просвіту синусоїда, іноді виявляються у перисинусоїдих просторах. Ступінь експресії трансмембранного глікопротеїну CD86 невисокий. Збільшення популяції $CD86^+$ клітин вказує на реактивні запальні процеси.

Різноманітні пошкоджуючі фактори, серед яких токсини природного походження, зумовлюють розвиток структурно-функціональних порушень в тканині органу, які часто носять непередбачуваний характер. На сьогоднішній день доведено, що в основі ураження печінки за умов впливу чинників різного генезу головну роль відводять ОС та асоційованим з ним морфологічним і біохімічним змінам [69]. Зазначений факт пов'язаний з надзвичайно високою чутливістю клітин паренхіми органу до дії вільних радикалів. Органели останніх, такі як мітохондрії, пероксисоми в процесі їх нормальної функціональної активності здатні продукувати певну кількість АФК, що підлягають утилізації компонентами антиоксидантної системи. Однак, при патологічних станах характерним є зростання і накопичення надмірної кількості вільних радикалів, порушення окисного гомеостазу та розвиток стресу, який стає наслідком не лише гістологічних перебудов структурних елементів печінки, але також викликає незворотні зміни метаболізму ліпідів, білків, вуглеводів, модулює шляхи відповідальні за транскрипцію, експресію генів, апоптоз клітин, тощо [29, 30].

За умов дії отрути Vipera berus berus нами встановлені значні зміни ультраструктури паренхіматозного та судинного компонентів. Жовчні капіляри погано контуровані з нечисельними мікроворсинками. Перинуклеарний простір локально розширений. Функціональна напруженість в органі за умов токсичної дії отрути гадюки степової супроводжується гетерогенністю гепатоцитів. Визначається поява чисельних "темних" клітин, в яких цитоплазма містить слабо розвинені органели синтетичного та

енергетичного апаратів, які в значній мірі деструктуризовані. Зростає число осміофільних первинних лізосом, вторинних-фагосом та пероксисом. Зменшується вміст дрібнодисперсних, осміофільних включень глікогену. Виявлялись “світлі” гепатоцити, які містили різко електронносвітлу гіалоплазму, поодинокі мембранні органели, які були нечіткими та фрагментованими. Гемотоксичний вплив отрути гадюки степової спричинив зростання кількості клітин Купфера, які втрачали зв'язок із ендотелієм та мігрували в перисинусодний простір. Зростало число pit-клітин в перисинусодному просторі Діссе як прояв захисних імунних реакцій. Також визначилися клітини Ito з включеннями ліпідних гранул в цитоплазмі. Відзначались дисциркуляторні зміни в органі: звужені або переважно розширені синусоїдні гемокапіляри з наявністю еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів. Стінка капілярів нечітко контурована, базальна мембрана несуцільна із широкими порами та на значних площах відсутня. Часто формує осміофільні гомогенні смужки. Ендотеліальні клітини мали локальний набряк цитоплазматичних ділянок, люменальна поверхня плазмолеми також була нечітко структурована.

Мікроскопічні дослідження печінки щурів, яким у нашому експерименті вводили отруту гадюки Vipera berus nikolskii, встановили значні дистрофічні і запальні зміни паренхіми органу, а саме пошкодження часточкової будови печінки і порушення цитоархітектоніки класичних печінкових часточок. Більшість гепатоцитів характеризувалися дистрофічними змінами, особливо у центролобулярних ділянках, що проявлялись локальними явищами гідропічної дистрофії. Синусоїди кровонаповнені, спостерігається явище сладжування еритроцитів та початок формування тромбів. Втрачалась цілісність будови стінки центральних вен, відмічалось її стоншення та фрагментація. Виявлялись значні лімфогістіоцитарні інфільтрати, що вказують на запальний процес у органі.

Ці дані повністю підтверджені нами і при електронно-мікроскопічному дослідженні. Встановлено, що ступінь вираженості деструктивних змін

судинного та паренхіматозного компонентів органу був більшим, ніж при впливі отрути Vipera berus berus. Зростало число “темних” клітин, каріо- та гіалоплазма яких була підвищеної осміофілії, а органели деструктуризовані, гомогенні. Лізосоми в цитоплазмі чисельні, електроннощільні. Також визначалися “світлі” гепатоцити, цитоплазма яких була низької електронної щільності із поодинокими фрагментованими органелами та великими осміофільними фагосомами. Значні реактивні зміни спостерігалися і в гемокапілярах органу за умов дії гемотоксину. Мікросудини мали рідко звужений просвіт, переважно визначалися повнокровні, із стазами та сладжами еритроцитів у їх просвіті, нейтрофільними гранулоцитами, лімфоцитами. Стінка пошкоджена, цитоплазма ендотелію ущільнена, формує осміофільні смужки, ядра ендотеліоцитів невеликі, видовжені, з нечіткою каріолемою та гетерохроматином по всій площі каріоплазми. Також в центролобулярних ділянках виявлялися гемокапіляри з широким просвітом, деструктуризованою стінкою, в якій цитоплазма локально інтенсивно набрякла та виступає в просвіт гемокапіляра у вигляді лопатоподібних утворів.

В просторі Діссе визначаються pit клітини. Перебіг запальних процесів у печінці проявляється також зростанням числа активних макрофагальних клітин Купфера, що втрачали контакт із ендотелієм та переміщалися в перисинусоїдний простір Діссе і характеризувалися ультраструктурно наявністю в їх цитоплазмі чисельних осміофільних невеликих первинних лізосом та вторинних, об’ємних – фагосом.

Науковці виявляли розвиток запальних процесів в тканині печінки щурів, яким інтраперитонеально вводили отруту змій Calloselasma rhodostoma. Конгломерати запальних клітин спостерігали навколо портальних трактів. Характерними були також застій крові в синусоїдних капілярях, центральних венах, амілоїдоз, дифузний некроз гепатоцитів, їх набряк. Зростала кількість лімфоцитів та клітин Купфера за даних умов. При електронній мікроскопії відмічали набряк мітохондрій клітин печінки, деструктивні зміни цитоплазми, розширення просвітів синусоїдів, накопичення в останніх клітинного детриту.

Визначальними ознаками були пікноз ядер гепатоцитів та виражена еозинофілія цитоплазми [122].

Гістохімічне дослідження, проведене нами з використанням сукцинатдегідрогенази у печінці щурів при введенні отрути гадюки Vipera berus nikolskii показало значне зниження ферменту. Дані зміни вказують на порушення процесу гліколізу у клітинах. Гістохімічне дослідження глікогену у гепатоцитах печінки також показало низький вміст даної трофічної сполуки. У цитоплазмі гепатоцитів наявні локальні, розташовані по краю плазмолеми дрібні гранули. Поодинокі клітини характеризувалися відсутністю глікогену.

При проведеному імуногістохімічному дослідженні печінки тварин, яким вводили отруту гадюки Vipera berus nikolskii встановлено, що по всій площі печінкових часточок виявляються інтенсивно забарвленні $CD86^+$ клітини. Таке збільшення їх популяції у синусоїдах вказує на значні запальні реакції, які спричинені впливом отрути на орган. Цитоплазма $CD86^+$ клітин інтенсивно коричнева, що свідчить про фіксації вторинних антитіл. Також, використовуючи забарвлення гематоксиліном Майера, виявлялися гепатоцити печінкових балок із значними деструктивними змінами, що проявляється просвітленою вакуолізованою цитоплазмою та пікнотизацією ядер. Просвіти синусоїдів були значно розширені або спалися. Порушувалась архітектоніка печінкових часточок.

# ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подано теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-практичного завдання щодо встановлення змін структури печінки щурів, що спостерігаються на тлі впливу отрути гадюк виду Vipera berus.

1. При гістологічному дослідженні за умов впливу отрути гадюки степової мікроскопічно встановлено альтеративні зміни паренхіми печінки та судинні розлади органу. З'являються осередки лейкоцитарної інфільтрації, в складі часточок виявляються числені двоядерні гепатоцити, як пристосувально-компенсаторна реакція органу. За умов впливу отрути гадюки Нікольського встановлено більш значні деструктивні зміни структурних елементів печінки і ланок судинного русла: розширення і кровонаповнення судин, формування тромбів, крововиливи, деструкція стінки гемокапілярів. Активація макрофагів поєднується з лейкоцитарною інфільтрацією ділянок тріад та перипортальних ділянок печінкових часточок. Порушення часточково-балкової будови органу супроводжується гідропічною дистрофією гепатоцитів зі значним зниженням в них вмісту сукценатдегідрогенази та глікогену.

2. Середнє значення коефіцієнта активності сукцинатдегідрогенази у гепатоцитах печінки щурів при впливі отрути змій виду Vipera berus berus становить 3,65 ± 0,17 (у 0,76 раза нижче аналогічного параметра інтактних тварин); глікогену – 3,41 ± 0,16 (у 0,69 раза менше відносно показника інтактних тварин). Ступінь експресії трансмембранного глікопротеїну $CD86^+$ невисокий, проте у порівнянні з інтактною групою тварин інтенсивніший.

При впливі отрути змій виду Vipera berus nikolskii середнє значення площі гепатоцитів дорівнює 223,74 ± 11,14 мкм², (у 1,21 раза перевищує значення інтактних тварин і в 1,16 раза більше аналогічного параметра другої дослідної групи тварин); ядерно-цитоплазматичне співвідношення

гепатоцитів дорівнює 0,177 ± 0,009, (у 0,75 раза нижче показника інтактних тварин і у 0,71 раза менше аналогічного параметра другої дослідної групи тварин). Середнє значення коефіцієнта активності сукцинатдегідрогенази складає 2,07 ± 0,09 (у 0,42 раза нижче показника інтактних тварин та у 0,57 раза нижче відповідного параметра другої експериментальної групи); глікогену – 2,37 ± 0,11 (у 0,48 раза і 0,70 раза менше відносно аналогічного параметра інтактних тварин та другої експериментальної групи). По всій площі печінкових часточок виявляються інтенсивно забарвленні $CD86^+$ клітини.

3. При електронно-мікроскопічному дослідженні структури печінки щурів за умов впливу отрути гадюк виду Vipera berus виявляються значні порушення ультраструктури судинного та паренхіматозного компонентів органу. Токсичний вплив отрути, що носить судинний генез, зумовив пряме пошкодження ультраструктури стінки судин, зокрема синусоїдів, а відтак і значну альтерацію ядер і цитоплазми гепатоцитів. Як прояв захисних механізмів органу на токсичне пошкодження зросло число активних клітин Купфера та pit-клітин. Встановлено, що при впливі на щурів отрути гадюки виду Vipera berus nikolskii зміни деструктивно-денеративного характеру значно вираженіші.

4. При біохімічному дослідженні печінки щурів встановлено, що за умов впливу отрути гадюк виду Vipera berus відбувається зниження вмісту загального білка (при дії отрути Vipera berus berus нижче у 1,43 рази в порівнянні з інтактними тваринами; при дії отрути Vipera berus nikolskii – в 2,23 рази) та білкових фракцій різної молекулярної маси: зниження вмісту білків вищої молекулярної маси на фоні зростання вмісту білків нижчої молекулярної маси (зростання відносного вмісту білків з молекулярною масою 10-35 кДа – в 2,13 рази при впливі отрути Vipera berus berus та в 1,99 рази за введення отрути Vipera berus nikolskii); зростання відносного вмісту молекул середньої маси (при введенні отрути Vipera berus berus відносний вміст молекул середньої маси (що реєструються при 210 нм, 238 нм, 254 нм) перевищував значення інтактних щурів в 1,42 рази, 10 та 20 разів, відповідно;

при введенні отрути Vipera berus nikolskii – в 1,65 рази (при 210 нм), 16,7 рази (при 238 нм) та 2,64 рази (при 254 нм) відповідно); значна активація протеолітичних процесів в досліджуваному органі, при чому вплив отрути Vipera berus nikolskii має більш виражений характер в бік зростання вмісту металоматриксних протеїназ.

# СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ


1. Багрій, М. М., Діброва, В. А., Попадинець, О. Г. & Грищук, М. І. (Ред.). (2016). *Методики морфологічних досліджень.* Вінниця: Нова Книга. (1)

2. Варецька Т.В. (1960). Мікрогетерогенність фібриногену. Кріофібриноген. *Укр. біохім. Журн,* 32, 2, С.13-24.

