

К. В. Півторак¹, І. А. Мазур², М. А. Волошин²

Ультраструктурна організація ендотеліоцитів печінки за умов корекції стеатозу новою біологічно активною сполукою Ангіолін

¹Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова,²Запорізький державний медичний університет**Ключові слова:** печінки хвороби, гепатоцити, електронна мікроскопія.

Адекватне лікування та профілактика ускладнень неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) є актуальною проблемою сьогодення, що зумовлено невідпинним зростанням захворюваності на НАЖХП у світі. З метою визначення ультраструктурної організації ендотеліоцитів, гепатоцитів при корекції експериментального стеатозу печінки Ангіоліном здійснили дослідження на 70 білих нелінійних щурах-самцях, в яких моделювали стеатоз печінки. Частина тварин (30 щурів) лікували введенням Ангіоліну. Досліджували ультраструктурні зміни гепатоцитів та ендотеліоцитів судин гемомікроциркуляторного русла печінки у тварин контрольної та дослідної груп. Встановили, що при корекції Ангіоліном спостерігалася краща регенерація синусоїдних гемокапілярів і гепатоцитів, кращий стан мікроворсинок з боку плазмолемні васкулярної ділянки гепатоцитів. Нормалізація ультраструктури синусоїдних гемокапілярів покращує гемодинаміку та транскапілярний обмін. Це є свідченням того, що Ангіолін запобігає пошкодженню мембранних органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів і гепатоцитів при НАЖХП, зменшує його та сприяє внутрішньоклітинній регенерації.

Ультраструктурная организация эндотелиоцитов печени в условиях коррекции стеатоза новым биологически активным соединением Ангиолин

Е. В. Пивторак, И. А. Мазур, Н. А. Волошин

Адекватное лечение и профилактика осложненной неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) является актуальной проблемой, что обусловлено непрерывным ростом заболеваемости НАЖБП в мире. С целью определения ультраструктурной организации эндотелиоцитов, гепатоцитов при коррекции экспериментального стеатоза печени Ангиолином проведены исследования на 70 белых нелинейных крысах-самцах, которым моделировали стеатоз печени. Часть животных (30 крыс) лечили введением Ангиолина. У животных контрольной и опытной групп исследовали ультраструктурные изменения гепатоцитов и эндотелиоцитов сосудов гемомикроциркуляторного русла печени. При коррекции Ангиолином наблюдалось улучшение регенерации синусоидных гемокапилляров и гепатоцитов, состояния микроворсинок со стороны плазмолеммы васкулярного участка гепатоцитов. Нормализация ультраструктуры синусоидных гемокапилляров улучшает гемодинамику и транскапиллярный обмен. Это свидетельствует о том, что Ангиолин предупреждает и уменьшает повреждения мембранных органелл, ядерных и плазматических мембран эндотелиоцитов и гепатоцитов при НАЖБП, способствует внутриклеточной регенерации.

Ключевые слова: печени болезни, гепатоциты, электронная микроскопия.**Патология.** – 2015. – №3 (35). – С. 49–52

The ultrastructure of hepatic endothelial cells in the correction of steatosis with new biologically active compound Angiolin

K. V. Pivtorak, I. A. Mazur, M. A. Voloshyn

Aim. To characterize the ultrastructural organization of endothelial cells, hepatocytes in correction of experimental hepatic steatosis with Angiolin.**Methods and results.** Experimental studies were carried out on 70 adult white male rats. The model of liver steatosis was created in 60 rats, some of the animals (30 rats) were treated with Angiolin administration (50 mg per kg of body weight). The animals of control and experimental groups were examined for ultrastructural changes in hepatocytes and endothelial cells of liver hemomicrocirculatory bed vessels. Studies of the ultrastructure of the liver of animals have found that the normalization of the structural components of the organ took place in the correction of steatosis with new biologically active compound Angiolin. Normalization of sinusoidal hemocapillars ultrastructure improves hemodynamics and transcapillary exchange. This fact prevents damage to the hepatocyte nuclei and organelles, facilitates intracellular regeneration.**Conclusion.** Using new biologically active compound Angiolin prevents and reduces the damage of membrane organelles, nuclear and plasma membranes of endothelial cells and hepatocytes.**Key words:** Liver Diseases, Hepatocytes, Electron Microscopy.**Pathologia.** 2015; №3 (35): 49–52

