**УДК: 616.36-008.6-092.2: 612.357.6: 613.24**

***М.А. Кузнецова***

***Харьковский Национальный Медицинский Университет***

**ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА ПИТАНИЯ С ДЕФИЦИТОМ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ БЕРЕМЕННЫХ КРЫС**

**Введение**

За последние годы в Украине отмечается тенденция к росту патологии печени [1]. В структуре заболеваемости высокий процент принадлежит хронической патологии печени, которая считается «второй эпидемией нашего века», после «эпидемии» сердечно-сосудистой патологии [1,2]. Так по данным ВОЗ, хроническими диффузными заболеваниями печени страдает 30% населения планеты. В Украине выявлено увеличение распространенности хронического гепатита в 2,2 раза, а цирроза печени – на 60% [2]. Согласно литературным данным, в этиологической структуре патологии печени ведущее место занимают алкоголь, злоупотребление лекарственными препаратами (психостимуляторы), нарушение пищевого поведения (переедание и недоедание) на фоне роста распространенности гепатотропных вирусных инфекций [2]. Возрос интерес к вопросу влияния качества питания на функциональное состояние печени. В последнее время появилось множество экспериментальных исследований, посвященных изучению влияния алиментарной белковой недостаточности на организм самок крыс [3,4,5]. Установлено, что на протяжении первых двух суток голодания в печени крыс сохранялась высокая функциональная активность антиоксидантной системы: достоверно меньшие, по сравнению с контролем, концентрации диеновых конъюгатов, кетодиенов и ТБК-активных продуктов, высокая активность каталазы и содержание восстановленного глутатиона. На 3-и сутки голодания в печени наблюдали признаки активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне сохраняющихся высоких значений активности каталазы и концентрации восстановленного глутатиона. Показано, что в ответ на голодание в организме происходит экспрессия нескольких тысяч генов, профиль которых находится в тесной зависимости от длительности периода лишения пищи [3]. Так же установлено, что в условиях безбелкового рациона снижается NADH-дегидрогеназная активность митохондрий печени крыс (на 14-е сутки), при этом 4-недельное содержание крыс в указанных условиях приводит к снижению исследуемой ферментативной активности в 5,5 раза, по сравнению с контролем, и в 3раза по сравнению с показателями, полученными на предыдущей стадии эксперимента. В то же время при частичной белковой недостаточности снижение активности NADH-дегидрогеназы митохондрий печени (в 2 раза) наблюдается только на 28-е сутки эксперимента [4]. Была выявлена, активация сфингомиелинового цикла: увеличение активности нейтральной сфингомиелиназы в печени крыс к завершению I фазы голодания (3-е сутки) и формирование условий для проявления церамид-опосредованной проапоптотической сигнализации [5].

Несмотря на наличие работ, посвященных, изучению влияния алиментарных факторов на обмен веществ у крыс комплексное изучение влияния неполноценного питания на морфофункциональное состояние печени беременных самок крыс остается недостаточно изученным, хотя в последнее время в связи с социальными особенностями жизни этот вопрос становится крайне актуальным.

**Цель работы** – изучение влияния неполноценного питания с дефицитом белков и углеводов на морфофункциональное состояние печени беременных крыс.

**Материалы и методы.** Экспериментальное исследование проведено на 4-месячных рандомбредных крысах-самках популяции WAG/G Sto, которые были разделены на две группы: 7 самок, получавших в период беременности стандартный рацион вивария, (1-я группа, контрольная); 6 самок, которые на протяжении беременности получали питание с дефицитом белков (2-я группа, основная). Моделирование влияния алиментарного фактора на крыс осуществлялось с использованием экспериментальной модели, разработанной на кафедре патологической физиологии им. Д.Е. Альперна Харьковского национального медицинского университета [6].

