ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Діденко В.І., Гайдар Ю.А., Кленіна І.А., Галінський О.О., Коненко І.С., Руденко А.І., Грабовська О.І.

УДК:616-003.826+616-002.16/591.436.001.57

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2019.23.5-6.06>

ЖОРСТКІСТЬ ПАРЕНХІМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ СТЕАТОЗУ АЛІМЕНТАРНОГО ГЕНЕЗУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ*

Діденко В.І., Гайдар Ю.А., Кленіна І.А., Галінський О.О., Коненко І.С., Руденко А.І., Грабовська О.І.

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро

Протягом останніх десятиліть спостерігається збільшення частоти захворювань на хронічні дифузні захворювання печінки. Захворювання з характерними змінами з боку печінки, які поєднуються з метаболічним синдромом, інсулінорезистентністю, виявляються в 80% випадків, тому на сьогодні велике значення має своєчасний вияв і відповідне лікування даної патології. Останнім часом зріс інтерес в бік малоінвазивних та неінвазивних методів досліджень патологічних станів печінки. Одним з підходів верифікації стеатозу є метод оцінки контрольованого параметра загасання ультразвуку, методика заснована на властивості ультразвукових сигналів «загасати» в тканинах, що містять жирові краплини. Метою роботи було дослідження ступеню жорсткості паренхіми та морфологічної картини печінки щурів в умовах моделювання аліментарного стеатозу та після корекції препаратами - коензимом Q10 та метадоксином. Дослідження проводили на лабораторних щурах лінії Wistar. Моделювання стеатозу у дослідних тварин проводили шляхом аліментарних порушень раціону харчування. При проведенні морфологічних досліджень виявлено, що у дослідних щурів відмічався розвиток стеатозу з дрібнокраплинною жировою дистрофією, розсіяною по всій площині часток та розширенням синусоїдів, що супроводжувалось зростанням жорсткості паренхіми печінки щурів. У тварин через 30 діб після моделювання стеатозу показники жорсткості паренхіми печінки щурів були менше за показники групи із стеатозом та відмічалось депозитування жиру в цитоплазмі гепатоцитів печінкової частки. Застосування Q10 та метадоксину, в умовах моделювання аліментарного стеатозу печінки щурів, мало позитивний вплив на функціональний стан печінки, що підтверджувалось морфологічними дослідженнями та зсувнохвильовою еластографією.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки, морфологічні дослідження, жорсткість печінки, зсувнохвильова еластографія, стеатоз, коензим Q10, метадоксин.

Over the past decades, there has been an increase in the incidence of chronic diseases of the liver. Diseases with characteristic changes in the liver, which are combined with metabolic syndrome and insulin resistance, are found in 80% of cases. Therefore, the timely manifestation and appropriate treatment of this pathology is very important today. Recently, there has been an increasing interest towards less invasive and non-invasive methods for the study of liver pathologies. One of the approaches to the verification of steatosis is the method of evaluating the controlled parameter of ultrasound suppression, the method is based on the properties of ultrasonic signals "to fade" in the tissues containing fat droplets. The aim of the work was to investigate the degree of parenchyma stiffness and the morphological pattern of the liver of rats in the conditions of the modeling of alimentary steatosis and after its correction with medications - coenzyme Q10 and methadoxine. The studies were performed on laboratory rats of the Wistar line. Simulation of steatosis in experimental animals was performed by alimentary disorders of the diet. In the course of morphological studies, it was found that in experimental rats development of steatosis with small-drop fat dystrophy, scattered throughout the particle plane and sinusoidal enlargement was observed, which was accompanied by increased stiffness of the liver parenchyma of rats. In animals, 30 days after steatosis modeling, rat liver parenchyma stiffness was less than that of the steatosis group and fat deposition in the hepatic cytoplasm of the hepatic lobe was observed. The use of Q10 and methadoxine in the simulation of alimentary steatosis in the liver of rats had a positive effect on the functional state of the liver, which was confirmed by morphological studies and shift wave elastography.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease, morphological investigations, liver stiffness, shift wave elastography, steatosis, coenzyme Q10, methadoxine.

