**ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ САМОК КРЫС В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ**

**Николаева О.В., Кузнецова М. А.**

*Харьковский национальный медицинский университет, Украина*

Согласно данным эпидемиологических исследований, опубликованных Всемирной организацией здравоохранения, около 29млн. человек в европейских странах страдают хроническими заболеваниями печени [1]. Так около 0,1% европейского населения страдает циррозом печени (ЦП), что соответствует 14-26 новым случаям на 100 тыс. населения и примерно 170 тыс. летальных случаев в год [2]. В Украине также наблюдается интенсивный рост числа больных с заболеваниями печени. В связи с этим актуальными стали исследования, направленные на изучение факторов риска патологии печени.

Установлено, что важную роль в повреждении печени играют как экзогенные так и эндогенные факторы. Среди экзогенных факторов, способствующих развитию морфофункциональных нарушений в печени ведущее место занимает стресс. Высокая стресс – наполненность жизни в современных социальных условиях делает изучение механизма стрессорного повреждения печени крайне актуальным [5]. В работах ряда исследователей указана связь между стрессовыми воздействиями и развитием различных заболеваний (сердечно-сосудистые заболевания, гипертоническая болезнь, диабет и др.) [6, с.67,7]. Так, например в эксперименте на мышах установили, что повторяющийся стресс приводит к развитию гиперметаболического синдрома, сопровождающегося значительной потерей массы тела, гипергликемией, дислипидемией, ацидозом, ведущих к резкому сокращению индивидуальных энергетических резервов и устойчивости к воздействию стрессоров в дальнейшем [3,5]. Имеются лишь единичные работы, в которых изучается влияние стресса на функциональное состояние печени. Так установили, что острый стресс провоцирует снижение интенсивности аэробного гликолиза и глюконеогенеза, активацию липолиза, а также напряжение системы антиоксидантной защиты и усиление процессов перекисного окисления липидов, что приводит к нарушению этерифицирующей функции печени [6]. Однако, роль хронического стресса как фактора повреждения печени остается недостаточно изученной.

Целью нашего исследования было изучение морфологических и биохимических особенностей ткани печени самок крыс, подвергавшихся иммобилизационному стрессу во время беременности.

**Материалы и методы.** Экспериментальное исследование проведено на 3-месячных рандомбредных крысах-самках популяции WAG/G Sto, которые были разделены на две группы: 7 самок, находившихся в период беременности в стандартных условиях вивария, (1-я группа (контрольная); 7 самок, которые на протяжении беременности подвергались хроническому иммобилизационному стрессу - 2-я группа (основная). Моделирование влияния стрессового фактора на крыс осуществлялось с использованием экспериментальной модели, разработанной на кафедре патологической физиологии им. Д.Е. Альперна Харьковского национального медицинского университета [4].

Морфологическое исследование ткани печени проведено по общепринятым методикам [8;9]. Для оценки состояния эндотелия сосудов печени иммуногистохимическим методом выявляли экспрессию 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 [10, С.559-565] и содержание гликогена (ГГ) спектрофотометрическим методом по В.Г. Асатиани [10, 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 [10, 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. Для обезболивания использовали высокие концентрации диоксида углерода (СО2). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы STATISTICA-10. Для определения достоверности отличий использовали критерий U Манна-Уитни.

**Результаты и обсуждение:** Установлено, что макроскопически печень крыс основной группы значительно отличалась от группы контроля - на разрезе она была мелкозернистая, коричнево-желтоватого цвета, что может свидетельствовать о наличии жирового гепатоза.

Микроскопически в печени крыс группы I отмечалось нарушение гистоархитектоники в виде выраженной дискомплексации балочно–радиарного строения, что резко отличалось от состояния органа в контрольной группе. Гепатоциты были неравномерно набухшие (в основном вокруг портальных трактов) с выраженной дисхромией цитоплазмы и неравномерным пикнозом ядер, что свидетельствует о гибели гепатоцитов, а, следовательно, и паренхимы печени.

Степень повреждения паренхимы печени оценивалась 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. Установлено, что у крыс II группы количество двуядерных гепатоцитов в 3,6 раз (p<0,05) превышало количество у животных I группы (соответственно 8,65±0,07% и 2,37±0,03%). Это свидетельствует о высокой интенсивности повреждения печени.

Результаты исследования структурных элементов печени представлены в табл.1. Установлено, что у крыс II группы имеет место достоверное уменьшение объёма паренхимы и достоверное увеличение объёма стромы и СПИ. Это также свидетельствует о высокой интенсивности повреждения печени.