Морфологическое исследование ткани печени проведено по общепринятым методикам [7]. Для оценки состояния эндотелия сосудов печени иммуногистохимическим методом, проводилась качественная реакция определения экспрессии маркеров обмена оксида азота: эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Использовались концентрированные поликлональные кроличьи антитела (ПКАТ) фирмы Thermo scientific (Германия), Nitric Oxide Synthase inducible (iNOS) Rabbit Polyclonal Antibody в разведении 1:100, Nitric Oxide Synthase endothelial (eNOS) Rabbit Polyclonal Antibody в разведении 1:50. В гомогенатах ткани печени изучали фракционный состав липидов (холестерина – ХС, фосфолипидов – ФЛ, триглицеридов – ТГ, неэстерифицированных жирных кислот – НЭЖК) методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol [8, С.559-565] и содержание гликогена (ГГ) спектрофотометрическим методом по В.Г. Асатиани [8, С.522-528]. В сыворотке крови определяли активность индикаторных ферментов: аланин- и аспартатаминотрансферазы (АлАТ, АсАТ), γ-глутамилтрансферазы (ГГТ), сорбитолдегидрогеназы (СДГ), содержание общего белка и его фракций (альбуминов, α1-, α2-, β-, γ-глобулинов), мочевины и глюкозы спектрофотометрическим методом с помощью наборов реактивов «Филисит Диагностикум» (Днепр, Украина), ХС, ТГ, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) с помощью наборов реактивов фирмы «Ольвекс» (Россия), липопротеидов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП) расчётным методом [8, С.409].

Исследования выполнены с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Выведение животных из эксперимента проводилось сразу после рождения крысят путём декапитации. С использованием высоких концентраций диоксида углерода (СО2). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы STATISTICA-10. Для определения достоверности отличий использовали критерий U Манна-Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** При макроскопическом исследовании существенных отличий ткани печени у крыс основной (2-й) и контрольной (1-й) групп не выявлено. При микроскопическом исследовании в печени крыс, получавших гипобелковый и гипоуглеводный рацион, установлены отличия от животных группы контроля, заключающиеся в умеренной дискомплексации балочно-радиарного строения, наличии темной зернистости цитоплазмы гепатоцитов в центрах долек, пикнотичных изменениях их ядра, что свидетельствует о нарушении их морфофункциональной активности.

Степень повреждения паренхимы печени оценивали на основании определения регенераторной активности и определения относительного объёма элементов паренхимы и стромы с вычислением стромально-паренхиматозного индекса (СПИ), а также степени эндотелиальной дисфункции, путём выявления экспрессии маркеров обмена оксида азота: eNOS и iNOS.

Регенераторная активность печени оценивалась на основании подсчёта количества двуядерных гепатоцитов в процентном соотношении к их одноядерным формам. Выявлено, что у крыс 2-й гр. Количество двуядерных гепатоцитов в 3 раза (p<0,05) превышает их количество у животных 1-й гр. (соответственно 7,12±0,05% и 2,37±0,03%). Это свидетельствует о высокой интенсивности повреждения печени и активации процессов регенерации паренхимы печени.

Результаты исследования структурных элементов печени представлены в табл. 1. Установлено, что у крыс 2-й гр. имеет место достоверное уменьшение объёма перенхимы и увеличение объёма стромальной части; СПИ увеличен на 28,21% (p<0,05). Полученные данные свидетельствуют об активации процесса пролиферации в строме печени, что чревато развитием органической патологии в дальнейшем.

Таблица 1

**Структурные элементы печени у крыс (М±m)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Структурные элементы | Группа исследования | |
| 1 группа (n=7) | 2 группа (n=6) |
| Строма, % | 28,1±1,1 | 33,4±1,1\* |
| Паренхима, % | 71,9±1,1 | 66,6±1,1\* |
| Стромально-паренхиматозный индекс (СПИ) | 0,39±0,01 | 0,50±0,01\* |

Примечание: \* - р<0,05 – сравнение с 1-й гр.

О нарушении морфофункционального состояния печени свидетельствовали изменения, выявленные при иммуногистохимическом исследовании ткани печени. В печени крыс 2-й (основной) гр. экспрессия eNOS в сосудах печени была слабой, неравномерной. Позитивно окрашенный эндотелий синусоидов в большинстве случаев обнаруживался в перипортальных отделах долек, тогда как центральные отделы демонстрировали мозаичность или полное отсутствие окрашивания. Клетки эндотелия располагались на значительном расстоянии друг от друга, частью были слущены и находились в просветах вен.

Индуцибельная синтаза, напротив, маркировала эндотелиоциты синусоидов и центральных вен и прилежащие к ним гепатоциты, находящиеся в состоянии белковой дистрофии. Кроме того, позитивно окрашенные участки выявлялись в мышечных стенках сосудов пролиферирующих портальных трактов. Данные иммуноморфологические особенности свидетельствуют о высокой степени эндотелиальной дисфункции и потери функциональной активности паренхимы печени.