Протягом останніх десятиліть спостерігається збільшення частоти хронічних дифузних захворювань

печінки (неалкогольна жирова хвороба печінки, стеатоз, стеатогепатит, фіброз та ін.) [3, 4, 11, 12, 15]. До-

* Цитування при атестації кадрів: Діденко В.І., Гайдар Ю.А., Кленіна І.А., Галінський О.О., Коненко І.С., Руденко А.І., Грабовська О.І. Жорсткість паренхіми печінки щурів при моделюванні стеатозу аліментарного генезу та його корекції. // Проблеми екології і медицини. – 2019. – Т. 23, № 5-6. – С. 36–41.

слідження довели, що при захворюваннях, що поєднуються з метаболічним синдромом, інсулінорезистентністю, характерні зміни з боку печінки виявляються в 80% випадків [3, 6, 8], тому на сьогодні велике значення має своєчасний вияв і відповідне лікування даної патології.

Останнім часом зріс інтерес в бік малоінвазивних та неінвазивних методів досліджень патологічних станів печінки, прикладом чого є оцінка наявності та ступеня стеатозу за допомогою СтеатоТесту, ФіброТесту. Одним з підходів верифікації стеатозу є метод оцінки контрольованого параметра загасання ультразвуку. Методика заснована на властивості ультразвукових сигналів «загасати» в тканинах, що містять жирові краплини [7].

Підбір адекватної терапії при корекції патологічних станів печінки неможливий без застосування експериментальних досліджень [7, 10, 13]. У сучасній літературі існують поодинокі дані, щодо вивчення жорсткості тканини печінки у тварин, а особливо в умовах моделювання хронічних дифузних захворювань печінки, а саме стеатозу. У роботі авторів [2] описано вікові зміни жорсткості тканини печінки (ЖТП) у білих щурів методом зсувнохвильовою еластографією (ЗХЕ), було показано з віком, зростання ЖТП, виявлено статистично вірогідну різницю між 3- та 20- місячними щурами та підтверджено, що ЗХЕ є новим об'єктивним біофізичним методом отримання інформації про стан ЖТП.

Показники еластичності тканини печінки безпосередньо залежать від багатьох чинників, а саме внутрішньо судинного тиску крові, ступеню гідратації тканини, співвідношення насичених і поліненасичених ліпідів у тканині [1, 9].

Внаслідок зниження швидкості β -окислення вільних жирних кислот, підвищеного синтезу вільних жирних кислот в мітохондріях гепатоцитів, низького синтезу або секреції ліпопротеїнів низької щільності відбувається збільшення ЖТП, що призводить до порушення енергетичних обмінів органу.

Одним з найбільш поширених методів моделювання стеатозу шляхом аліментарних порушень є застосування високовуглеводної дієти, спираючись на той факт, що у сучасному раціоні людини більшу частину займають саме вуглеводи [7, 14]. Тривале застосування фруктози приводить до аліментарних порушень обміну речовин у печінці з подальшим розвитком стеатозу. Можна припустити, що розвиток та прогресування стеатозу може призводити до початкових стадій формування фіброзу та змін ЖТП і її морфологічної деструкції.