*Таблица 1*

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Группа исследования | |
| Группа I n=7 | Группа II n=7 |
| Строма, % | 28,1±1,1 | 36,3±1,2\* |
| Паренхима, % | 71,9±1,1 | 63,7±1,2\* |
| Стромально-паренхиматозный индекс (СПИ) | 0,39±0,01 | 0,56±0,01\* |

Примечание: \* р <0,05 сравнение с группой контроля

Также на нарушение морфофункционального состояния печени указывали изменения, выявленные при иммуногистохимическом исследовании ткани печени. В печени крыс основной группы реакция на eNOS показывала чередование участков слабо окрашенных эндотелиальных структур (в перипортальных зонах) и участков с выраженной экспрессией эндотелиальной синтазы (в центральных отделах долек). Причем как при слабой, так и при выраженной экспрессии определялись фокусы расслоения эндотелия в центральных венах, его слущивание с образованием «голых» фрагментов в стенках сосудов, а также плотные, конденсированные очаги слипания эндотелиальных клеток.

Индуцибельная NO-синтаза выявлялась в активированных клетках Купфера, эндотелии центральных вен и прилежащих к ним крупных гепатоцитах, в мышечных стенках сосудов портальных трактов и в склерозированной соединительной ткани самих портальных трактов. Как и в случае с эндотелиальной синтазой оксида азота, фокусы с выраженной экспрессией iNOS перемежались с плохо окрашенными участками. Данные иммуноморфологические особенности подтверждают наличие высокой степени эндотелиальной дисфункции и потери функциональной активности паренхимы печени.

Для оценки функционального состояния печени был проведен комплекс биохимических исследований сыворотки крови и гомогенатов ткани печени, результаты которых представлены в таблицах 2 и 3.

*Таблица 2*

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатели | Группа исследования | |
| Группа I n=7 | Группа II n=7 |
| АСТ, нмоль/с·л | 27,07±0,84 | 29,56±1,45\* |
| АЛТ, нмоль/с·л | 28,13±0,92 | 30,42±1,54\* |
| ГГТ, нмоль/с·л | 143,65±3,67 | 157,57±2,45\*\* |
| СДГ, нмоль/с·л | 5,63±0,62 | 6,42±0,4 |
| Общий белок, г/л | 64,86±1,01 | 62,25±1,15\* |
| Альбумин, % | 52,48±0,75 | 52,72±0,98 |
| α1 – глобулин, % | 8,05±0,39 | 10,93±0,65\*\* |
| α2 – глобулин, % | 8,25±0,45 | 5,77±0,71\*\* |
| β – глобулин, % | 14,09±1,09 | 15,94±0,89 |
| γ – глобулин, % | 16,39±0,65 | 13,18±0,54\*\* |
| Мочевина, ммоль/л | 7,67±0,23 | 9,67±0,38\*\* |
| Холестерин, ммоль/л | 6,63±0,21 | 7,26±0,32\* |
| Триглицериды, ммоль/л | 1,07±0,32 | 1,82±0,16\* |
| ЛПНП, ммоль/л | 2,86±0,15 | 2,98±0,12\* |
| ЛПОНП, ммоль/л | 0,49±0,14 | 0,82±0,07\* |
| ЛПВП, ммоль/л | 3,24±0,32 | 3,46±0,37 |
| Индекс атерогенности (ИА) | 0,81±0,04 | 1,18±0,29\* |
| Глюкоза, ммоль/л | 6,17±0,34 | 7,27±0,09\* |
| Кетоновые тела, ммоль/л | 1,85±0,35 | 1,85±0,36 |

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

*Таблица 3*

**Содержание липидных фракций и гликогена в гомогенате печени (M±m)**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Показатели | Группа исследования | |
| Группа I n=7 | Группа II n=7 |
| Холестерин, мг/г | 0,64±0,04 | 0,87±0,1\* |
| Фосфолипиды, мг/г | 24,37±1,34 | 13,26±1,25\*\* |
| Триглицериды, мг/г | 5,71±0,82 | 6,27±1,01\* |
| НЭЖК, мг/г | 8,55±1,3 | 19,72±1,54\*\* |
| Гликоген, мг/г | 26,38±1,43 | 22,01±1,32\* |

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

В сыворотке крови крыс II группы, отмечено достоверное повышение активностей АЛТ, АСТ и органоспецифических ферментов СДГ и ГГТ на 14,03% и 9,69% соответственно, что может быть связано с дестабилизацией мембран гепатоцитов и утечкой цитоплазматических ферментов (табл.2).