Для оценки функционального состояния печени были проведены биохимические исследования крови и ткани печени, результаты которых представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

**Уровень биохимических показателей функционального состояния печени в сыворотке крови крыс (М±m)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатели | 1 группа (n=7) | 2 группа (n=6) |
| АсАТ, нмоль/с·л | 27,07±0,84 | 20,74±0,68\* |
| АлАТ, нмоль/с·л | 28,13±0,92 | 22,77±1,59\* |
| ГГТ, нмоль/с·л | 143,65±3,67 | 112,88±6,47\*\* |
| СДГ, нмоль/с·л | 5,63±0,62 | 4,12±1,06\* |
| Общий белок, г/л | 64,86±1,01 | 62,77±1,52 |
| альбумина, % | 52,48±0,75 | 49,72±0,66\* |
| α1-глобулины, % | 8,05±0,39 | 6,45±0,3\* |
| α2-глобулины, % | 8,25±0,45 | 7,57±0,9 |
| β-глобулины, % | 14,09±1,09 | 20,76±0,95\*\* |
| γ-глобулины, % | 16,39±0,65 | 14,55±0,39\* |
| Мочевина, моль/л | 7,67±0,23 | 6,88±0,23\* |
| Холестерин, ммоль/л | 6,63±0,21 | 6,22±0,16\* |
| Триглицериды, ммоль/л | 1,07±0,32 | 1,47±0,30\* |
| ЛПНП, ммоль/л | 2,86±0,15 | 2,41±0,18 |
| ЛПОНП, ммоль/л | 0,49±0,14 | 0,66±0,13\* |
| ЛПВП, ммоль/л | 3,24±0,32 | 3,14±0,30 |
| Глюкоза, ммоль/л | 6,17±0,34 | 5,9±0,54 |
| Кетоновые тела, ммоль/л | 1,85±0,35 | 4,54±0,28\*\* |

Примечание: \* - р<0,05; \*\* - р<0,01 – сравнение с 1-й гр.

Таблица 3

**Уровень биохимических показателей функционального состояния печени в гомогенате печени крыс (М±m)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатели | 1 группа (n=7) | 2 группа (n=6) |
| Холестерин, мг/г | 0,64±0,04 | 0,33±0,03\*\* |
| Фосфолипиды, мг/г | 24,37±1,34 | 19,17±0,75\*\* |
| Триглицериды, мг/г | 5,71±0,82 | 3,23±1,2\* |
| НЭЖК, мг/г | 8,55±1,3 | 6,56±0,3\* |
| Гликоген, мг/г | 26,38±1,43 | 23,65±1,52 |

Примечание: \* - р<0,05; \*\* - р<0,01 – сравнение с 1-й гр.

В сыворотке крови крыс 2-й группы снижена активность органоспецифических «печеночных» ферментов АсАТ, АлАТ, СДГ и ГГТ – на 23,37%, 19,05%, 26,79% и 21,42% соответственно, по сравнению с контролем, что связано с уменьшением числа гепатоцитов и снижением количества ферментов в ткани печени.

Установлен «печеночный» тип протеинограммы. При уровне общего белка, соответствующем физиологической норме, отмечается небольшое снижение фракции альбуминов (на 5,26%), что может быть связано с повышенным их гидролизом в связи с дефицитом белка в питании. Гипоальбуминемия также может быть обусловлена, снижением синтеза альбумина, что связано с уменьшением числа гепатоцитов и нарушением их функций. В то же время наблюдалось увеличение синтеза β-глобулинов (повышение на 47,31%). Известно, что в состав β-глобулинов входит ЛПОНП и ЛПНП. Вероятно, рост концентрации β-глобулинов связан с активацией использования жиров в качестве источника энергии и повышением транспорта ТГ и жирных кислот из печени. Отмечается снижение процентного содержания γ - глобулинов у крыс 2-й гр. (на 11,23%) по сравнению с контролем, основным компонентом которых являются иммуноглобулины, что свидетельствует о снижении иммунитета.

Триглицериды (ТГ) используются в условиях недостаточности питания, как энергетический субстрат, а холестерин (ХС) – для синтеза глюкокортикоидов, осуществляющих компенсаторную регуляцию обмена веществ в условиях голодания. Повышением уровня ЛПОНП (на 34,69%) объясняется и выявленное увеличение содержания ТГ – на 37,23%.