Метою роботи було вивчити ступінь жорсткості паренхіми печінки щурів в умовах моделювання аліментарного стеатозу та після корекції препаратами коензимом Q10 та метадоксином.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проводили на лабораторних щурах лінії Wistar масою 238 ± 48 г. З відібраних тварин було сформовано 4 дослідні групи, яким проводили моделювання стеатозу шляхом аліментарних порушень раціону харчування ($n=50$): поєднували 48 годинну харчову депривацію з подальшим напівпримусовим впоюванням 20 %-водним розчином фруктози у яко-

сті єдиного джерела води протягом 20 тижнів. I група: верифікація моделі стеатозу ($n=29$), II група: по завершенню 20-тижневої гіперфруктозної дієти, тварин переводили на стандартний раціон та 30 діб не давали препарати ($n=7$); III група - разом з кормом отримували коензим Q10 виробництва «Фармаком» (Україна) ($1,5$ г/кг/добу) протягом 30 діб ($n=7$); IV група - з раціоном додавали метадоксин у складі препарату «Ліверія ІС» виробництва «Інтерхім» (Україна) ($0,74$ г/кг/добу) протягом 30 діб ($n=7$).

Евтаназія тварин проводилася шляхом введення летальної дози кетаміну гідрохлориду (у дозі 230 / кг). Експерименти на тваринах проводились з дотриманням нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 р.), Директив 2010/63/64 від 22.08.2010 р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових досліджень, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених законом України (№ 1759 – VI від 15.12.2009 р.) «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Розвиток та типологізацію патологічного процесу печінки підтверджували морфологічно. Для гістологічних досліджень біоптати фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і заливали парафіном. Гістологічні зрізи товщиною 3-5 мкм фарбували за методикою гематоксиліном і еозином та монтували на предметні скельця ($1000\times$). Проводили оцінку мікроскопічної будови органу, наявності та характеру дистрофічних змін, інфільтрації клітинами запалення та стану порталних трактів.

Для отримання напівтонких зрізів матеріал протягом 4 години фіксували у 1,25 %-вому розчині глютарового альдегіду, протягом 20 хвилин відмивали у фосфатному буфері (pH 7,2-7,4), зневоднювали у спиртах висхідної концентрації та ацетоні. В подальшому матеріал заливали в епон-аралдитну суміш для полімеризації при $+60^\circ\text{C}$. Напівтонкі зрізи отримували за допомогою ротаційного мікротому RM 60-ЕКА. Гістологічні зрізи товщиною 1 мкм фарбували толудіновим синім. Напівтонкий зріз, отримували з епон-аралдитових блоків. 1 мкм зрізи фарбували 1,0 % толудіновим синім. Фарбування проводили 1,0 %-ним оксидом осмію.

Дослідження напівтонких зрізів доповнювали інформаційною картиною, отриманою при вивченні парافیнових зрізів. Результати фотографували за допомогою тринокулярного мікроскопу «MICROmed» XS-4130 CCD відеокамера 5 млн пікселів з програмним забезпеченням та докладно описували.

ЗХЕ печінки щурів після моделювання стеатозу виконували *in vivo*, декапітованому (знекровленні тварини) та *in vitro*. Печінку щура занурювали у фізіологічний розчин на глибину 5 см від поверхні, щоб уникнути компресії [2].

Для статистичного аналізу отриманого числового матеріалу використовували дескриптивну статистику: порівняння середніх значень змінних здійснювали за допомогою параметричних методів (t-критерію Стюдента) за нормального розподілу даних ознак, що виражені в інтервальної шкалі та непараметричних методів. Відповідність виду розподілу ознак закону нормального розподілення перевіряли за допомогою ме-

тоду Шапіто-Уїлка. Відмінності, отримані за методом парних порівнянь, вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

При проведенні морфологічних досліджень було виявлено, що у дослідних щурів I групи (після 20 тиж-

нів моделювання стеатозу) відмічався розвиток стеатозу з дрібнокраплинною жировою дистрофією, розсіяною по всій площині часток та розширенням синусоїд (Рис. 1. А, Б, В).

Рис. 1. А, Б. Жирові включення в цитоплазмі гепатоцитів (вказано стрілками) щурів I групи. Жирові краплини в синусоїдах паренхіми печінки. Фарбування гематоксильн-еозином. X400.

В печінці всіх щурів в синусоїдах відмічаються краплини жиру, а у васкулярній цитоплазмі гепатоцитів вакуолі, які містять жир (вказано стрілками).