3. Войцех, П., & Росс, М. Г. (2021). *Гістологія: підручник і атлас. З основами клітинної та молекулярної біології: пер. з англ. 8-го вид. у 2 т. Т. 2*. Київ: ВСВ «Медицина». (2)

4. Горальський, Л. П., Хомич, В. Т., & Кононський, О. І. (2011). *Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології*. Житомир: Полісся. (3)

5. Дзержинський, М. Е., Скрипник, Н. В., Островська, Г. В., Гарматіна, С. М., Пазюк, Л. М., Бузинська, Н. О., … Вороніна О. К. (2010). *Загальна цитологія і гістологія: підручник.* Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет». (4)

6. Добреля, Н. В., Бойцова, Л. В. & Данова, І. В. (2015). Правова база для проведення етичної експертизи доклінічних досліджень лікарських засобів з використанням лабораторних тварин. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 2, 95-100. (5)

7. Луцик, О. Д., Чайковський, Ю. Б., Барінов, Е. Ф., Білаш, С. М., Білий, Р. О., Бобришева, І. В., … Ященко, А. М. (2018). *Гістологія. Цитологія. Ембріологія: підручник.* Вінниця: Нова Книга. (6)

8. Маляр-Газда, Н. М., & Борсенко, М. І. (2014). Гемодинамічні параметри кровоплину та динаміка інтоксикаційного синдрому у пацієнтів після укусу отруйних змій. *Науковий вісник Ужгородського університету, серія «Медицина»*, 2 (50), 17-20. (7)

9. Мельницька, Г. М., & Погоріла, І. О. (2015). *Отруйні змії України. Біологічні дослідження: збірник наукових праць*. Житомир: ПП «Рута», 394-397. (8)

10. Романенко, О. В. (2013). Токсини отруйних наземних і водних рептилій як екологічні чинники. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол*., 2 (55), 112-117. (9)

11. Рыбальченко В.К. & Коганов Н.М (1988). Структура и функции мембран. *Практикум – К.:Вища школа,* С. 79-83.

12. Турбал Л.В. (2024). *Вплив отрути гадюки Нікольського на мікроскопічний стан печінки щурів.* Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «МОРФОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ» (IV ЖУТАЄВСЬКІ ЧИТАННЯ", Полтава, 18–19 квітня 2024 року – Полтава – С. 93–95.

13. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2023). *Біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути гадюк виду Vipera berus*. Збірник наукових праць: XIX Наукова - конференція "Львівські хімічні читання – 2023", Львів, 29–31 травня 2023 року – Львів: Видавництво від А до Я, 2023. – 254 с. (стор. 183). Львів.

14. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2023). *Вплив отрути змій виду Vipera berus на морфофункціональні зміни печінки*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «МОРФОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ» (III ЖУТАЄВСЬКІ ЧИТАННЯ", Полтава, 20–21 квітня 2023 року – Полтава – С. 80–81.

15. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2024). *Гістологічні дослідження структурних компонентів печінки щурів при дії отрути гадюк виду Vipera berus*. Збірник тез науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» до 70-річного ювілею професора кафедри гістології, цитології та ембріології, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Олександра Дмитровича ЛУЦИКА, Львів, 10 травня 2024 року – Львів: – С. 144–146.

16. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2024). *Гістохімічні дослідження структурних компонентів печінки лабораторних тварин при дії отрути гадюки Нікольського*. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій 100 – річчю професора К.С. Кабака «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці»», Київ, 13-14 червня, 2024 року – Київ. – С.77.

17. Турбал Л.В., Маєвський Є.О., Яременко Л.М. & Коновалова Л.В. (2023). *Вплив отрути гадюки звичайної на мікроскопічний стан печінки лабораторних тварин в експерименті.* Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій пам'яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю.Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці», Київ, 8-9 червня, 2023 року – Київ. – С. 143–144.

18. Турбал Л.В., Маєвський Є.О., Яременко Л.М. & Коновалова Л.В. (2024). *Вплив отрути гадюк виду Vipera berus на морфологічні зміни печінки щурів.* Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання морфології», присвяченої 100-річчю від дня народження Лева Михайловича ЛИЧКОВСЬКОГО, Львів, 17 травня, 2024 року – Львів. – С. 221–222.

19. Шальнєв, О. Ю., Шилан, В. І., & Шилан, К. В. (2016). Смерть від отруєння зміїнною отрутою, як наслідок укусу гадюки. *Судово-медична експертиза*, 2, 85-87. (10)

20. Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *J Vis Exp*, 159: 10.3791/61122. doi: 10.3791/61122. (11)

21. Alangode, A., Rajan, K., & Nair, B. G. (2020). Snake antivenom: Challenges and alternate approaches. *Biochem Pharmacol*, 181: 114135. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114135. (14)

22. Alekseeva, A. S., Tretiakova, D. S., Chernikov, V. P., Utkin, Yu. N., Molotovsky, J. G., Vodovozova, E. L., … Boldyrev, I. A. (2017). Heterodimeric V.

nikolskii phospholipases $A_2$ induce aggregation of the lipid bilayer. *Toxicon*, 133, 169-179. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.05.015. (15)

23. Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem*, 44 (3): e13145. doi: 10.1111/jfbc.13145. (16)

24. Almeida, J. R., Resende, L. M., Watanabe, R. K., Carregari, V. C., Huancahuire-Vega, S., da S Caldeira, C. A., … Da Silva, S. L. (2017). Snake venom peptides and low mass proteins: Molecular tools and therapeutic agents. *Curr Med Chem*, 4 (30): 3254-3282. doi: 10.2174/0929867323666161028155611. (17)

25. Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriel, A., & Abousalham, A. (2018). Phospholipases: An overview. *Methods Mol Biol*, 1835, 69-105. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_3. (18)

26. Al-Quraishy, S., Dkhil, M. A., & Abdel Moneim, A. E. (2014). Hepatotoxicity and oxidative stress induced by Naja haje crude venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 20 (1). doi: 10.1186/1678-9199-20-42. (13) (1).

27. Al-Sadoon, M. K., Diab, M. S., Bauomy, A. A., & Abdel Moneim, A. E. (2014). Cerastes cerastes gasperetti venom induced hematological alterations and oxidative stress in male mice. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 8, 693-702. (12)

28. Amado, T. F., Moura, T. A., Riul, P., Lira, A. F. A., Badillo-Montaño, R., & Martinez, P. A. (2021). Vulnerable areas to accidents with scorpions in Brazil. *Trop Med Int Health*, 26 (5), 591-601. doi: 10.1111/tmi.13561. (19)

29. Ambade, A., & Mandrekar, P. (2012). Oxidative stress and inflammation: essential partners in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol*, 2012: 853175. doi: 10.1155/2012/853175. (20) (2)

30. Arauz, J., Ramos-Tovar, E., & Muriel, P. (2016). Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol*, 15 (2), 160-173. doi: 10.5604/16652681.1193701. (21) (3)

31. Arruda Macedo, J. K., Fox, J. W., & de Souza Castro, M. (2015). Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and

therapy. *Curr Protein Pept Sci*, 16 (6), 532-548. doi: 10.2174/1389203716666150515125002. (22)

32. Asmari, A. K., Khan, H. A., Banah, F. A., Buraidi, A. A., & Manthiri, R. A. (2015). Serum biomarkers for acute hepatotoxicity of Echis pyramidum snake venom in rats. *Int J Clin Exp Med*, 8 (1), 1376-1380. (23) (2)

33. Augustine, J., Troendle, E. P., Barabas, P., McAleese, C. A., Friedel, T., Stitt, A. W., … Curtis, T. M. (2021). The role of lipoxidation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11: 621938. doi: 10.3389/fendo.2020.621938. (24)

34. Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 360438. doi: 10.1155/2014/360438. (25)

35. Bakalyuk, O., Punchyshyn, N. & Dziga, S. (2000). The syndrom of the endogenic intoxication, mechanism of formation, methods of identification. *Bull Scientific Research*, 1, 11-13. (20)

36. Balija, T., Leonardi, A., Brgles, M., Sviben, D., Kurtovic, T., Halassy, B., … Krizaj, I. (2020). Biological activities and proteomic profile of the venom of Vipera ursinii ssp., a very rare Karst Viper from Croatia. *Toxins (Basel)*, 12 (3): 187. doi: 10.3390/toxins12030187. (26)

37. Banerjee, P., Jana, S., Chakraborty, S., & Swarnakar, S. (2013). Inflammation and MMPs in alcohol-induced liver diseases and protective action of antioxidants. *Indian J Biochem Biophys*, 50 (5), 377-386. (27)

38. Bawaskar, H. S., & Bawaskar, P. H. (2019). Snake bite: prevention and management in rural Indian settings. *Lancet Glob Health*, 7 (9): e1178. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30275-X. (28)

39. Bayat, M., Daei, S., Ziamajidi, N., Abbasalipourkabir, R., & Nourian, A. (2021). The protective effects of vitamins A, C, and E on zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs)-induced liver oxidative stress in male Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*, 16, 1-10. doi: 10.1080/01480545.2021.2016809. (29)

40. Bennett, J. M., Sunday, J., Calosi, P., Villalobos, F., Martínez, B., Molina-Venegas, R., … Olalla-Tárraga, M. Á. (2021). The evolution of critical thermal limits of life on Earth. *Nat Commun*, 12 (1): 1198. doi: 10.1038/s41467-021-21263-8. (30)

41. Bertholim, L., Chaves, A. F. A., Oliveira, A. K., Menezes, M. C., Asega, A. F., Tashima, A. K., … Serrano, S. M. T. (2021). Systemic effects of hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Untargeted peptidomics to explore the pathodegradome of plasma proteins. *Toxins (Basel)*, 13 (11): 764. doi: 10.3390/toxins13110764. (31)

42. Bickler, P. E. (2020). Amplification of snake venom toxicity by endogenous signaling pathways. *Toxins (Basel)*, 12 (2): 68. doi: 10.3390/toxins12020068. (32)

43. Bio-Radlaboratoriesinc. (2015). *A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection.* [online] Available at: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/ lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

44. Bocian, A., Urbanik, M., Hus, K., Łyskowski, A., Petrilla, V., Andrejčáková, Z., … Legath, J. (2016). Proteome and peptidome of vipera berus berus venom. *Molecules*, 21 (10): 1398. doi: 10.3390/molecules21101398. (33)

45. Boda, F., Banfai, K., Garai, K., Curticapean, A., Berta, L., Sipos, E., … Kvell, K. (2018). Effect of vipera ammodytes ammodytes snake venom on the human cytokine network. *Toxins (Basel)*, 10 (7): 259. doi: 10.3390/toxins10070259. (34)

46. Boeno, C. N., Paloschi, M. V., Lopes, J. A., Pires, W. L., Setúbal, S. D. S., Evangelista, J. R., … Zuliani, J. P. (2019). Inflammasome activation induced by a snake venom Lys49-phospholipase $A_2$ homologue. *Toxins (Basel)*, 12 (1): 22. doi: 10.3390/toxins12010022. (35)

47. Boldrini-Franca, J., Cologna, C. T., Pucca, M. B., Bordon, K. C., Amorim, F. G., Anjolette, F. A., … Arantes, E. C. (2016). Minor snake venom proteins: Structure, function and potential application. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1861 (4), 824-838. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.12.022. (36)

48. Bolon, I., Durso, A. M., Mesa, S. B., Ray, N., Alcoba, G., Chappuis, F., … Ruiz de Castaneda, R. (2020). Identifying the snake: first scoping review on practices of communities and healthcare providers confronted with snakebite across the world. *PLoS One*, 15 (3): e0229989. doi: 10.1371/journal.pone.0229989. (37)

49. Bolt, H. M. (2021). New aspects in snake venom toxicology. *Arch Toxicol*, 95 (6), 1865-1866. doi: 10.1007/s00204-021-03066-4. (38)

50. Borges, R. J., Lemke, N., & Fontes, M. R. M. (2017). $PLA_2$-like proteins myotoxic mechanism: a dynamic model description. *Sci Rep*, 7 (1): 15514. doi: 10.1038/s41598-017-15614-z. (39)

51. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry,* 72(1-2), pp. 248–254

52. Bresciani, G., da Cruz, I. B., & González-Gallego, J. (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. *Adv Clin Chem*, 68, 87-130. doi: 10.1016/bs.acc.2014.11.001. (40)

53. Cañas, C. A., Castaño-Valencia, S., Castro-Herrera, F., Cañas, F., & Tobón, G. J. (2020). Biomedical applications of snake venom: from basic science to autoimmunity and rheumatology. *J Transl Autoimmun*, 4: 100076. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100076. (42)

54. Canas, C. A., Castro-Herrera, F., & Castano-Valencia, S. (2021). Clinical syndromes associated with Viperidae family snake envenomation in southwestern Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 115 (1), 51-56. doi: 10.1093/trstmh/traa081. (41)

55. Carvalho, L. H., Teixeira, L. F., Zaqueo, K. D., Bastos, J. F., Nery, N. M., Setúbal, S. S., … Zuliani, J. P. (2019). Local and systemic effects caused by Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus collilineatus, and Crotalus durissus cascavella snake venoms in swiss mice. *Rev Soc Bras Med Trop*, 52: e20180526. doi: 10.1590/0037-8682-0526-2018. (43)

56. Casewell, N. R., Jackson, T. N. W., Laustsen, A. H., & Sunagar, K. (2020). Causes and consequences of snake venom variation. *Trends Pharmacol Sci*, 41 (8), 570-581. doi: 10.1016/j.tips.2020.05.006. (44)

57. Castro, A. C., Escalante, T., Rucavado, A., & Gutiérrez, J. M. (2021). Basement membrane degradation and inflammation play a role in the pulmonary hemorrhage induced by a P-III snake venom metalloproteinase. *Toxicon*, 197, 12-23. doi: 10.1016/j.toxicon.2021.04.012. (45)

58. Cavalcante, W. L. G., Noronha-Matos, J. B., Timóteo, M. A., Fontes, M. R. M., Gallacci, M., & Correia-de-Sá, P. (2017). Neuromuscular paralysis by the basic phospholipase $A_2$ subunit of crotoxin from Crotalus durissus terrificus snake venom needs its acid chaperone to concurrently inhibit acetylcholine release and produce muscle blockage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 334, 8-17. doi: 10.1016/j.taap.2017.08.021. (46)

59. Cerdo, R. C. A., Menaldo, D. L., Costa, T. R., Zoccal, K. F., Sartim, M. A., Santos-Filho, N. A., … Sampaio, S. V. (2018). Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase $A_2$ from Bothrops jararaca snake venom. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 24: 33. doi: 10.1186/s40409-018-0170-y. (47)

60. Cesar, P. H. S., Braga, M. A., Trento, M. V. C., Menaldo, D. L. & Marcussi, S. (2019). Snake venom disintegrins: An overview of their interaction with integrins. *Curr Drug Targets*, 20 (4), 465-477. doi: 10.2174/1389945011966618102215473 7. (48)

61. Chaisakul, J., Khow, O., Wiwatwarayos, K., Rusmili, M. R. A., Prasert, W., Othman, I., … Chaiyabutr, N. (2021). A biochemical and pharmacological characterization of phospholipase $A_2$ and metalloproteinase fractions from eastern Russell's viper (Daboia siamensis) venom: two major components associated with acute kidney injury. *Toxins (Basel)*, 13 (8): 521. doi: 10.3390/toxins13080521. (49)

62. Chaiyabutr, N., Chanhome, L., Vasaruchapong, T., Laoungbua, P., Khow, O., Rungsipipat, A., … Sitprija, V. (2020). The pathophysiological effects of Russell’s viper (Daboia siamensis) venom and its fractions in the isolated perfused

rabbit kidney model: A potential role for platelet activating factor. *Toxicon X*, 7: 100046. doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100046. (50)

63. Chan, Y. S., Cheung, R. C. F., Xia, L., Wong, J. H., Ng, T. B., & Chan, W. Y. (2016). Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100 (14), 6165-6181. doi: 10.1007/s00253-016-7610-9. (51)

64. Charvat, R. A., Strobel, R. M., Pasternak, M. A., Klass, S. M., & Rheubert, J. L. (2018). Analysis of snake venom composition and antimicrobial activity. *Toxicon*, 150, 151-167. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.05.016. (52)

65. Chen, N., Xu, S., Zhang, Y., & Wang, F. (2018). Animal protein toxins: origins and therapeutic applications. *Biophys Rep*, 4 (5), 233-242. doi: 10.1007/s41048-018-0067-x. (53)

66. Chen, W., & Zhu, M. (2021). Drug-induced hepatotoxicity linked to zoledronic acid in the treatment of an elderly man with primary osteoporosis. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 59 (11), 721-724. doi: 10.5414/CP203987. (54)

67. Chibber B.A., Deutsch D.G. & Mertz E.T. (1974). Affinity chromatography of plasminogen. *Methods Enzymol,* 34, P. 424-432

68. Chornenka, N., Domylivska, L., Kravchenko, O., Koval, T., Torgalo, L., Kostiuk, A…. Ostapchenko, L. (2020). The effect of melanin on the proteolytic potential of blood under alkali esophageal burn. *J. Biol. Res.*, 93(8577), 63-67. https://doi.org/10.4081/jbr.2020.8577 (16)

69. Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*, 20 (25), 8082-8091. doi: 10.3748/wjg.v20.i25.8082. (55) (10)

70. Costal-Oliveira, F., Stransky, S., Guerra-Duarte, C., Naves de Souza, D. L., Vivas-Ruiz, D. E., Yarlequé, A., … Braga, V. M. M. (2019). L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. *Sci Rep*, 9 (1): 781. doi: 10.1038/s41598-018-37435-4. (56)

71. Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radic Biol Med*, 95, 27-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028. (57)

72. Cristina, R. T., Kocsis, R., Tulcan, C., Alexa, E., Boldura, O. M., Hulea, C. I., … Muselin, F. (2020). Protein structure of the venom in nine species of snake: from bio-compounds to possible healing agents. *Braz J Med Biol Res*, 53 (1): e9001. doi: 10.1590/1414-431X20199001. (58)

73. Dai, D. F., Chiao, Y. A., Martin, G. M., Marcinek, D. J., Basisty, N., Quarles, E. K., … Rabinovitch, P. S. (2017). Mitochondrial-targeted catalase: Extended longevity and the roles in various disease models. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 146, 203-241. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.015. (59)

74. De Souza, C. A., Kayano, A. M., Setúbal, S. S., Pontes, A. S., Furtado, J. L., Kwasniewski, F. H., … Zuliani, J. P. (2012). Local and systemic biochemical alterations induced by Bothrops atrox snake venom in mice. *J Venom Res*, 3, 28-34. (60)

75. Dehghani, F., Hossieni, S. A., Noorafshan, A., Panjehshahin, M. R., & Esmaeilpour, T. (2021). Effect of selenium on quantitative structural changes in dexamethasone-induced immunodeficiency rat models. *Iran J Med Sci*, 46 (2), 128-135. doi: 10.30476/ijms.2020.81137.0. (61)

76. Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022). Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *J Pharm Biomed Anal*, 209: 114477. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114477. (62)

77. Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, A. N. (2019). TGF-β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019. *Cells*, 8 (11): 1419. doi: 10.3390/cells8111419. (63)

78. Dham, D., Roy, B., Gowda, A., Pan, G., Sridhar, A., Zeng, X., … Palaniyandi, S. S. (2021). 4-Hydroxy-2-nonenal, a lipid peroxidation product, as a biomarker in diabetes and its complications: challenges and opportunities. *Free Radic Res*, 55 (5), 547-561. doi: 10.1080/10715762.2020.1866756. (64)

79. Dhar, D., Baglieri, J., Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2020). Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245(2), 96-108. doi: 10.1177/1535370219898141. (65)

80. Di Nicola, M. R., Pontara, A., Kass, G. E. N., Kramer, N. I., Avella, I., Pampena, R., … Paolino, G. (2021). Vipers of major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites. *Toxicology*, 453: 152724. doi: 10.1016/j.tox.2021.152724. (66)

81. Dyachenko, I. A., Murashev, A. N., Andreeva, T. V., Tsetlin, V. I., & Utkin, Y. N. (2013). Analysis of nociceptive effects of neurotoxic phospholipase $A_2$ from Vipera nikolskii venom in mice. *J Venom Res*, 4, 1-4. (67)

82. Elias-Miró, M., Jiménez-Castro, M. B., Rodés, J., & Peralta, C. (2013). Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radic Res*, 47 (8), 555-568. doi: 10.3109/10715762.2013.811721. (68)

83. Escalante, T., Rucavado, A., Fox, J. W. & Gutierrez, J. M. (2011). Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteomics*, 74, 1781-1794. doi: 10.1016/j.jprot.2011.03.026 (15)

84. Fernández-Solà, J. (2020). The effects of ethanol on the heart: alcoholic cardiomyopathy. *Nutrients*, 12 (2): 572. doi: 10.3390/nu12020572. (69)

85. Ferras, C. R., Arrahman, A., Xie, C., Casewell, N. R., Lewis, R. J., Kool, J., … Cardoso, F. C. (2019). Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. *Front Ecol Evol*, 7. doi: 10.3389/fevo.2019.00218. (70)

86. Ferreira, B. A., Deconte, S. R., de Moura, F. B. R., Tomiosso, T. C., Clissa, P. B., Andrade, S. P., … Araujo, F. A. (2018). Inflammation, angiogenesis and fibrogenesis are differentially modulated by distinct domains of the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Int J Biol Macromol*, 119, 1179-1187. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.051. (71)

87. Ferreira, I. G., Pucca, M. B., Oliveira, I. S., Cerni, F. A., Jacob, B. C. D. S., & Arantes, E. C. (2021). Snake venom vascular endothelial growth factors

(svVEGFs): Unravelling their molecular structure, functions, and research potential. *Cytokine Factor Rev*, 60, 133-143. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.05.003. (72)

88. Foettinger, A., Leitner, A. & Lindner, W. (2017). Selective enrichment of tryptophan-containing peptides from protein digests employing a reversible derivatization with malondialdehyde and solid-phase capture on hydrazide beads. *J. Proteome Res*., 16(7), pp. 3827-3834.

89. França, R. F., Vieira, R. P., Ferrari, E. F., Souza, R. A., Osorio, R. A. L., Prianti-Jr, A. C. G., … Ribeiro, W. (2009). Acute hepatotoxicity of Crotalus durissus terrificus (South American rattlesnake) venom in rats. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis,* 15 (1), 61-78. (74) (8)

90. Frangieh, J., Rima, M., Fajloun, Z., Henrion, D., Sabatier, J. M., Legros, C., … Mattei, C. (2021). Snake venom components: Tools and cures to target cardiovascular diseases. *Molecules*, 26 (8): 2223. doi: 10.3390/molecules26082223. (73)

91. Fukao, Y., Yoshida, M., Kurata, R. & Kobayashi, M. (2013). Peptide separation methodologies for in-depth proteomics in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 54(8), pp. 808-815.

92. Gaffney, J., Solomonov, I., Zehorai, E. & Sagi, I. (2015). Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo/ *Matrix Biol.*, 44-46, 191-199. PMID – 25622911. (17)

93. Galicia-Moreno, M., & Gutiérrez-Reyes, G. (2014). The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Rev Gastroenterol Mex*, 79 (2), 135-144. doi: 10.1016/j.rgmx.2014.03.001. (75)

94. Gao, P. C., Chu, J. H., Chen, X. W., Li, L. X., & Fan, R. F. (2021). Selenium alleviates mercury chloride-induced liver injury by regulating mitochondrial dynamics to inhibit the crosstalk between energy metabolism disorder and NF-κB/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation. *Ecotoxicol Environ Saf*, 228: 113018. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.113018. (76)

95. Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2019). Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem Phys Lipids*, 221, 46-52. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011. (77)

96. Ghosh, R., Mana, K., & Sarkhel, S. (2018). Ameliorating effect of Alstonia scholaris L. bark extract on histopathological changes following viper envenomation in animal models. *Toxicol Rep*, 5, 988-993. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.10.004. (78) (9)

97. Giannotti, K. C., Leiguez, E., Carvalho, A. E. Z., Nascimento, N. G., Matsubara, M. H., Fortes-Dias, C. L., … Teixeira, C. (2017). A snake venom group IIA $PLA_2$ with immunomodulatory activity induces formation of lipid droplets containing 15-d-$PGJ_2$ in macrophages. *Sci Rep*, 7 (1): 4098. doi: 10.1038/s41598-017-04498-8. (79)

98. Grunert, T., Pock, K., Buchacher, A. & Allmaier, G. (2013). Selective solid-phase isolation of methionine-containing peptides and subsequent matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometric detection of methionine- and of methionine-sulfoxide-containing peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom*., 17(3), pp. 1815-1824.

99. Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., & Warrell, D. A. (2017). Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17063. doi: 10.1038/nrdp.2017.63. (80)

100. Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., & Fox, J. W. (2016). A comprehensive view of the structure and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins (Basel)*, 8 (10): 304. doi: 10.3390/toxins8100304. (81)

101. Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., Escalante, T., Herrera, C., Fernández, J., Lomonte, B., … Fox, J. W. (2018). Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. *Toxicon*, 148, 123-131. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.016. (82)

102. Handy, D. E., & Loscalzo, J. (2022). The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. *Free Radic Biol Med*, 188, 146-161. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.004. (83)

103. Hermansen, M. N., Krug, A. H., Tjønnfjord, E., & Brabrand, M. (2019). Envenomation by the common European adder (Vipera berus): a case series of 219 patients. *Eur J Emerg Med*, 26 (5), 362-365. doi: 10.1097/MEJ.0000000000000577.

104. Herzig, V. (2021). Animal venoms – curse or cure? *Biomedicines*, 9 (4): 413. doi: 10.3390/biomedicines9040413. (84)

105. Herzig, V., Cristofori-Armstrong, B., Israel, M. R., Nixon, S. A., Vetter, I., & King, G. F. (2020). Animal toxins – nature's evolutionary-refined toolkit for basic research and drug discovery. *Biochem Pharmacol*, 181: 114096. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114096. (85)

106. Hiu, J. J., & Yap, M. K. K. (2020). Cytotoxicity of snake venom enzymatic toxins: phospholipase $A_2$ and L-amino acid oxidase. *Biochem Soc Trans*, 48(2), 719-731. doi: 10.1042/BST20200110. (86)

107. Ho Cheng-Hsuan, Chiang Liao-Chun, Mao Yan-Chiao, Lan Kuo-Cheng, Tsai Shih-Hung, Shih.Yu-Jen… Liu Shing-Hwa (2021). Analysis of the Necrosis-Inducing Components of the Venom of *Naja atra* and Assessment of the Neutralization Ability of Freeze-Dried Antivenom. *Toxins*, 13(9), 619. https://doi.org/10.3390/toxins13090619. (14)

108. Ighodaro, O. M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*, 108, 656-662. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.058. (87)

109. Ivanov, V. T., Yatskin, O. N., Kalinina, O. A., Philippova, M. M., Karelin, A. A. & Blishchenko, E. Y. (2020). Tissue-specific peptide pools. Generation and function. *Pure Appl. Chem.,* 72(3), 355-363. https://doi.org/10.1351/pac200072030355. (22)

110. Izidoro, L. F., Sobrinho, J. C., Mendes, M. M., Costa, T. R., Grabner, A. N., Rodrigues, V. M., … Soares, A. M. (2014). Snake venom L-amino acid

oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. *Biomed Res Int*, 2014: 196754. doi: 10.1155/2014/196754. (88)

111. Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Reactive oxygen species – sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*, 48 (284), 124-127. (89)

112. Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Dec, K., Kawczuga, D., & Janda, K. (2020). Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. *Pol Merkur Lekarski*, 48 (284), 128-132. (90)

113. Jayakrishnan, M. P., Geeta, M. G., Krishnakumar, P., Rajesh, T. V., & George, B. (2017). Snake bite mortality in children: beyond bite to needle time. *Arch Dis Child*, 102 (5), 445-449. doi: 10.1136/archdischild-2016-311142. (91)

114. Jenkins, T. P., Sánchez, A., Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T. K., … Gutiérrez, J. M. (2017). An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon*, 139, 87-93. doi: 10.1016/j.toxicon. (92)

115. Jeon, Y. J., Kim, J. W., Park, S., & Shin, D. W. (2019). Risk factor, monitoring, and treatment for snakebite induced coagulopathy: a multicenter retrospective study. *Acute Crit Care*, 34 (4), 269-275. doi: 10.4266/acc.2019.00591. (93)

116. Jia, X., Wu, Y., & Liu, P. (2011). Effects of flour bleaching agent on mice liver antioxidant status and ATPases. *Environ Toxicol Pharmacol*, 31 (3), 479-484. doi: 10.1016/j.etap.2011.03.009. (94)

117. Kaji, H., Yamauchi, Y., Takahashi, N. & Isobe, T. (2017). Mass spectrometric identification of N-linked glycopeptides using lectin-mediated affinity capture and glycosylation site-specific stable isotope tagging. *Nat. Protoc*., 11(5), pp. 3019-3027.

118. Kalashnikova, S., Polyakova, L. & Shchyogolev, A. (2011). Morphology of Endocrine Organs in Chronic Endogenous Intoxication. *Bull. Exp. Biol.* Med., 151(2), 247-249. https://doi.org/10.1007/s10517-011-1300-5 (18)

119. Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P…. Sharma, S. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J*, 278, 4544-4576. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08142.x. (12).

120. Karabuva, S., Lukšić, B., Brizić, I., Latinović, Z., Leonardi, A., & Križaj, I. (2017). Ammodytin L is the main cardiotoxic component of the Vipera ammodytes ammodytes venom. *Toxicon*, 139, 94-100. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.003. (95)

121. Kebir-Chelghoum, H., & Laraba-Djebari, F. (2017). Cytotoxicity of Cerastes cerastes snake venom: involvement of imbalanced redox status. *Acta Trop*, 173, 116-124. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.06.010. (96)

122. Khimmaktong, W., Nuanyaem, N., Lorthong, N., Hodgson, W. C., & Chaisakul, J. (2022). Histopathological Changes in the Liver, Heart and Kidneys Following Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) Envenoming and the Neutralising Effects of Hemato Polyvalent Snake Antivenom. *Toxins (Basel)*, 14 (9): 601. doi: 10.3390/toxins14090601. (17)

123. Kini, R. M., & Koh, C. Y. (2016). Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins (Basel)*, 8 (10): 284. doi: 10.3390/toxins8100284. (97)

124. Kleniewska, P., Piechota-Polanczyk, A., Michalski, L., Michalska, M., Balcerczak, E., Zebrowska, M., … Goraca, A. (2013). Influence of block of NF-kappa B signaling pathway on oxidative stress in the liver homogenates. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 308358. doi: 10.1155/2013/308358. (98)

125. Kryukova, E. V., Potapenko, A. S., Andreeva, T. V., Ivanov, I. A., Ryabinin, V. V., Ziganshin, R. H., … Utkin, Y. N. (2019). Dimeric disintegrins from the steppe viper V. ursinii venom. *Dokl Biochem Biophys*, 488 (1), 338-341. doi: 10.1134/S1607672919050132. (99)

126. Kuo, Y. J., Chung, C. H., & Huang, T. F. (2019). From discovery of snake venom disintegrins to a safer therapeutic antithrombotic agent. *Toxins (Basel)*, 11 (7): 372. doi: 10.3390/toxins11070372. (100)

127. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 (5259), pp. 680-685

128. Lafnoune, A., Lee, S. Y., Heo, J. Y., Gourja, I., Darkaoui, B., Abdelkafi-Koubaa, Z., … Oukkache, N. (2021). Anti-cancer effect of Moroccan cobra Naja haje venom and its fractions against hepatocellular carcinoma in 3D cell culture. *Toxins (Basel)*, 13 (6): 402. doi: 10.3390/toxins13060402. (101)

129. Latinović, Z., Leonardi, A., Koh, C. Y., Kini, R. M., Trampuš Bakija, A., Pungerčar, J., … Križaj, I. (2020). The procoagulant snake venom serine protease potentially having a dual, blood coagulation factor V and X-activating activity. *Toxins (Basel)*, 12 (6): 358. doi: 10.3390/toxins12060358. (102)

130. Latinovic, Z., Leonardi, A., Petan, T., Zlajpah, M., & Krizaj, I. (2017). Disintegrins from the venom of Vipera ammodytes ammodytes efficiently inhibit migration of breast cancer cells. *Acta Chim Slov*, 64 (30), 555-559. doi: 10.17344/acsi.2016.2924. (103)

131. Lazarovici, P., Marcinkiewicz, C., & Lelkes, P. I. (2019). From snake venom's disintegrins and C-type lectins to anti-platelet drugs. *Toxins (Basel)*, 11 (5): 303. doi: 10.3390/toxins11050303. (104)

132. Le Geyt, J., Pach, S., Gutiérrez, J. M., Habib, A. G., Maduwage, K. P., Hardcastle, T. C., … Halbert, J. (2021). Paediatric snakebite envenoming: recognition and management of cases. *Arch Dis Child*, 106 (1), 14-19. doi: 10.1136/archdischild-2020-319428. (105)

133. Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441 (2), 523-540. doi: 10.1042/BJ20111451. (106)

134. Lee, S., Cho, S. R., Jeong, I., Park, J. B., Shin, M. Y., Kim, S., … Kim, J. H. (2020). Mercury exposure and associations with hyperlipidemia and elevated

liver enzymes: A nationwide cross-sectional survey. *Toxics*, 8 (3): 47. doi: 10.3390/toxics8030047. (107)

135. Leonardi, A., Sajevic, T., Pungerčar, J., & Križaj, I. (2019). Comprehensive study of the proteome and transcriptome of the venom of the most venomous european viper: Discovery of a new subclass of ancestral snake venom metalloproteinase precursor-derived proteins. *J Proteome Res*, 18 (5), 2287-2309. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00120. (108)

136. Li, H. S., Zhou, Y. N., Li, L., Li, S. F., Long, D., Chen, X. L., … Li, Y. P. (2019). HIF-1α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biol*, 25: 101109. doi: 10.1016/j.redox.2019.101109. (109)

137. Li, S., Tan, H. Y., Wang, N., Zhang, Z. J., Lao, L., Wong, C. W., … Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*, 16 (11), 26087-26124. doi: 10.3390/ijms161125942. (110)

138. Li, W., Jiang, L., Lu, X., Liu, X., & Ling, M. (2021). Curcumin protects radiation-induced liver damage in rats through the NF-κB signaling pathway. *BMC Complement Med Ther*, 21 (1): 10. doi: 10.1186/s12906-020-03182-1. (111)

139. Liu, L., Yu, M., Zhang, Y. & Wang, C. (2014). Hydrazide functionalized core–shell magnetic nanocomposites for highly specific enrichment of N-glycopeptides. *ACS Appl. Mater. Interfaces*., 6(3), pp. 7823-7832.

140. Liu, T., Qian, W., Strittmatter E. & Camp D. (2004). High-throughput comparative proteome analysis using a quantitative cysteinyl-peptide enrichment technology. *Anal. Chem.*, 76(4), pp. 5345-5353.