Основним метаболічним порушенням, що лежить в основі неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП), є інсулінорезистентність. На сьогодні встановлений і той факт, що інсулінорезистентність й ендотеліальна дисфункція є тісно асоційованими станами [1]. Механізми розвитку інсулінорезистентності доволі складні та вивчені недостатньо. Наявні дані

показують, що НАЖХП, хоча і вважається проявом метаболічного синдрому, є незалежним фактором ризику для виникнення та прогресування серцево-судинних захворювань [3]. Підвищення рівня гомоцистеїну у крові та посилення утворення великої кількості активних форм кисню призводить до ураження ендотелію, посилення процесів проліферації судинної стінки, згортання крові

[6]. Найважливішою ланкою в ланцюзі механізмів, що призводять до розвитку дефіциту NO та ендотеліальної дисфункції при багатьох патологіях, зокрема і при НАЖХП, є дефіцит концентрації L-аргініну. Корекція ендотеліальної дисфункції при серцево-судинній патології дотепер є одним із найбільш перспективних напрямів лікування та поліпшення прогнозу хвороби в цілому [8].

Аналіз даних літератури щодо зв'язку метаболічних процесів при патології серцево-судинної системи й печінки дає можливість дійти висновку, що при лікуванні НАЖХП необхідне застосування ендотеліопротекторів, котрі потенційно здатні модулювати кардіоваскулярний ризик. У лікуванні при НАЖХП є патогенетично виправданим диференційоване застосування препаратів із вираженими антиоксидантними, протизапальними, мембранопротекторними, імуномодулюючими властивостями, котрі здійснюють позитивний терапевтичний вплив на багато ланок патогенезу захворювання. Нині створений оригінальний препарат з ендотеліопротективною дією шляхом синтезу активної субстанції (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоло-5-тіоацетат (робоча назва Ангіолін), яка поєднує у своїй структурі фрагменти молекул тіотриазоліну і L-лізину есцинату та має високі протиішемічні, кардіопротективні, нейропротективні, антиоксидантні, протизапальні властивості [7]. Внутрішньовенне введення Ангіоліну тваринам з ішемією міокарда призвело до нормалізації співвідношення тіол-дисульфідної системи та системи оксиду азоту в міокарді, а також підвищення активності ендотеліальної NO-синтази, зниження рівня нітротирозину, підвищення рівня відновленого глутатіону й цистеїну, підвищення активності глутатіонредуктази [2]. Застосування біологічно активної сполуки Ангіолін у комплексному лікуванні НАЖХП є раціональним з погляду його впливу на метаболічні процеси, що відбуваються в печінці, та з метою корекції ендотеліальної дисфункції, профілактики серцево-судинних ускладнень.

Мета роботи

Дати характеристику ультраструктурній організації ендотеліцитів, гепатоцитів при корекції експериментального стеатозу печінки біологічно активною сполукою Ангіолін.

Матеріали і методи дослідження

Експериментальні дослідження виконані на 70 білих нелінійних щурах-самцях зрілого віку. Для здійснення експерименту одержали дозвіл комісії з біоетики Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 5 від 27 березня 2014 р.). Утримання тварин та експерименти виконали відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», що ухвалені п'ятим національним конгресом із біоетики (Київ, 2013).