Рис. 1. В. Печінка щурів I групи. Жирові краплини в цитоплазмі гепатоцитів має жовтий колір (вказано стрілками). Напівтонкий зріз. Фарбування толуїдиновим синім. X1000

Стеатоз печінки у експериментальних щурів характеризувався патологічним внутрішньо- і/та зовнішньоклітинним накопиченням жирових крапель. Основні компоненти гепатоцелюлярних ліпідів складаються з тригліцеридів, субстратами для синтезу яких є жирні кислоти та гліцерофосфат. Накопичення жирових крапельок у печінці може бути наслідком надходження вільних жирних кислот у печінку або посиленого їх синтезу з ацетилкоензиму А, особливо при надлишку самим органом [1].

За даними ЗХЕ печінки показник жорсткості паренхіми у щурів I групи, у прижиттєвому стані склав $5,60 \pm 0,28$ кПа, що є на 17% ($p < 0,05$) вищим ніж у інтактних тварин. На рис. 2 надано еластограмми печінки тварин у різних підходах.

Як показано на рис. 3., середні показники ЖТП у знекровлених щурів склали в середньому $8,09 \pm 0,47$ кПа, що вище показників групи контролю. Проте добре помітно, що даний показник на 30,8% ($p < 0,01$) більше за прижиттєві дані – $5,60 \pm 0,28$ кПа, що можливо пов'язане з об'ємом та тиском крові до та після знекровлення тварини.

Рис. 2. Зсувнохвильова еластографія/метрія тканини печінки щурів I групи: А) in vivo; Б) декапітована тварина; В) in vitro.

Рис. 3. Середні показники еластичності печінки щурів I групи, n=29

Примітка: * – $p < 0,01$ – вірогідність змін між показниками по відношенню до групи in vivo.

Показники еластичності паренхіми печінки інтактних щурів при дослідженні в умовах in vitro були нижче за прижиттєві значення на 19,0 % ($p < 0,01$) та складали $4,53 \pm 0,18$ кПа. Проте ми не виключаємо, що на показники жорсткості впливає фізіологічний розчин. Так як рідина з фантому тканиною печінки може поглинатися.

У II групи тварин стеатогепатоз зберігався у 5 щурів (рис.4.). Відмічалось депозитування жиру в цитоплазмі гепатоцитів печінкової частки. При цьому у однієї тварини стеатоз був відсутній.

У тварин II групи показники прижиттєвої жорсткості паренхіми печінки in vivo були в межах $5,12 \pm 0,23$ кПа (рис. 5), що відповідало зниженню жорсткості на 8,6 % ($p < 0,05$) у порівнянні з групою, де моделювали стеатогепатоз (рис. 3).

Разом з тим дослідження паренхіми печінки знекровлених тварин та в умовах in vitro не мали статистично значимих відхилень від таких у in vivo.

Рис.4. Жирові краплини в цитоплазмі гепатоцитів (вказано стрілкою) у групи щурів II групи. Фарбування толуїдиновим синім. X400.

Рис. 5. Порівняльні показники еластичності печінки щурів II, III, та IV груп, n=21.

Примітка: * – $p < 0,05$ – вірогідність змін між показниками по відношенню до II групи in vivo.

– $p < 0,05$ – вірогідність змін між показниками по відношенню до II групи після декапітації.

¶ – $p < 0,05$ – вірогідність змін між показниками по відношенню до II групи in vitro.

При проведенні морфологічних досліджень на 7 щурах III групи (корекція коензимом Q10) відмічалось, що у 3 із 7 щурів (43 % випадків) та за впливу методоксину у 1 з 6 випадків (16,6 %) IV групи гепатоцити не містили ліпідних вакуолей (рис. 6.).

Рис. 6. Відсутність жирових краплин в цитоплазмі гепатоцитів щурів III групи. Фарбування гематоксипін-еозином. Х400.