141. Liu, Y., Xue, N., Zhang, B., Lv, H., & Li, S. (2022). Cold stress induced liver injury of mice through activated NLRP3/Caspase-1/GSDMD pyroptosis signaling pathway. *Biomolecules*, 12 (7): 927. doi: 10.3390/biom12070927. (112)

142. Long, C., Liu, M., Tian, H., Li, Y., Wu, F., Mwangi, J., … Shen, C. (2020). Potential role of platelet-activating C-type lectin-like proteins in viper envenomation induced thrombotic microangiopathy symptom. *Toxins (Basel)*, 12 (12): 749. doi: 10.3390/toxins12120749. (113)

143. López-Dávila, A. J., Weber, N., Kraft, T., Matinmehr, F., Arias-Hidalgo, M., Fernández, J., … Gutiérrez J. M. (2021). Cytotoxicity of snake venom Lys49 $PLA_2$-like myotoxin on rat cardiomyocytes ex vivo does not involve a direct action on the contractile apparatus. *Sci Rep*, 11 (1): 19452. doi: 10.1038/s41598-021-98594-5. (114)

144. Louvet, A., & Mathurin, P. (2015). Alcoholic liver disease: mechanisms of injury and targeted treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12 (4), 231-242. doi: 10.1038/nrgastro.2015.35. (115)

145. Makarova, Y. V., Kryukova, E. V., Shelukhina, I. V., Lebedev, D. S., Andreeva, T. V., Ryazantsev, D. Y., … Utkin, Y. N. (2018). The First recombinant viper three-finger toxins: Inhibition of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Dokl Biochem Biophys*, 479 (1): 127-130. doi: 10.1134/S1607672918020205. (116)

146. Malina, T., Krecsák, L., Westerström, A., Szemán-Nagy, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., … Vasas, G. (2017). Individual variability of venom from the European adder (Vipera berus berus) from one locality in Eastern Hungary. *Toxicon*, 135, 59-70. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.06.004. (117)

147. Malleswari, M., Josthna, P. & Doss, P. (2015**).** Orally Administered Venom of Naja Naja Alters Protein Metabolic Profiles in the Liver of Albino Rats. *Int. J. Life Sciences Biotech. Pharma. Research*, 4(1), 10-16. doi: 10.69605/ijlbpr.2015.4. (13)

148. Mamede, C. C. N., de Sousa Simamoto, B. B., da Cunha Pereira, D. F., de Oliveira Costa, J., Ribeiro, M. S. M., & de Oliveira, F. (2020). Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon*, 187, 10-18. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.08.016. (118)

149. Marinho, A. D., Silveira, J. A. M., Chaves Filho, A. J. M., Jorge, A. R. C., Nogueira Júnior, F. A., Pereira, V. B. M., … Monteiro, H. S. A. (2021). Bothrops pauloensis snake venom-derived Asp-49 and Lys-49 phospholipases $A_2$ mediates acute kidney injury by oxidative stress and release of inflammatory cytokines. *Toxicon*, 190, 31-38. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.12.004. (118)

150. Martinez, P. A., Gutiérrez, J. M., Olalla-Tárraga, M. Á., & Amado, T. F. (2022). Venomous animals in a changing world. *Glob Chang Biol*, 28 (12), 3750-3753. doi: 10.1111/gcb.16175. (119)

151. Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., … Persico, M. (2018). Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2018: 9547613. doi: 10.1155/2018/9547613. (120)

152. McAdam, E., Brem, R., & Karran, P. (2016). Oxidative stress-induced-protein damage inhibits DNA repair and determines mutation risk and therapeutic efficacy. *Mol Cancer Res*, 14 (7), 612-622. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0053. (121)

153. Megale, Â. A. A., Magnoli, F. C., Kuniyoshi, A. K., Iwai, L. K., Tambourgi, D. V., Portaro, F. C. V., … da Silva, W. D. (2018). Kn-Ba: a novel serine protease isolated from Bitis arietans snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 24: 38. doi: 10.1186/s40409-018-0176-5. (122)

154. Minghui, R., Malecela, M. N., Cooke, E., & Abela-Ridder, B. (2019). WHO's snakebite envenoming strategy for prevention and control. *Lancet Glob Health*, 7 (7): 837-838. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30225-6. (123)

155. Moatamed, E. R., Hussein, A. A., El-Desoky, M. M., & Khayat, Z. E. (2019). Comparative study of zinc oxide nanoparticles and its bulk form on liver function of Wistar rat. *Toxicol Ind Health*, 35 (10), 627-637. doi: 10.1177/0748233719878970. (124)

156. Mohi-Ud-Din, R., Mir, R. H., Sawhney, G., Dar, M. A., & Bhat, Z. A. (2019). Possible pathways of hepatotoxicity caused by chemical agents. *Curr Drug Metab*, 20 (11), 867-879. doi: 10.2174/1389200220666191105121653. (125)

157. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 3085756. doi: 10.1155/2019/3085756. (126)

158. Moura-da-Silva, A. M., Almeida, M. T., Portes-Junior, J. A., Nicolau, C. A., Gomes-Neto, F., & Valente, R. H. (2016). Processing of snake venom metalloproteinases: generation of toxin diversity and enzyme inactivation. *Toxins (Basel)*, 8 (6): 183. doi: 10.3390/toxins8060183. (127)

159. Mukhopadhyay, P., Horváth, B., Zsengellér, Z., Bátkai, S., Cao, Z., Kechrid, M., … Pacher, P. (2012). Mitochondrial reactive oxygen species generation triggers inflammatory response and tissue injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: therapeutic potential of mitochondrially targeted antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 53 (5), 1123-1138. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.036. (128)

160. Munavar, A., Ali, S. A., Akrem, A., & Betzel, C. (2018). Snake venom peptides: tools of biodiscovery. *Toxins (Basel)*, 10 (11): 474. doi: 10.3390/toxins10110474. (129)

161. Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Tetiana Halenova, Aleksandr Mudrak, Inna Slyeptsova… & Savchuk Olexiy (2022). Influence of Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii venom on protein-peptide profile in the liver, kidneys and small intestine of rats. *Current Topics in Peptide & Protein Research,* 23, 63-72. https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85150524412&origin=inward&txGid=8afab279052d5ea4c982f449fc4370a5

162. Natarajan, S. K., & Becker, D. F. (2012). Role of apoptosis-inducing factor, proline dehydrogenase, and NADPH oxidase in apoptosis and oxidative stress. *Cell Health Cytoskelet*, 2012 (4), 11-27. doi: 10.2147/CHC.S4955. (130)

163. Neue, K., Mormann, M., Peter-Katalinic, J. & Pohlentz, G. (2011). Elucidation of glycoprotein structures by unspecific proteolysis and direct nanoESI mass spectrometric analysis of ZIC-HILIC-enriched glycopeptides. *J. Proteome Res.*, 10(2), pp. 2248-2260.

164. Nguyen, V., Huang, J., Doan, V., Lin, X., Tang, X., Huang, Y., … Huang, R. (2015). Hepatoprotective effects of Yulangsan polysaccharide against nimesulide-induced liver injury in mice. *J Ethnopharmacol*, 172, 273-280. doi: 10.1016/j.jep.2015.06.048. (131)

165. Nielsen, V. G., Frank, N., & Afshar, S. (2019). De novo assessment and review of Pan-American pit viper anticoagulant and procoagulant venom activities via kinetomic analyses. *Toxins (Basel)*, 11 (2): 94. doi: 10.3390/toxins11020094. (132)

166. Nirthanan, S. (2020). Snake three-finger α-neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptors: molecules, mechanisms and medicine. *Biochem Pharmacol*, 181: 114168. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114168. (133)

167. Nykolaychyk, B.B., Moyn V.M. & Kyrkovskyy V.V. (1991). Laboratory Case, 10, pp. 13-18

168. Ojeda, P. G., Ramirez, D., Alzate-Morales, J., Caballero, J., Kaas, Q., & Gonzalez, W. (2017). Computational studies of snake venom toxins. *Toxins (Basel)*, 10 (1): 8. doi: 10.3390/toxins10010008. (134)

169. Olaoba, O. T., Karina Dos Santos, P., Selisstre-de-Araujo, H. S., & Ferreira de Souza, D. H. (2020). Snake venom metalloproteinases (SVMPs): a structure-function update. *Toxicon X*, 7: 100052. doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100052. (135)

170. Paik, Y. H., Kim, J., Aoyama, T., De Minicis, S., Bataller, R., & Brenner, D. A. (2014). Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, 20 (17), 2854-2872. doi: 10.1089/ars.2013.5619. (136)

171. Paloschi, M. V., Pontes, A. S., Soares, A. M., & Zuliani, J. P. (2018). An update on potential molecular mechanisms underlying the actions of snake venom L-amino acid oxidases (LAAOs). *Curr Med Chem*, 25 (21), 2520-2530. doi: 10.2174/0929867324666171109114125. (137)

172. Panyim S., & Chalkley R. (1969). High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys,* 130, 1, P. 337–346

173. Paolino, G., Di Nicola, M. R., Pontara, A., Didona, D., Moliterni, E., Mercuri, S. R., … Pampena, R. (2020). Vipera snakebite in Europe: a systematic review of a neglected disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 34 (10), 2247-2260. doi: 10.1111/jdv.16722. (138)

174. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2014). Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20 (39), 14205-14218. doi: 10.3748/wjg.v20.i39.14205. (139)

175. Peterfi, O., Boda, F., Szabo, Z., Ferencz, E., & Baba, L. (2019). Hypotensive snake venom components – a mini-review. *Molecules*, 24 (15): 2778. doi: 10.3390/molecules24152778. (140)

176. Pieniążek, A., Czepas, J., Piasecka-Zelga, J., Gwoździński, K., & Koceva-Chyła, A. (2013). Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci*, 58 (1), 104-111. doi: 10.2478/v10039-012-0063-1. (141)

177. Pinyachat, A. (2016). Comparative studies of structural and functional properties of snake venom metalloproteinases. *J Med Assoc Thai*, 1, 76-88. (142)

178. Popiolek, I., Hydzik, P., Jagielski, P., Zrodlowska, M., Mystek, K., & Porebski, G. (2021). Risk factors for hepatotoxicity due to paracetamol overdose in adults. *Medicina (Kaunas)*, 57 (8): 752. doi: 10.3390/medicina57080752. (143)

179. Prasanna, P. L., Renu, K., & Valsala Gopalakrishnan, A. (2020). New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci*, 250: 117599. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117599. (144)

180. Preciado, L. M., Pereañez, J. A., & Comer, J. (2019). Potential of matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of local tissue damage induced by a type P-I snake venom metalloproteinase. *Toxins (Basel)*, 12 (1): 8. doi: 10.3390/toxins12010008. (145)

181. Radi, R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (23), 5839-5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115. (146)

182. Ramachandran, A., & Jaeschke, H. (2019). Acetaminophen hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*, 39 (2), 221-234. doi: 10.1055/s-0039-1679919. (147)

183. Razok, A., Shams, A., & Yousaf, Z. (2020). Cerastes cerastes snakebite complicated by coagulopathy and cardiotoxicity with electrocardiographic changes. *Toxicon*, 188, 1-4. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.10.003. (148)

184. Reiniers, M. J., van Golen, R. F., van Gulik, T. M., & Heger, M. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. *Antioxid Redox Signal*, 21 (7), 1119-1142. doi: 10.1089/ars.2013.5486. (149)

185. Renu, K., Chakraborty, R., Myakala, H., Koti, R., Famurewa, A. C., Madhyastha, H., … Valsala Gopalakrishnan, A. (2021). Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) – induced hepatotoxicity – A review. *Chemosphere*, 271: 129735. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021. (150)

186. Robbins V., & Summaria L. (1976). Plasminogen and plasmin. *Methods in Enzymology*, 45, P. 257 – 273

187. Roeb, E. (2018). Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biology*, 68(4), pp.463-473.

188. Roldán-Padrón, O., Castro-Guillén, J. L., García-Arredondo, J. A., Cruz-Pérez, M. S., Díaz-Peña, L. F., Saldaña, C., … García-Gasca, T. (2019). Snake venom hemotoxic enzymes: biochemical comparison between Crotalus species from Central Mexico. *Molecules*, 24 (8): 1489. doi: 10.3390/molecules24081489. (151)

189. Rucavado, A., Escalante, T., Camacho, E., Gutiérrez, J. M., & Fox, J. W. (2018). Systemic vascular leakage induced in mice by Russell's viper venom from Pakistan. *Sci Rep*, 8 (1): 16088. doi: 10.1038/s41598-018-34363-1. (152)

190. Samarghandian, S., Afshari, R., & Farkhondeh, T. (2014). Effect of long-term treatment of morphine on enzymes, oxidative stress indices and antioxidant status in male rat liver. *Int J Clin Exp Med*, 7 (5), 1449-1453. (153)