До початку експериментів тварин витримували на карантині протягом 10 діб. У цей період тварини одержували повноцінну стандартну напівсинтетичну крохмально-казеїнову дієту. Надалі тварин поділили на 2 групи: контрольну – 10 щурів, які продовжували перебувати на цій же дієті, та дослідну – 60 тварин, яким створювали модель стеатозу печінки, для чого протягом 8 тижнів утримували на гіперкалорійній дієті з високим вмістом жирів і високим вмістом холестерину, що містила майже 30% жиру (переважно насичені ліпіди) з додаванням холестерину (отримували змішуванням 2 г холестерину та 10 г свинячого сала з 88 г гранул нормального збалансованого раціону) [9]. Після створення моделі стеатозу печінки тварин продовжували утримувати на високожировій дієті, але частині тварин дослідної групи (30 щурів) вводили ще протягом 4 тижнів біологічно активну сполуку Ангіолін у дозі 50 мг/кг маси тіла (доведений розчином Рінгера-Локка до 25 мл/кг) внутрішньочеревинно.

У тварин контрольної та дослідної груп досліджували ультраструктурні зміни гепатоцитів та ендотеліоцитів судин мікроциркуляторного русла печінки. Щурів виводили з досліду шляхом внутрішньо-плеврального введення тіопенталу натрію в дозі 50 мг/кг. Для електронно-мікроскопічного дослідження кусочки печінки фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду на 0,1 г фосфатному буфері та дофіксували в 1% розчині чотириокису осмію на фосфатному буфері, 1% розчині танінової кислоти, зневоднювали в батареї спиртів наростальної концентрації та ацетоні, проводили в сумішах ацетону та епону та заливали в суміш епону й аралдиту. Морфологічні структури контрастували у процесі зневоднення матеріалу насиченим розчином ураніацетату, а на зрізах – цитратом свинцю. Зрізи товщиною 40–60 нм, що отримали на ультрамікроскопі УМТП-7, вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125 К на кафедрі гістології та ембріології ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського».

Результати та їх обговорення

Електронно-мікроскопічні дослідження засвідчили, що при експериментальному стеатозі в печінці (дослідна група, тварини без лікування) на тлі порушення мікроциркуляції розвиваються значні зміни плазматичних, ядерних і внутрішньоклітинних мембран ендотеліоцитів і гепатоцитів. Дестабілізація та деструкція клітинних мембран і мембран органел негативно впливає на метаболічні та функціональні можливості органа [4].

Дослідження субмікроскопічного стану печінки тварин за умов корекції стеатозу біологічно активною сполукою Ангіолін встановили, що будова гепатоцитів у складі часточок і синусоїдних гемокапілярів практично не відрізняється від ультраструктури гепатоцитів тварин інтактної групи. Більшість синусоїдних кровоносних капілярів часточок органа за умов цього експерименту мають притаманну їм будову, у просвітах наявні еритроцити, лейкоцити. Спостерігаються макрофаги, цитоплазма яких включає багато лізосом.

Ультраструктурна організація ендотеліоцитів має типову подовгасту форму. Еліпсоподібні ядра включають каріоплазму, що виконана еухроматином, яка обмежена каріолемою з чіткими ядерними мембранами. Між ними наявний відносно рівномірний перинуклеарний простір, відзначається багато ядерних пор. Ядерна ділянка цитоплазми ендотеліальних клітин включає багато невеликих за розмірами органел, котрі мало змінені. Дещо розширені каналця гранулярної ендоплазматичної сітки та просвітлений матрикс окремих мітохондрій.

Вузькі цитоплазматичні ділянки ендотеліоцитів мають добре виражені перфорації. У просторах Діссе спостерігаються численні мікрворсинки, що добре контуровані (рис. 1).