Дія коензиму Q10 та методоксину у тварин порівняно до тварин II групи (рис. 5) призвела до зменшення прижиттєвої жорсткості паренхіми печінки на 23,8 % ($p < 0,05$) та 16,2 % ($p < 0,05$) відповідно.

Вимірювання еластичності знекровленої печінки по відношенню до тварин II групи була збільшена на 13,5 % ($p < 0,05$) за впливу методоксину, а за дії коензиму Q10 вірогідних змін не відмічалось.

Дослідження печінки тварин в умовах *in vitro*, що жорсткість печінки за дії методоксину була на рівні $2,90 \pm 0,18$ кПа, що на 29,1 % ($p < 0,05$) та за впливу коензиму Q10 – на 18,3 % ($p < 0,05$) менше від показників II групи.

Коензим Q10 є природною вітаміноподібною речовиною, яка бере участь у енергетичних процесах клітин органів (приймає участь в перенесенні електронів з NADH-дегідрогеназного та сукцинатдегідрогеназного комплексу на комплекс убіхінол-цитохром c-оксидоредуктаза, і таким чином беручи участь у синтезі АТФ), прискорює обмінні процеси в організмі, проявляє антиоксидантні властивості [16].

Загальновідом є факт, що гепатопротекторні властивості препарату «Ліверія ІС» з основною діючою речовиною метадоксин (піридоксин L-2-піролідон-5-карбоксилат) насамперед обумовлюються тим, що підвищує стійкість гепатоцитів до продуктів перекисного окиснення ліпідів, сповільнює процеси виникнення первинної структурної дегенерації гепатоцитів, пригнічується синтез фібронектину та колагену, що, в свою чергу, знижує розвиток фіброзу печінки.

Більш вираженою корекційною дією, як гепатопротектору, мало застосування коензиму Q10. У тварин III дослідної групи, які отримували цю добавку, були найкращі показники морфологічних досліджень (гепатоцити більшої частини тварин не мали жирових включень), покращувався функціональний стан печінки (зменшувались показники еластографії). Тому застосування коензиму Q10 позитивно впливає на нормалізацію обмінних процесів у печінці щурів та зменшенню її жорсткості завдяки покращенню енергетичних процесів в мітохондріях на фоні зменшення жирових відкладень у гепатоцитах, що в свою чергу, підт-

верджується морфологічними та еластографічними дослідженнями.

Застосування щурам методоксину порівнюючи з II групою, мало позитивний вплив на показники метаболічних процесів у печінці за морфологічною картиною, що проявлялося зменшенням ліпідів у гепатоцитах та згідно даних еластографії зменшенням жорсткості печінки.

Висновки

1. Даними морфологічних досліджень було підтверджено, що вживання щурами 20 %-вого водного розчину фруктози в якості єдиного джерела питва протягом 20 тижнів викликало розвиток стеатозу печінки і характеризувалось розширенням синусоїдів та значним накопиченням у гепатоцитах крапель жиру, що супроводжувалось показником зростання жорсткості печінки щурів.

2. Прижиттєві показники жорсткості печінки щурів при моделюванні стеатозу складали $5,60 \pm 0,28$ кПа, що може вказувати на посилені процеси розвитку сполучної тканини у печінці.

3. У тварин II групи за моделювання стеатозу показники жорсткості паренхіми печінки щурів були в межах $5,12 \pm 0,23$ кПа, що на 8,6 % ($p < 0,05$) менше за прижиттєвого дослідження паренхіми органу при ви-поюванні розчину фруктози.

4. Застосування коензиму Q10, як корегуючу стеатоз речовину, мало позитивний вплив на функціональний стан печінки. Згідно даних еластографії жорсткість печінки була меншою на 23,8 % ($< 0,01$), а за морфологічними дослідженнями відмічалось, що у 43 % випадків цитоплазма гепатоцитів не містила ліпідних вакуолей.