В протеинограмме крыс II группы обнаружено умеренное снижение общего белка и уровня α2- и γ-глобулина на 30,04% и 19,59% при нормальном уровне альбуминов, а также увеличение фракций α1- и β- глобулина на 36% и 13,11% по сравнению с контролем. Выявленные особенности протеинограммы указывают на диспротеинемию, вызванную длительным стрессом. Снижение γ-глобулинов свидетельствует об уменьшении продукции антител. Повышение β-глобулинов, по-видимому, связано с повышением продукции ЛПНП (обеспечение ХС для продукции антистрессорных гормонов - глюкокортикоидов). Снижение α2-глобулинов, вероятно, связано со снижением синтеза ферментов фибринолитической системы. В целом особенности протеинограммы свидетельствуют о нарушении белоксинтезирующей функции печени. Увеличение концентрации мочевины в сыворотке крови (на 26,13% по сравнению с контролем), свидетельствует о повышении катаболизма белков.

В липидном спектре сыворотки крови крыс II группы выявлено повышение уровня ХС, ТГ (на 70,49%), ЛПОНП на 67,05% и ЛПНП. Данные изменения могут быть связаны с реализацией стресс – реакции – повышается потребность тканей в ХС и ТГ, что подтверждается изменениями липидного спектра гомогената печени (увеличено содержание ТГ и ХС).

Накопление липидов в печени подтверждается повышением уровня ХС на 35,94% и НЭЖК на 130,59% и ТГ, а также снижением уровня ФЛ на 45,59% в гомогенате печени крыс II гр., что вероятнее всего связано с усилением их синтеза и обратного захвата. Данные изменения также могут быть результатом избыточной продукции катехоламинов и глюкокортикоидов.

При изучении показателей углеводного обмена обнаружено повышение уровня глюкозы на 17,85% при нормальном уровне кетоновых тел, эти изменения, вероятно, связаны с понижением скорости гексокиназной реакции, что приводит к замедлению образования глюкозо-6-фосфата в клетках печени, а затем и использования этого метаболита на всех путях превращения его в клетке (т.е. процессах синтеза гликогена, пентозофосфатном цикле и гликолизе). Так же, возможно повышается активность гликогенфосфорилазы и глюкозо-6-фосфатазы в печени, что способствует усилению гликогенолиза и повышению уровня глюкозы в крови. Подтверждением этому является выявленное нами снижение содержания в печени гликогена (понижен на 16,57%, по сравнению с контролем в гомогенате печени.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что у крыс, подвергшихся хроническому иммобилизационному стрессу во время беременности, развивается дислипидемия (с повышением уровня ХС, ЛПОНП, ЛПНП, ТГ), гипергликемия, что можно расценивать как риск развития СД 2 типа.

Выявленные повышения уровня ХС и НЭЖК, свидетельствуют о повышении накопления липидов в печени. Это свидетельствует о наличии функциональных нарушений в органе на момент экспериментального исследования, которые могут стать причиной фиброза, портального цирроза печени и другой органической патологии.

**Выводы**

1. Хронический стресс беременных крыс приводит к морфофункциональным нарушениям печени, проявлявшимся выраженной дискомплексацией балочно-радиарного строения, жировой дистрофией гепатоцитов, повышенной регенераторной активностью органа и повышением СПИ в ткани печени, которые могут способствовать развитию фиброза и портального цирроза печени.
2. Изучение маркеров эндотелиальной дисфункции, указывает на выраженное снижение уровня экспрессии эндотелиальной синтазы и свидетельствует о значительном органическом повреждении паренхимы печени беременных крыс, подвергавшихся хроническому стрессовому воздействию.
3. Функциональные изменения печени, выявленные у крыс, находившихся в период беременности в условиях хронического стресса, проявлялись диспротеинемией, гиперлипидемией (повышение уровня ЛПОНП, ЛПНП, ХС, ТГ) и повышением уровня глюкозы. Характер обнаруженных изменений указывает на возможный риск развития инсулинорезистентности (СД II типа).
4. Биохимические показатели гомогенатов ткани печени свидетельствуют о нарушении секреции и обратного захвата липидов, проявлявшемся повышением общего холестерина, НЭЖК и ТГ, а также снижением ФЛ, что свидетельствует о наличии признаков жирового гепатоза.