191. Sanchez, E. F., Flores-Ortiz, R. J., Alvarenga, V. G., & Eble, J. A. (2017). Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. *Toxins (Basel)*, 9 (12): 392. doi: 10.3390/toxins9120392. (154)

192. Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. Curr Med Chem. 2012;19(28):4850-60. doi: 10.2174/092986712803341520. (155)

193. Sanhajariya, S., Duffull, S. B., & Isbister, G. K. (2018). Pharmacokinetics of snake venom. *Toxins (Basel)*, 10 (2): 73. doi: 10.3390/toxins10020073. (156)

194. Santos-Filho, N. A., & Santos, C. T. (2017). Alpha-type phospholipase $A_2$ inhibitors from snake blood. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23: 19. doi: 10.1186/s40409-017-0110-2. (157)

195. Sartim, M. A., Cezarette, G. N., Jacob-Ferreira, A. L., Frantz, F. G., Faccioli, L. H., & Sampaio, S. V. (2017). Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. *Int J Biol Macromol*, 103, 1077-1086. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.146. (158)

196. Schaur, R. J., Siems, W., Bresgen, N., & Eckl, P. M. (2015). 4-hydroxy-nonenal – A bioactive lipid peroxidation product. *Biomolecules*, 5 (4), 2247-2337. doi: 10.3390/biom5042247. (159)

197. Schendel, V., Rash, L. D., Jenner, R. A., & Undheim, E. A. B. (2019). The diversity of venom: The importance of behavior and venom system morphology in understanding its ecology and evolution. *Toxins (Basel)*, 11 (11): 666. doi: 10.3390/toxins11110666. (160)

198. Sciani, J. M., & Pimenta, D. C. (2017). The modular nature of bradykinin-potentiating peptides isolated from snake venoms. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23: 45. doi: 10.1186/s40409-017-0134-7. (161)

199. Serrano, S. M. T., Zelanis, A., Kitano, E. S., & Tashima, A. K. (2018). Analysis of the snake venom peptidome. *Methods Mol Biol*, 1719, 349-358. doi: 10.1007/978-1-4939-7537-2_23. (162)

200. Shamberg, L., & Vaziri, H. (2018). Hepatotoxicity of inflammatory bowel disease medications. *J Clin Gastroenterol*, 52 (8), 674-684. doi: 10.1097/MCG.0000000000001084. (163)

201. Shan, S., Shen, Z., & Song, F. (2018). Autophagy and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol*, 92 (7), 2153-2161. doi: 10.1007/s00204-018-2237-5. (164)

202. Shin, S. K., Cho, H. W., Song, S. E., & Song D. K. (2018). Catalase and nonalcoholic fatty liver disease. *Pflugers Arch*, 470 (12), 1721-1737. doi: 10.1007/s00424-018-2195-z. (165)

203. Shuhendler, A. J., Pu, K., Cui, L., Uetrecht, J. P., & Rao, J. (2014). Real-time imaging of oxidative and nitrosative stress in the liver of live animals for drug-toxicity testing. *Nat Biotechnol*, 32 (4), 373-380. doi: 10.1038/nbt.2838. (166)

204. Sid, B., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2013). Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic Res*, 47 (11), 894-904. doi: 10.3109/10715762.2013.819428. (167)

205. Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4, 180-183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002. (168)

206. Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21 (7), 363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3. (169)

207. Silva, A., Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2017). Antivenom for neuromuscular paralysis resulting from snake envenoming. *Toxins (Basel)*, 19 (4): 143. doi: 10.3390/toxins9040143. (170)

208. Silva, A., Kuruppu, S., Othman, I., Goode, R. J., Hodgson, W. C., & Isbister, G. K. (2017). Neurotoxicity in Sri Lankan Russell's viper (Daboia russelii) envenoming is primarily due to $U_1$-viperitoxin-$Dr_{1a}$, a pre-synaptic neurotoxin. *Neurotox Res*, 31 (1), 11-19. doi: 10.1007/s12640-016-9650-4. (171)

209. Simoes-Silva, R., Alfonso, J., Gomez, A., Holanda, R. J., Sobrinho, J. C., Zaqueo, K. D., … Soares, A. M. (2018). Snake venom, a natural library of new potential therapeutic molecules: challenges and current perspectives. *Curr Pharm Biotechnol*, 19 (4), 308-335. doi: 10.2174/1389201019666180620111025. (172)

210. Sinha, K., Das, J., Pal, P. B., & Sil, P. C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol*, 87 (7), 1157-1180. doi: 10.1007/s00204-013-1034-4. (173)

211. Siqueira-Silva, T., Lima, L., Chaves-Silveira, J., Amado, T., Naipauer, J., Riul, P., … Martinez, P. (2021). Ecological and biogeographic processes drive the proteome evolution of snake venom. *Global Ecology and Biogeography*, 30 (10), 1978– 1989. (174)

212. Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R. A., & Casewell, N. R. (2017). Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *Br J Haematol*, 177 (6), 947-959. doi: 10.1111/bjh.14591. (175)

213. Soares, T. G., Santos, J. L. D., Alvarenga, V. G., Santos, J. S. C., Leclercq, S. Y., Faria, C. D., … Borges, M. H. (2020). Biochemical and functional properties of a new l-amino acid oxidase (LAAO) from Micrurus lemniscatus snake venom. *Int J Biol Macromol*, 154, 1517-1527. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.033. (176)

214. Sounni N. E. (2011). MT-MMPs as regulators of vessel stability associated with angiogenesis. *Frontiers in Pharmacology, 2, article 111*

215. Spickett, C. M., & Pitt, A. R. (2020). Modification of proteins by reactive lipid oxidation products and biochemical effects of lipoxidation. *Essays Biochem*, 64 (1), 19-31. doi: 10.1042/EBC20190058. (177)

216. Spolaore, B., Fernández, J., Lomonte, B., Massimino, M. L., & Tonello, F. (2019). Enzymatic labelling of snake venom phospholipase $A_2$ toxins. *Toxicon*, 170, 99-107. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.09.019. (178)

217. Stine, J. G., & Chalasani, N. (2015). Chronic liver injury induced by drugs: a systematic review. *Liver Int*, 35 (11), 2343-2353. doi: 10.1111/liv.12958. (179)

218. Stransky, S., Costal-Oliveira, F., Lopes-de-Souza, L., Guerra-Duarte, C., Chávez-Olórtegui, C., & Braga, V. M. M. (2018). In vitro assessment of

cytotoxic activities of Lachesis muta muta snake venom. *PLoS Negl Trop Dis*, 12 (4): e0006427. doi: 10.1371/journal.pntd.0006427. (180)

219. Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., … Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 5080843. doi: 10.1155/2019/5080843. (181)

220. Sun, Q. Y., Wang, C. E., Li, Y. N., & Bao, J. (2020). Inhibition of platelet aggregation and blood coagulation by a P-III class metalloproteinase purified from Naja atra venom. *Toxicon*, 187, 223-231. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.09.009. (182)

221. Syama, S., Cherian, R. S., Sreekanth, P. J., & Varma, H. K. (2013). Effect of zinc oxide nanoparticles on cellular oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in mouse liver. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 95 (3), 495-503. doi:10.1080/02772248.2013.789606. (183)

222. Takeda, S., Takeya, H., & Iwanaga, S. (2012). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM / ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1824 (1), 164-176. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.04.009. (184)

223. Tan, K. K., Bay, B. H., & Gopalakrishnakone, P. (2018). L-amino acid oxidase from snake venom and its anticancer potential. *Toxicon*, 144, 7-13. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.01.015. (185)

224. Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)*, 9 (9), 290. doi: 10.3390/toxins9090290. (186)

225. Tejero, J., Shiva, S., & Gladwin, M. T. (2019). Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiol Rev*, 99 (1), 311-379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017. (187)

226. Thakur, R., & Mukherjee, A. (2017). Pathophysiological significance and therapeutic applications of snake venom protease inhibitors. *Toxicon*, 131, 37-47. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.03.011. (188)

227. Thingholm, T., Jorgensen, T., Jensen, O. & Larsen, M. (2016). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nat. Protoc*., 9(2), pp. 1929-1935.

228. Todorović Vukotić, N., Đorđević, J., Pejić, S., Đorđević, N., & Pajović, S. B. (2021). Antidepressants- and antipsychotics-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol*, 95 (3), 767-789. doi: 10.1007/s00204-020-02963-4. (189)

229. Tohamy, A. A., Mohamed, A. F., Abdel Moneim, A. E., & Diab, M. S. M. (2014). Biological effects of Naja haje crude venom on the hepatic and renal tissues of mice. *J King Saud Univ Sci*, 26 (3), 205-212. (190)

230. Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem*, 524, 13-30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021. (191)

231. Tudek, B., Zdżalik-Bielecka, D., Tudek, A., Kosicki, K., Fabisiewicz, A., & Speina, E. (2017). Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes. *Free Radic Biol Med*, 107, 77-89. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.043. (192)

232. Turbal , L. V. (2024). Peculiarities of microscopic and histochemical changes in the structure of the liver of experimental rats under the influence of viper venom Vipera berus nikolskii. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 28(2), 204-209. https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28(2)-04

233. Turbal, L. V., Yaremenko, L. M., & Maievskyi, O. Y. (2023). Histological changes in the liver of rats under the influence of Vipera berus berus venom. *Reports of Morphology*, 29(4), 58-63. https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(4)-08

234. Turbal, L.V. (2025). Ultrastructural changes in the liver of rats under the action of vipera berus berus venom. *«Перспективи та інновації науки» (Серія «Медицина»)*, 1(47), 2006-2017. https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-1(47)-2006-2017

235. Ullah, A. (2020). Structure-function studies and mechanism of action of snake venom L-amino acid oxidases. *Front Pharmacol*, 11: 110. doi: 10.3389/fphar.2020.00110. (193)

236. Ullah, A., Masood, R., Ali, I., Ullah, K., Ali, H., Akbar, H., … Betzel, C. (2018). Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. *Int J Biol Macromol*, 114, 788-811. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.164. (194)

237. Ursini, F., & Maiorino, M. (2020). Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*, 152, 175-185. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027. (195)

238. Uzair, B., Khan, B. A., Sharif, N., Shabbir, F., & Menaa, F. (2018). Phosphodiesterases (PDEs) from snake venoms: Therapeutic applications. *Protein Pept Lett*, 25 (7), 612-618. doi: 10.2174/0929866525666180628160616. (196)

239. Variawa, S., Buitendag, J., Marais, R., Wood, D., & Oosthuizen, G. (2021). Prospective review of cytotoxic snakebite envenomation in a paediatric population. *Toxicon*, 190, 73-78. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.12.009. (197)

240. Vassilev V. (2005). Response of Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their geneand phase-specific differential control in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab, 90, P. 5848–5857*.

241. *Visse R. & Nagase H (2003).* Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases:Structure, Function, and Biochemistry. *Circulation Research, 92, P.827–839*

242. Wada, Y., Tajiri, M. & Yoshidas, S. (2004). Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics. *Anal. Chem*., 76(5), pp. 6560-6565.