5. Застосування методоксину сприяло зниженню жорсткості печінки на 13,5 % ($p < 0,05$) порівняно до II групи та виявлено, що у 16,6 % випадків гепатоцити не містили ліпідних включень.

Література

1. Barannik EA, Dynnik OB, Linskaya AV, Marusenko AI Ul'trazvukovaya elastografiya: vchera, segodnya, zavtra. Prom. diagnostika, prom. terapiya. 1. 2012: 2–77.
2. Dinnik OB, Berezovs'kiy VYa, Kobilyak NM, Litovka IG, Yanko RV, Plotnikova LM Vikovi zmini zhorstkosti tkanin pechinki schuriv za dopomogoyu metodu ul'trazvukovoi elastografii. Fiziol. zhurn. 59 (3). 2013:111-113.
3. Didenko VI Sovremennye dostizheniya v ozenke steatoza pecheni. Gastroenterologiya. 3 (57). 2015:94-100.
4. Kolesnikova EV, Kurinnaya EG Vliyanie steatoza pecheni na vyrazhennost' dislipidemii. Ukrainskiy terapevticheskiy zhurnal. 1. 2012:14-20.
5. Leschenko DV, Kostyuk NV, Belyakova MB, Egorova EN, Minyaev M.V., Petrova MB Dieticheski induzirovannye zhivotnye modeli metabolicheskogo sindroma (obzor literatury). Verkhnevolzhskiy med. zhurnal. 14 (2). 2015:34-39.
6. Stazenko ME, Turkina SV, Kosivzova MA, Tyschenko IA Nealkogol'naya zhirovaya bolezni pecheni kak mul'tisistemnoye zabolevanie. Vestnik Volgograd. GMU. 2 (58). 2016:8-14.
7. Bakulin IG, Sandler YuG, Keyyan VA, Rotin DL No-vyy neinvazivnyy metod ozenki steatoza pri chroni-cheskikh zabolevaniyach pecheni. Terapevticheskiy archiv. 2 2016:49-57.
8. Cherkashina EA, Petrenko LV, Evstigneeva AYU Nealkogol'naya zhirovaya bolezni pecheni. Ul'yanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal. 1. 2014:35-46.
9. Borsukov AV, Kryukovskiy SB, Pokusaeva VN i dr. (2011). Elastografiya v klinicheskoy gepatologii (chastnye voprosy): Monografiya. Smolensk: Smolenskaya gorodskaya tipografiya. 276 s.

10. Angulo P., Machado M.V., Diehl AM Fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease: mechanisms and clinical implications. *Semin Liver Dis.* 35 (2). 2015: 132-45.
11. Nobili V., Alkhouri N., Alisi A., Della Corte C., Fitzpatrick E., Raponi M., Dhawan A Nonalcoholic fatty liver disease: a challenge for pediatricians. *JAMA pediatrics.* 169(2). 2015: 170-176.
12. Goh GB., McCullough AJ Natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 61. 2016: 1226-33.
13. Kuntz E., Kuntz H.-D Hepatology. Principles and practice (2nd ed.). Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 2006. 902 p.
14. Miyake T., Kumagi T., Furukawa S., Tokumoto Y., Hirooka M., Abe M., Hiasa Y., Matsuura B., Onji M Non-alcoholic fatty liver disease: Factors associated with its presence and onset. *J.Gastroenterol Hepatol.* 28 (S. 4). 2013: 71-78.
15. Rinella ME Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA.* 313. 2015: 2263-2273.
16. Rahmani A, Abangah G, Moradkhani A, Hafezi Ahmadi MR, Asadollahi K Coenzyme Q10 in combination with triple therapy regimens ameliorates oxidative stress and lipid peroxidation in chronic gastritis associated with H. pylori infection. *J Clin Pharmacol.* 55(8). 2015: 842-847.

Матеріал надійшов до редакції 02.08.2019.