Список литературы

1. Бабак О. Я. Современная гепатология: достижения, проблемы и перспективы// Сучасна гастроентерологія. 2013. №2 (70). С.12.
2. Zatonski WA et al. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe// Eur Addict Res. 2010. Vol. 16. P.193-201.
3. Depke M., Fusch G., Domanska G., Geffers R., Volker U., Schuett C., Kiank C. Hypermetabolic syndrome, as a consequence, of repeated psychological stress in mice. Endocrinology. 2008. Vol. 149, 6. P. 2714 - 2723.
4. Пат. 82414 Україна МПК A61Д 99/00, G09B 23/28 (2006.01) Спосіб моделювання хронічного іммобілізаційного стресу/ Ніколаєва О.В., Ковальцова М.В., Євтушенко Т.Г.; заявник та патентовласник Харківський національний медичний університет. - № u 2013 03868; заявл. 29.03.2013; опубл. 25.07.2013. Бюл. №14.
5. Constantinof A, Moisiadis VG, Matthews SG. Programming of stress pathways: a transgenerational perspective [published online ahead of print October 22, 2015]. *J Steroid Biochem Mol Biol*. doi: [10.1016/j.jsbmb.2015.10.008](http://10.0.3.248/j.jsbmb.2015.10.008).
6. Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В. Г. и соавт. Нарушение обменных процессов в печени крыс под действием стресса// Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. №2. С. 67-69.
7. Mairesse J., Lesage J., Breton C., et al. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats// Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007. 292. P. E1526-E1533.
8. Марковський В. Д., Сорокіна І. І., Гольєва Н. В., Купріянова Л.С. Гістологічна, гістохімічна і імуногістохімічна техніки: Навчальний посібник для бакалаврів. – Харків: ХНМУ, 2011. – 152с.
9. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. – М.: Медицина, 1990. 384с.
10. Камышников В. С. Методы клинических лабораторных исследований. Москва: «Медипресс-информ», 2016. 736с.

**Влияние хронического иммобилизационного стресса во время беременности на морфофункциональное состояние печени самок крыс в послеродовом периоде**

Изучено морфофункциональное состояние печени (изучены показатели углеводного, белкового, жирового обмена, структурные элементы и состояние эндотелия сосудов печени) самок крыс, подвергавшихся иммобилизационному стрессу во время беременности. Морфологические изменения печени заключались в дискомплексации балочно-радиального строения, пикнозе ядер гепатоцитов, повышении регенераторной активности паренхимы и повышении стромально-паренхиматозного индекса. Функциональные нарушения проявлялись развитием диспротеинемии, гиперлипидемии, гипергликемии и повышением активности органоспецифических ферментов печени. Это свидетельствует о наличии риска развития у животных фиброза и портального цирроза печени, а также сахарного диабета II типа в будущем.

Ключевые слова: морфофункциональное состояние печени, иммобилизационный стресс, беременные крысы.

**Influence of chronic immobilization stress during pregnancy on morphofunctional state of the liver in female rats during postpartum period**

Morphofunctional state of the liver (in particular, indexes of carbohydrate, protein, and fat metabolism, structural elements and condition of vascular endothelium of the liver) in female rats subjected to immobilization stress during pregnancy, has been studied. Morphological changes in the liver include discomplexation of beam-radial structure, pyknosis of hepatocyte nucleus, increased regeneration activity of parenchyma, and increased stromal parenchymal index. Functional disorders are manifested by development of dysproteinemia, hyperlipidemia, hyperglycemia, and increased activity of organo-specific liver enzymes. It testifies to risk of fibrosis and diffuse nodular cirrhosis development in the animals, as well as diabetes mellitus of type II in the future.

Key words: morphofunctional state of the liver, immobilization stress, pregnant rats.

ორსულობის დროს ქრონიკული იმობილიზაციური სტრესის გავლენა

ვირთაგვების დედლების ღვიძლის მორფოფუნქციურ მდგომარეობაზე

მშობიარობის შემდგომ პერიოდში

შესწავლილ იქნა ორსულობის პერიოდში იმობილიზაციური სტრესის ზეგავლენის შედეგად ჩამოყალიბებული ვირთაგვების დედლების ღვიძლის მორფოფუნქციური მდგომარეობა (შესწავლილ იქნა ნახშირწყლების, პროტეინების, ცხიმების ცვლის მაჩვენებლები, სტრუქტურული ელემენტები და ღვიძლის ძარღვთა ენდოთელიუმის მდგომარეობა). დაკვირვების შედეგად იყო აღმოჩენილი ღვიძლის შემდეგი მორფოლოგიური ცვლილებები: კოჭურ-რადიალური აგებულების დისკომპლექტაცია, ჰეპატოციტების ბირთვების პიკნოზე, პარენქიმის რეგენერატორული აქტივობის ზრდა და სტრომალურ - პარენქიმატოზური ინდექსის გაზრდა. ფუნქციური დარღვევები გამოვლინდა დისპროტეინემიის, ჰიპერლიპიდემიის, ჰიპერგლიკემიის განვითარების სახით და ღვიძლის ორგანოსფეციფიკური ფერმენტების აქტივობით. ეს მიუთითებს შემდგომში ცხოველებში ფიბროზისა და პორტალური ციროზის, აგრეთვე, II ტიპის დიაბეტის განვითარების რისკის არსებობაზე.

საკვანძო სიტყვები: ღვიძლის მორფოფუნქციური მდგომარეობა, იმობილიზაციური სტრესი, ორსული ვირთაგვები.