243. Waheed, H., Moin, S. F., & Choudhary, M. I. (2017). Snake venom: From deadly toxins to life-saving therapeutics. *Curr Med Chem*, 24 (17), 1874-1891. doi: 10.2174/0929867324666170605091546. (198)

244. Waiddyanatha, S., Silva, A., Siribaddana, S., & Isbister, G.K. (2019). Long-term effects of snake envenoming. *Toxins (Basel)*, 1 (4): 193. doi: 10.3390/toxins11040193. (199)

245. Wang, B,, Van Veldhoven, P. P., Brees, C., Rubio, N., Nordgren, M., Apanasets, O., … Fransen, M. (2013). Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 65, 882-894. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.173. (200)

246. Wang, C. H., Wu, S. B., Wu, Y. T., & Wei, Y. H. (2013). Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238 (5), 450-460. doi: 10.1177/1535370213493069. (201)

247. Wang, S. Z., & Qin, Z. H. (2018). Anti-Inflammatory and immune regulatory actions of Naja naja atra venom. *Toxins (Basel)*, 10 (3): 100. doi: 10.3390/toxins10030100. (202)

248. Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*, 217 (6), 1915-1928. doi: 10.1083/jcb.201708007. (203)

249. White, J. (2005). Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, 45(8), 951-967 (11).

250. Williams, H. F., Layfield, H. J., Vallance, T., Patel, K., Bicknell, A. B., Trim, S. A., … Vaiyapuri, S. (2019). The urgent need to develop novel strategies for the diagnosis and treatment of snakebites. *Toxins (Basel)*, 11 (6): 363. doi: 10.3390/toxins11060363. (205)

251. Williams, H. F., Mellows, B. A., Mitchell, R., Sfyri, P., Layfield, H. J., Salamah, M., … Vaiyapuri, S. (2019). Mechanisms underpinning the permanent muscle damage induced by snake venom metalloprotease. *PLoS Negl Dis*, 13 (1): e0007041. doi: 10.1371/journal.pntd.0007041. (204)

252. Wiman B., & Wallen P. (1973). Activation of human plasminogen by an insoluble derivative of urokinase. Structural changes of plasminogen in the course

of activation to plasmin and demonstration of a possible intermediate compound. *Eur. J. Biochem,* 36, 1, P. 25-31

253. Wong, K. Y., Tan, K. Y., Tan, N. H., & Tan, C. H. (2021). A neurotoxic snake venom without phospholipase $A_2$: Proteomics and cross-neutralization of the venom from Senegalese Cobra, Naja senegalensis (Subgenus: Uraeus). *Toxins (Basel)*, 13 (1): 60. doi: 10.3390/toxins13010060. (206)

254. Xiao, H., Li, H., Zhang, D., Li, Y., Sun, S., & Huang, C. (2018). Inactivation of venom $PLA_2$ alleviates myonecrosis and facilitates muscle regeneration in envenomed mice: A time course observation. *Molecules*, 23 (8): 1911. doi: 10.3390/molecules23081911. (207)

255. Xiao, H., Pan, H., Liao, K., Yang, M., & Huang, C. (2017). Snake venom $PLA_2$, a promising target for broad-spectrum antivenom drug development. *Biomed Res Int*, 2017: 6592820. doi: 10.1155/2017/6592820. (208)

256. Xu, Y., Cao, Q., Svec, F. & Fréchet, J. (2010). Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine-containing peptides. *Anal. Chem*., 82(6), pp. 3352-3358.

257. Xue M. (2007). Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C Relevance to Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatism, 56, 9, P. 2864–2874*

258. Yakovlev, M.Y. (2003). Elements of the Endotoxin Theory of Human Physiology and Pathology. *Human Physiology,* 29, 476–486. https://doi.org/10.1023/A:1024989709554 (21)

259. Yee, K. T., Tongsima, S., Vasieva, O., Ngamphiw, C., Wilantho, A., Wilkinson, M. C., … Rojnuckarin P. (2018). Analysis of snake venom metalloproteinases from Myanmar Russell's viper transcriptome. *Toxicon*, 146, 31-41. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.03.005. (209)

260. Yildirim, N.C., & Yurekli, M. (2010). Investigation of some antioxidant enzymes activities depending on adrenomedullin treatment and cold stress in rat liver tissue. *Turk J Biochem*, 35, 138–142. (210)

261. Yu, L., Li, X., Guo, Z. & Zhang, X. (2009). Hydrophilic interaction chromatography based enrichment of glycopeptides by using Click maltose: a matrix with high selectivity and glycosylation heterogeneity coverage. *Chem. Eur. J.*, 15(4), pp. 12618-12626.

262. Zambelli, V. O., Picolo, G., Fernandes, C. A. H., Fontes, M. R. M., & Cury, Y. (2017). Secreted phospholipases $A_2$ from animal venoms in pain and analgesia. *Toxins (Basel)*, 9 (12): 406. doi: 10.3390/toxins9120406. (211)

263. Zanetti, G., Duregotti, E., Locatelli, C. A., Giampreti, A., Lonati, D., Rossetto, O., … Pirazzini, M. (2018). Variability in venom composition of European viper subspecies limits the cross-effectiveness of antivenoms. *Sci Rep*, 8 (1): 9818. doi: 10.1038/s41598-018-28135-0. (212)

264. Zhang, L., Zhao, Q., Liang, Z. & Yang, K. (2012). Synthesis of adenosine functionalized metal immobilized magnetic nanoparticles for highly selective and sensitive enrichment of phosphopeptides. *Chem. Commun*., 48(3), pp. 6274-6276.

265. Zhang, M., Serna-Salas, S., Damba, T., Borghesan, M., Demaria, M., & Moshage, H. (2021). Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. *Mech Ageing Dev*, 199: 111572. doi: 10.1016/j.mad.2021.111572. (213)

266. Zhang, P., Li, T., Wu, X., Nice, E. C., Huang, C., & Zhang, Y. (2020). Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med*, 14 (5), 583-600. doi: 10.1007/s11684-019-0729-1. (214)

267. Zhang, Y. (2015). Why do we study animal toxins? *Dongwuxue Yanjiu*, 36 (4), 183-222. doi: 10.13918/j.issn.2095-8137.2015.4.183. (215)

268. Zhu, H., Jia, Z., Misra, H., & Li, Y. R. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. *J Dig Dis*, 13 (3), 133-142. doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00569.x. (216)

269. Zhu, W., Zhang, X., Yu, M., Lin, B., & Yu, C. (2021). Radiation-induced liver injury and hepatocyte senescence. *Cell Death Discov*, 7 (1): 244. doi: 10.1038/s41420-021-00634-6. (217)

270. Zinenko, O., Tovstukha, I., & Korniyenko, Y. (2020). $PLA_2$ Inhibitor Varespladib as an Alternative to the Antivenom Treatment for Bites from Nikolsky's Viper Vipera berus nikolskii. *Toxins (Basel)*, 12 (6): 356. doi: 10.3390/toxins12060356. (218)

271. Zuliani, J. P., Soares, A. M., & Gutiérrez, J. M. (2020). Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. *Toxicon*, 187, 188-197. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.09.006. (219)

# ДОДАТКИ

Додаток А

## НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Tetiana Halenova, Aleksandr Mudrak, Inna Slyeptsova… & Savchuk Olexiy (2022). Influence of Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii venom on protein-peptide profile in the liver, kidneys and small intestine of rats. *Current Topics in Peptide & Protein Research,* 23, 63-72. https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85150524412&origin=inward&txGid=8afab279052d5ea4c982f449fc4370a5 (Міжнародне фахове видання, Індія. Видання включено до міжнародної наукометричної бази Scopus).

Nataliia Raksha – концептуалізація огляду;

Tetiana Vovk – написання та редагування огляду;

Tetiana Halenova – адміністрування проекту;

Aleksandr Mudrak – програмне забезпечення, ресурси;

Inna Slyeptsova – методологія;

Halyna Mudrak – програмне забезпечення, ресурси;

Liudmyla Turbal – дослідження та написання оригінального проекту;

Lilia Yaremenko – редагування огляду;

Yanchyshyn Andrii – програмне забезпечення;

Maievskyi Oleksandr – концептуалізація.

Savchuk Olexiy – формальний аналіз і валідація.

2. Turbal, L. V., Yaremenko, L. M., & Maievskyi, O. Y. (2023). Histological changes in the liver of rats under the influence of Vipera berus berus venom. *Reports of Morphology*, 29(4), 58-63. https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(4)-08 (Фахове видання України. Видання включено до міжнародної наукометричної бази Scopus)

Yaremenko, L. M. – концептуалізація, написання та редагування огляду;

Turbal, L. V. – дослідження, методологія та написання оригінального проекту, формальний аналіз і валідація;

Maievskyi, O. Y. – написання та редагування огляду;

3. Turbal , L. V. (2024). Peculiarities of microscopic and histochemical changes in the structure of the liver of experimental rats under the influence of viper venom Vipera berus nikolskii. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 28(2), 204-209. https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28(2)-04 (Фахове видання України)

4. Turbal, L.V. (2025). Ultrastructural changes in the liver of rats under the action of vipera berus berus venom. *«Перспективи та інновації науки» (Серія «Медицина»)*, 1(47), 2006-2017. https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-1(47)-2006-2017 (Фахове видання України)

## НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

5. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2023). *Вплив отрути змій виду Vipera berus на морфофункціональні зміни печінки*. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «МОРФОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ» (ІІІ ЖУТАЄВСЬКІ ЧИТАННЯ", Полтава, 20–21 квітня 2023 року – Полтава – С. 80–81.

6. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2023). *Біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути гадюк виду Vipera berus*. Збірник наукових праць: XIX Наукова - конференція "Львівські хімічні читання – 2023", Львів, 29–31 травня 2023 року – Львів: Видавництво від А до Я, 2023. – 254 с. (стор. 183). Львів.

7. Турбал Л.В., Маєвський Є.О., Яременко Л.М. & Коновалова Л.В. (2023). *Вплив отрути гадюки звичайної на мікроскопічний стан печінки лабораторних тварин в експерименті.* Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій пам'яті члена-

кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю.Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці», Київ, 8-9 червня, 2023 року – Київ. – С. 143–144.

8. Турбал Л.В. (2024). *Вплив отрути гадюки Нікольського на мікроскопічний стан печінки щурів.* Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «МОРФОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЯ» (IV ЖУТАЄВСЬКІ ЧИТАННЯ", Полтава, 18–19 квітня 2024 року – Полтава – С. 93–95.

9. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2024). *Гістологічні дослідження структурних компонентів печінки щурів при дії отрути гадюк виду Vipera berus.* Збірник тез науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» до 70-річного ювілею професора кафедри гістології, цитології та ембріології, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Олександра Дмитровича ЛУЦИКА, Львів, 10 травня 2024 року – Львів: – С. 144–146.

10. Турбал Л.В., Маєвський Є.О., Яременко Л.М. & Коновалова Л.В. (2024). *Вплив отрути гадюк виду Vipera berus на морфологічні зміни печінки щурів.* Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання морфології», присвяченої 100-річчю від дня народження Лева Михайловича ЛИЧКОВСЬКОГО, Львів, 17 травня, 2024 року – Львів. – С. 221–222.

11. Турбал Л.В., Маєвський Є.О. & Яременко Л.М. (2024). *Гістохімічні дослідження структурних компонентів печінки лабораторних тварин при дії отрути гадюки Нікольського*. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій 100 – річчю професора К.С. Кабака «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці»», Київ, 13-14 червня, 2024 року – Київ. – С.77.

**Апробація результатів дисертації:**

- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю присвяченій пам’яті члена-кореспондента НАМН України, д.мед.н., професора Ю.Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці» (м. Київ, 2023) – стендова доповідь.
- Науково-практична конференція з міжнародною участю «Досягнення та перспективи лектиноморфології» до 70-річного ювілею професора кафедри гістології, цитології та ембріології, Лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки Олександра Дмитровича ЛУЦИКА (м. Львів, 2024) – стендова доповідь.
- Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю присвяченій 100 – річчю професора К.С. Кабака «Тканинні реакції в нормі, експерименті, клініці» (м. Київ, 2024) – стендова доповідь.

Додаток Б1

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
_____доц. Ірина СОЛОНИНКО
_____2025 року

# АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**Назва роботи:** "Морфологічні та біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus".

**1. Автор:** Турбал Людмила Володимирівна, асистент кафедри описової та клінічної анатомії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України.

**2. Пропозиція до впровадження:** Вперше встановлено, що за умов впливу отрути гадюки степової мікроскопічно спостерігаються альтеративні зміни паренхіми печінки та судинні розлади. Встановлено появу осередків лейкоцитарної інфільтрації, що вказує на розвиток запальних процесів, виявляються в складі часточок багато двоядерних гепатоцитів, як пристосувально-компенсаторна реакція органу, також відзначаються нерівномірно та локально різко розширені синусоїдні гемокапіляри із сладж-ефектом еритроцитів. За умов впливу отрути гадюки Нікольського встановлено більш значні деструктивні зміни структурних елементів печінки і ланок судинного русла, що підтверджується зокрема достовірною динамікою змін морфометричних показників. Відзначається розширення і кровонаповнення судин, формування тромбів, крововиливи, деструкція стінки гемокапілярів. Активація макрофагів поєднується з лейкоцитарною інфільтрацією переважно ділянок тріад та локально в перипортальних ділянках печінкових часточок. Порушення часточково-балкової будови органу супроводжується гідропічною дистрофією гепатоцитів, а також значним зниженням в них вмісту сукценатдегідрогенази та глікогену.