Как видно из полученных нами данных, в сыворотке крови крыс 2-й группы снижена концентрация глюкозы (на 4,32%), что связано с дефицитом её в питании и повышенной утилизацией тканями. В связи с тем, что кровь бралась натощак (после 12-часового интервала в приеме пищи), можно предположить, что гликогенный резерв недостаточен для поддержания постоянного уровня глюкозы крови, а глюконеогенез снижен из-за функциональных нарушений в печени. Это подтверждается снижением уровня гликогена в печени крыс 2-й гр. на 10,35%.

В гомогенате печени выявлено снижение всех изучаемых липидных фракций: ХС – на 49,22%, фосфолипидов (ФЛ) – на 21,34%, ТГ - на 43,52% и НЭЖК – на 23,31%, что, по-видимому, объясняется повышенной секрецией транспортной формы ЛПОНП, а также уменьшением синтеза этих липидов в связи со сниженным числом гепатоцитов.

Дефицит глюкозы, как энергетического субстрата, компенсируется активацией синтеза кетоновых тел, что объясняет выявленный нами повышенный уровень кетоновых тел (КТ) –на 145,14% в сыворотке крови крыс 2-й гр. Уменьшение количества паренхимы печени свидетельствует о белковом голодании крыс и использовании не только белков крови, но и белков печени как источника незаменимых аминокислот. Дефицит синтеза белка в организме (из-за недостатка белка в питании), сопровождается снижением его катаболизма, о чем свидетельствует снижение содержания мочевины на 10,25% в сыворотке крови, крыс 2-й группы.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что у крыс, находившихся на гипобелковой и гипоуглеводной диете в течение беременности, развивается дислипидемия (с повышением уровня ТГ и ЛПОНП), гипогликемия, кетонемия, а также диспротеинемия (снижение фракций альбумина, α1 -, α2 – и γ- глобулинов), что можно расценивать как риск развития атеросклероза.

В гомогенате печени крыс выявлено понижение уровня всех фракций липидов (ХС, ФЛ, ТГ и НЭЖК), а также снижение уровня гликогена печени, это отражается на липидном спектре сыворотки крови и содержании глюкозы в крови, свидетельствует о наличии функциональных нарушений в органе на фоне частичного голодания.

**Выводы**

1. Гипобелковое питание с дефицитом углеводов в рационе беременных самок приводит к морфофункциональным нарушениям печени, проявлявшимся дискомплексацией балочно-радиарного строения, белковой дистрофией гепатоцитов, повышенной регенераторной активностью органа и повышением СПИ. в ткани печени, которые могут стать причиной развития фиброза печени.
2. В сосудах печени выявлено выраженное снижение уровня экспрессии eNOS и свидетельствует о значительном органическом повреждении паренхимы печени беременных крыс, получавших гипокалорийный рацион питания.
3. Функциональные изменения печени проявлялись диспротеинемией, дислипидемией (повышение уровня ЛПОНП и ТГ) и гипогликемией с кетонемией, что является фактором риска развития атеросклероза.
4. В ткани печени наблюдается снижение уровня всех фракций липидов, что свидетельствуют о нарушении синтеза липидов.
5. Недостаточное питание во время беременности является фактором риска печёночной недостаточности, фиброза печени и атеросклероза.

**Список литературы**

1. Сазонова Е. Болезни печени в практике клинициста// Провизор. 2007. №5. С. 12-15.
2. Звягинцева Т. Д., Чернобай А. И. Хронические заболевания печени: фокус на поликомпозиционные растительные гепатопротекторы – антиоксиданты// Сучасна гастроентерологія. 2014. №4 (78). С. 70.
3. Волощук О. Н., Копыльчук Г. П., Кадайская Т. Г. Состояние системы энергообеспечения митохондрий печени крыс при алиментарной белковой недостаточности// Вопросы питания. 2014. №3 Том 83. С. 12 – 16.
4. Буров П. Г., Кузьменко Д. И., Серебров В. Ю. Пероксидация липидов в печени крыс на разных фазах голодания// Вестник НГУ. 2011. №3 Том 9. С. 34 – 38.
5. Буров П. Г., Кузьменко Д. И., Серебров В. Ю. Компоненты сингомиелинового цикла и активность нейтральной сфингомиелиназы печени на различных фазах голодания// Вестник новых медицинских технологий. 2011. №3 Том XVIII. С. 21 – 22.
6. Пат. 81453 Україна МПКG09B 22/28 (2006.01) G 09B 23/24 (2006.01) Спосіб моделювання аліментарної недостатності/ Ніколаєва О. В., Ковальцова М. В., Євтушенко Т. Г.; заявник та патентовласник Харківський національний медичний університет. - № u 2013 01910; заявл. 18. 02. 2013; опубл. 25. 06. 2013, Бюл. №12.
7. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. - М.: Медицина, 1990. 384с.
8. Камышников В. С. Методы клинических лабораторных исследований. Москва: «Медипресс – информ», 2016. 736с.