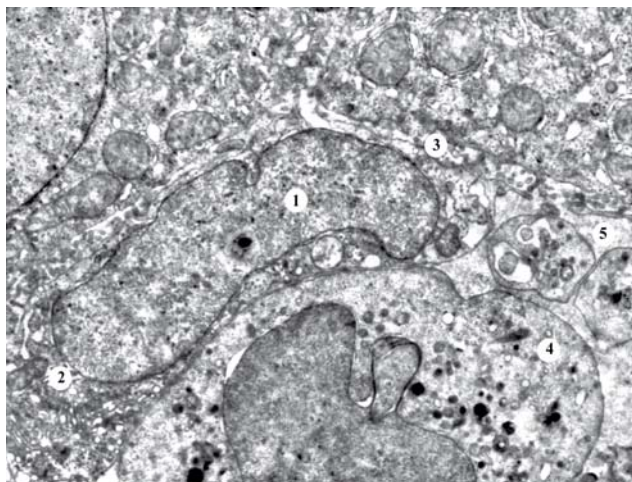


Рис. 1. Субмікроскопічний стан гемокапіляра у складі часточки печінки тварини за умов корекції стеатозу біологічно активною сполукою Ангіолін. Ядро (1) і цитоплазма (2) ендотеліоцита, простір Діссе (3), макрофаг (4) у просвіті капіляра (5). x 14 000.

Електронно-мікроскопічно в гепатоцитах часточок спостерігаються круглої форми ядра, що мають чіткі контури ядерних мембран, невеликі перинуклеарні простори та багато ядерних пор. У каріоплазмі переважає еухроматин, наявні рибосомальні гранули. У частині ядер спостерігаються великі ядерця. Цитоплазма гепатоцитів має багато добре структурованих органел.

Субмікроскопічно в помірної електронної щільності гіалоплазмі гепатоцитів наявні пласкі або помірно потовщені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, на поверхні їхніх мембран багато рибосом. Округлої або овальної форми мітохондрії мають переважно середні розміри. Їхні зовнішні мембрани та кристи чіткі, мітохондріальний матрикс помірно осміофілії. Грудок глікогену в цитоплазмі багато, розташовані зонально. Відзначаються невеликі осміофільні первинні лізосоми й окремі, що більші за розмірами, – вторинні.

Список літератури

1. Денисюк В.І. Ендотеліальна дисфункція та інсулінорезистентність у пацієнтів з артеріальною гіпертензією - «дві сторони однієї медалі» / В.І. Денисюк, Г.І. Хребтій // *Consilium Medicum Ukraina*. – 2011. – №5. – С. 3–5.

У біліарних полюсах гепатоцитів розташовані жовчні капіляри з невеликими просвітами, в яких є добре оконтуровані мікрворсинки. Десмосомальні та щільні контакти обмежують їхні просвіти (рис. 2).

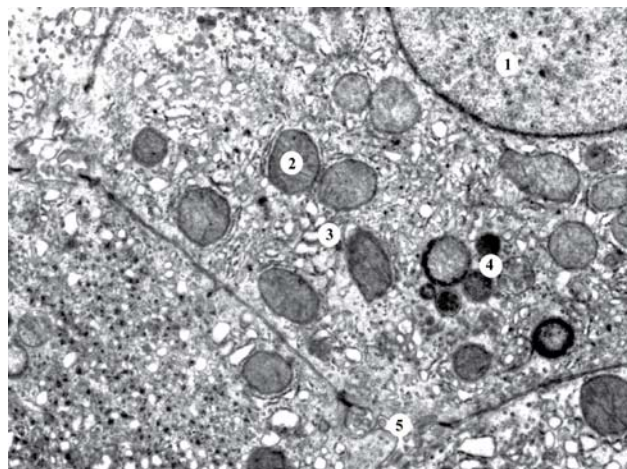


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцита часточки печінки тварини за умов корекції стеатозу біологічно активною сполукою Ангіолін. Фрагмент ядра (1), мітохондрія (2), каналці гранулярної ендоплазматичної сітки (3), лізосоми (4), жовчний капіляр (5). x 17 000.

Порівнявши ступінь зворотних ультраструктурних змін ендотеліоцитів і гепатоцитів за умов корекції стеатозу біологічно активною сполукою Ангіолін у дозі 50 мг на кг маси тіла та при застосуванні протягом 4 тижнів гепатопротектора адеметіоніну в дозі 72 мг/кг маси тіла [5], встановили, що обидва препарати запобігають пошкодженню структурних компонентів часточок печінки. Поряд з тим відзначені деякі відмінності. Так, при корекції Ангіоліном спостерігали кращу регенерацію синусоїдних гемокапілярів і гепатоцитів, кращий стан мікрворсинок із боку плазмалеми васкулярної ділянки гепатоцитів.