**3. Актуальність дослідження:** Внаслідок значного розповсюдження отруйних тварин людство перебуває з ними в постійному контакті, що часто стає причиною отруєнь, серйозних травм або летальних наслідків. Оскільки одними з найбільш поширених отруйних тварин в світі та на території України є змії і гадюки, слід більш ретельно дослідити основні токсичні сполуки їх отрут, особливості впливу на структуру, функції органів і систем. На сьогоднішній день наявні окремі дослідження щодо біологічної активності тих, чи інших компонентів отрути змій і гадюк, особливостей тропності їх до певних тканин і органів. Встановлено, що їх токсичні речовини проявляють широкий спектр патологічних ефектів у відношенні більшості життєво важливих систем, зумовлюючи ураження легень, серця, нирок, скелетних м'язів, тощо. Однак наразі надто лімітованою є кількість експериментальних робіт щодо впливу отрути різних видів змій і гадюк на морфо-функціональні зміни печінки. Тому, всебічний аналіз ультрамікроскопічних ознак зрушень печінки за умов впливу пошкоджуючих факторів, в тому числі токсинів отрути змій і гадюк, є актуальною задачею.

**4. Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

**5. Джерела інформації:**

Turbal, L.V. (2025). Ultrastructural changes in the liver of rats under the action of vipera berus berus venom. *«Перспективи та інновації науки» (Серія «Медицина»)*, 1(47), 2006-2017. https://doi.org/10.52058/2786-4952-2025-1(47)-2006-2017

**6. Ким і коли впроваджено:** Кафедра оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

Початок впровадження: січень 2025 р.

Протокол засідання кафедри № 9 від 15 січня 2025 р.

**7. Форма впровадження:** результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

**8. Соціально-економічний ефект:** покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри оперативної хірургії
з топографічною анатомією
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
д.мед.н., професор Зоряна МАСНА

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
проф. Ірина СОЛОНИНКО
10. січня 2025 року

# АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**Назва роботи:** "Морфологічні та біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus".

**1. Автор:** Турбал Людмила Володимирівна, асистент кафедри описової та клінічної анатомії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України.

**2. Пропозиція до впровадження:** Вперше встановлено, що за умов впливу отрути гадюки степової мікроскопічно спостерігаються альтеративні зміни паренхіми печінки та судинні розлади. Встановлено появу осередків лейкоцитарної інфільтрації, що вказує на розвиток запальних процесів, виявляються в складі часточок багато двоядерних гепатоцитів, як пристосувально-компенсаторна реакція органу, також відзначаються нерівномірно та локально різко розширені синусоїдні гемокапіляри із сладж-ефектом еритроцитів. За умов впливу отрути гадюки Нікольського встановлено більш значні деструктивні зміни структурних елементів печінки і ланок судинного русла, що підтверджується зокрема достовірною динамікою змін морфометричних показників. Відзначається розширення і кровонаповнення судин, формування тромбів, крововиливи, деструкція стінки гемокапілярів. Активація макрофагів поєднується з лейкоцитарною інфільтрацією переважно ділянок тріад та локально в перипортальних ділянках печінкових часточок. Порушення часточково-балкової будови органу супроводжується гідропічною дистрофією гепатоцитів, а також значним зниженням в них вмісту сукценатдегідрогенази та глікогену.

**3. Актуальність дослідження:** Внаслідок значного розповсюдження отруйних тварин людство перебуває з ними в постійному контакті, що часто стає причиною отруєнь, серйозних травм або летальних наслідків. Оскільки одними з найбільш поширених отруйних тварин в світі та на території України є змії і гадюки, слід більш ретельно дослідити основні токсичні сполуки їх отрут, особливості впливу на структуру, функції органів і систем. На сьогоднішній день наявні окремі дослідження щодо біологічної активності тих, чи інших компонентів отрути змій і гадюк, особливостей тропності їх до певних тканин і органів. Встановлено, що їх токсичні речовини проявляють широкий спектр патологічних ефектів у відношенні більшості життєво важливих систем, зумовлюючи ураження легень, серця, нирок, скелетних м'язів, тощо. Однак наразі надто лімітованою є кількість експериментальних робіт щодо впливу отрути різних видів змій і гадюк на морфо-функціональні зміни печінки. Тому, всебічний аналіз гістологічних та гістохімічних ознак зрушень печінки за умов впливу пошкоджуючих факторів, в тому числі токсинів отрути змій і гадюк, є актуальною задачею.

**4. Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

**5. Джерела інформації:**

1. Turbal, L. V., Yaremenko, L. M., & Maievskyi, O. Y. (2023). Histological changes in the liver of rats under the influence of Vipera berus berus venom. *Reports of Morphology*, 29(4), 58-63. https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(4)-08

2. Turbal, L. V. (2024). Peculiarities of microscopic and histochemical changes in the structure of the liver of experimental rats under the influence of viper venom Vipera berus nikolskii. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 28(2), 204-209. https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28(2)-04

**6. Ким і коли впроваджено:** Кафедра гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

Початок впровадження: _____ 2025 р.

Протокол засідання кафедри № 1 від 30.01. 2025 р.

**7. Форма впровадження:** результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

**8. Соціально-економічний ефект:** покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
к.мед.н., доцент Ілона ЧЕЛПАНОВА

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор закладу вищої освіти
з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського
Міністерства охорони здоров'я України
д. б. н., проф. _____ Іван КЛІЩ
«___» _____2025 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Пропозиція для впровадження:** матеріали дисертаційної роботи «Морфологічні та біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus». Вперше встановлено, що за умов впливу отрути гадюки степової мікроскопічно спостерігаються альтеративні зміни паренхіми печінки та судинні розлади. Встановлено появу осередків лейкоцитарної інфільтрації, що вказує на розвиток запальних процесів, виявляються в складі часточок багато двоядерних гепатоцитів, як пристосувально-компенсаторна реакція органу, також відзначаються нерівномірно та локально різко розширені синусоїдні гемокапіляри із сладж-ефектом еритроцитів. За умов впливу отрути гадюки Нікольського встановлено більш значні деструктивні зміни структурних елементів печінки і ланок судинного русла, що підтверджується зокрема достовірною динамікою змін морфометричних показників. Відзначається розширення і кровонаповнення судин, формування тромбів, крововиливи, деструкція стінки гемокапілярів. Активація макрофагів поєднується з лейкоцитарною інфільтрацією переважно ділянок тріад та локально в перипортальних ділянках печінкових часточок. Порушення часточково-балкової будови органу супроводжується гідропічною дистрофією гепатоцитів, а також значним зниженням в них вмісту сукценатдегідрогенази та глікогену.

**2. Актуальність дослідження:** Внаслідок значного розповсюдження отруйних тварин людство перебуває з ними в постійному контакті, що часто стає причиною отруєнь, серйозних травм або летальних наслідків. Оскільки одними з найбільш поширених отруйних тварин в світі та на території України є змії і гадюки, слід більш ретельно дослідити основні токсичні сполуки їх отрут, особливості впливу на структуру, функції органів і систем. На сьогоднішній день наявні окремі дослідження щодо біологічної активності тих, чи інших компонентів отрути змій і гадюк, особливостей тропності їх до певних тканин і органів. Встановлено, що їх токсичні речовини проявляють широкий спектр патологічних ефектів у відношенні більшості життєво важливих систем, зумовлюючи ураження легень, серця, нирок, скелетних м'язів, тощо. Однак наразі надто лімітованою є кількість експериментальних робіт щодо впливу отрути різних видів змій і гадюк на морфо-функціональні зміни печінки. Тому, всебічний аналіз гістологічних та

гістохімічних ознак зрушень печінки за умов впливу пошкоджуючих факторів, в тому числі токсинів отрути змій і гадюк, є актуальною задачею.

**3. Установа розробника, автор:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України, асистент кафедри описової та клінічної анатомії Турбал Людмила Володимирівна.

**4. Джерела інформації:**

1. Turbal, L. V., Yaremenko, L. M., & Maievskyi, O. Y. (2023). Histological changes in the liver of rats under the influence of Vipera berus berus venom. Reports of Morphology, 29(4), 58-63. https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(4)-08

2. Turbal, L. V. (2024). Peculiarities of microscopic and histochemical changes in the structure of the liver of experimental rats under the influence of viper venom Vipera berus nikolskii. Reports of Vinnytsia National Medical University, 28(2), 204-209. https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2024-28(2)-04

**5. Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України.

**6. Форма впровадження:** у навчальну роботу кафедри гістології та ембріології, в матеріали лекцій та практичних занять, у науково-дослідну роботу кафедри.

**7. Термін впровадження:** січень-лютий 2025 року.

**8. Зауваження та пропозиції:** немає.

**9.** Протокол засідання кафедри № 1 від 22 січня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:
завідувач кафедри гістології та ембріології
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
доктор біологічних наук, професор Зоя НЕБЕСНА

«Затверджую»
Директор ННЦ
«Інститут біології та медицини»
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка
_____Остапченко Л.І.

# А К Т  В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

**Назва роботи:** "Морфологічні та біохімічні зміни печінки щурів за умов впливу отрути змій виду Vipera berus".

**1. Автор:** Турбал Людмила Володимирівна, асистент кафедри описової та клінічної анатомії Національного медичного університету імені О. О. Богомольця МОЗ України.

**2. Пропозиція до впровадження:** При біохімічному дослідженні зразків крові та гомогенатів печінки щурів при впливі отрути гадюк Vipera berus вперше доведено суттєвий зсув процесів протеолізу в даному органі, з появою нетипових білкових молекул різного ступеня організації, таких як білки, пептиди. Компоненти досліджуваних зміїних отрут мають прямий або опосередкований вплив на компоненти системи протеолізу та можуть призводити до запуску неконтрольованих та фізіологічно нетипових сигнальних шляхів та біохімічних реакцій, в яких ключовими агентами будуть відігравати як патологічне підвищення активності та вмісту окремих компонентів протеолітичної системи даного органу, так і фізіологічно нетипові білкові молекули, що з'являються в даному органі за дії досліджуваних зміїних отрут.

**3. Актуальність дослідження:** Внаслідок значного розповсюдження отруйних тварин людство перебуває з ними в постійному контакті, що часто стає причиною отруєнь, серйозних травм або летальних наслідків. Оскільки одними з найбільш поширених отруйних тварин в світі та на території України є змії і гадюки, слід більш ретельно дослідити основні токсичні сполуки їх отрут, особливості впливу на структуру, функції органів і систем. На сьогоднішній день наявні окремі дослідження щодо біологічної активності тих, чи інших компонентів отрути змій і гадюк, особливостей тропності їх до певних тканин і органів. Встановлено, що їх токсичні речовини проявляють широкий спектр патологічних ефектів у відношенні більшості життєво важливих систем, зумовлюючи ураження легень, серця, нирок, скелетних м'язів, тощо. Однак наразі надто лімітованою є кількість експериментальних робіт щодо впливу отрути різних видів змій і гадюк на морфо-функціональні зміни печінки. Тому, всебічний аналіз біохімічних, зрушень печінки за умов впливу пошкоджуючих факторів, в тому числі токсинів отрути змій і гадюк, є актуальною задачею.

**4. Установа-розробник:** Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України

**5. Джерела інформації:**

Nataliia Raksha, Tetiana Vovk, Tetiana Halenova, Aleksandr Mudrak, Inna Slyeptsova… & Savchuk Olexiy (2022). Influence of Vipera berus berus and Vipera berus nikolskii venom on protein-peptide profile in the liver, kidneys and small intestine of rats. *Current Topics in Peptide & Protein Research,* 23, 63-72. https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85150524412&origin=inward&txGid=8afab279052d5ea4c982f449fc4370a5

**6. Ким і коли впроваджено:** кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Початок впровадження: _____ 2025 р.

Протокол засідання кафедри №___ від _____2025р.

**7. Форма впровадження:** результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

**8. Соціально-економічний ефект:** покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
д.біол.н., професор

Олексій САВЧУК