**М.А. Кузнецова**

ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА ПИТАНИЯ С ДЕФИЦИТОМ ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ БЕРЕМЕННЫХ КРЫС

Исследовано морфофункциональное состояние печени 6 крыс, получавших в течении беременности несбалансированное питание с дефицитом белков и 7 крыс группы контроля.

Морфологические изменения органа у крыс основной группы заключались в дискомплексации балочно-радиарного строения, белковой дистрофии гепатоцитов, повышении регенераторной активности печени и повышении СПИ в ткани печени.

Иммуногистохимически выявлена выраженная экспрессия маркеров eNOS и iNOS, также при детальном изучении ендотелиальной выстилки капилляров, центральных вен и более крупных сосудов обнаружено нарушение её целостности с формированием «голых» зон, что свидетельствует о высокой степени эндотелиальной дисфункции и потере функциональной активности паренхимы печени.

Функциональные нарушения проявлялись развитием диспротеинемии, дислипидемии, гипогликимии и гиперкетонемии. Это свидетельствует о наличии риска развития у животных фиброза печени, СД 2 типа и атеросклероза.

**Ключевые слова:** морфофункциональное состояние печени, гипобелковая диета, беременные крысы.

**М.О. Кузнецова**

ВПЛИВ РАЦІОНУ ХАРЧУВАННЯ З ДЕФІЦИТОМ ПОЖИВНИХ РЕЧОВИН НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ВАГІТНИХ ЩУРІВ

Досліджено морфофункціональний стан печінки 6 щурів, що отримували незбалансоване харчування з дефіцитом протеїнів під час вагітності та 7 щурів групи контролю.

Морфологічні зміни органу у щурів 2-ї гр. полягали в дискомплексації балочно-радіарноної будови, білкової дистрофії гепатоцитів, збільшенні регенераторної активності печінки і збільшенні СПІ в тканині печінки.

Імуногістохімічно виявлена виражена експресія маркерів eNOS та iNOS, також при детальному вивченні ендотеліальної вистілки капілярів, центральних вен та більш великих судин виявлено порушення її цілісності з формуванням «голих зон», що свідчить про помірно високу ступінь ступінь ендотеліальної дисфункції та втрату функціональної активності паренхіми печінки.

Функціональні порушення проявлялися розвитком диспротеїнемії, дисліпідемії, гіпоглікемії, гіперкетонемії. Це свідчить про ризик розвитку фіброзу печінки і атеросклерозу у тварин.

**Ключові слова:** морфофункціональний стан печінки, гіпопротеїнова дієта, вагітні щури.

**M. O. Kuznetsova**

**The effect of food ration with dietary deficiency**

**on the morphofunctional state of pregnant rats’ liver**

The morphofunctional state of liver of 6 rats having unbalanced diet with protein deficiency and 7 rats from the control group has been studied.

The structural changes of the rat organ from the main group contained discomplexation of radial arrangement of hepatic cords, albuminous degeneration of hepatocytes, growth of regenerative activity of liver and increase of SPI in liver tissues.

The immunohistochemical study discovered the evident expression of eNOS and iNOS markers. Moreover, the detailed study of the endothelial capillary lining, great veins and bigger vessels revealed the disruption of continuity with formation of “bare” zones which evidence on high level of endothelial dysfunction and functional deactivation of liver pulp.

The functional disorders were evident as development of dysproteinemia, dyslipidemia, hypoglycemia and hyperketonemia. It evidences on higher risk on getting hepatic fibrosis in animals, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis.

Key words: morphofunctional state of liver, hypoprotein diet, pregnant rats.