Висновки

1. Дослідження ультраструктури печінки тварин за умов корекції стеатозу біологічно активною сполукою Ангіолін дали змогу встановити, що відбувається нормалізація структурних компонентів часточок органа.

2. Використання Ангіоліну запобігає та зменшує пошкодження мембранних органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів і гепатоцитів.

3. Нормалізація ультраструктури синусоїдних гемокапілярів поліпшує гемодинаміку та транскапілярний обмін. Це запобігає ушкодженню ядер і органел гепатоцитів, сприяє внутрішньоклітинній регенерації.

Перспективи подальших досліджень передбачають вивчення впливу Ангіоліну на функцію ендотеліоцитів, виділення біологічно активних речовин, котрі продукуються ендотелієм: вазоконстриктори, вазодилататори, речовини, що впливають на гемостаз і фібриноліз.

2. Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції та пошук ендотеліопротекторів / Ю.М. Колесник, І.С. Чекман, І.А. Мазур та ін. // *Журнал НАМН України*. – 2014. – Т. 20. – №3. – С. 289–299.

3. Колесникова Е.В. Современный пациент с заболевани-

- ем печени и патологией сердечно-сосудистой системы: какой выбор сделать? / Е.В. Колесникова // Сучасна гастроентерологія. – 2014. – №2(76). – С. 85–94.
4. Півторак К.В. Електронно-мікроскопічні зміни печінки при експериментальному стеатозі / К.В. Півторак // Вісник морфології. – 2015. – Т. 21. – №1. – С. 69–72.
 5. Півторак К.В. Субмікроскопічний стан печінки при корекції стеатозу гепатопротектором амінокислотного походження / К.В. Півторак // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 3. – Т. 2(123). – С. 310–313.
 6. Особливості лікування неалкогольного стеатогепатиту у хворих на цукровий діабет / Н.В. Харченко, Г.А. Анохіна, В.В. Харченко та ін. // Сучасна гастроентерологія. – 2011. – №2(58). – С. 60–64.
 7. Belenichev I.F. The endothelium-protective effect of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate(S)-2,6-diaminohehexanic acid (Lysinium: Effects on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the characteristics of the endotheliocytes of the cerebral vessels of animals with cerebral ischemia / I.F. Belenichev, I.A. Mazur, N.V. Bukhtiyarova // *Neurochem. J.* – 2013. – Vol. 7. – №4. – P. 296–303.
 8. Fargion S. Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art / S. Fargion, M. Porzio, A.L. Fracanzani // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – №37. – P. 13306–13324.
 9. Kucera O. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats / O. Kucera, Z. Cervinkova // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20. – №26. – P. 8364–8376.
- References**
1. Denysiuk, V. I., & Khrebtii, H. I. (2011) Endotelialna dysfunktsiia ta insulinorezistentnist u patsiientiv z arterialnoiu hipertenziieiu – «dvi storony odniiei medalii» [Endothelial dysfunction and insulin resistance in patients with hypertension – «two sides of the same coin»]. *Consilium Medicum Ukraina*, 5, 3–5. [in Ukrainian].
 2. Kolesnyk, Yu. M., Chekman, I. S., Mazur, I. A., Belenichev, I. F., Horchakova, N. O., & Nahorna, O. O. (2014) Mekhanismy rozvytku endotelialnoi dysfunktsii ta poshuk endotelioptektoriv [Mechanisms of development of endothelial dysfunction and search for endothelioprotectors]. *Zhurnal NAMN Ukrainy*, 20(3), 289–299. [in Ukrainian].
 3. Kolesnikova, E. V. (2014) Sovremennyyi pacient s zabol-evaniem pecheni i patologiej serdechno-sosudistoj sistemy: kakoj vybor sdelat'/? [The modern patient with liver disease and pathology of cardiovascular system: what choice to make?]. *Suchasna gastroenterolohiia*, 2(76), 85–94. [in Ukrainian].
 4. Pivtorak, K. V. (2015) Elektronno-mikroskopichni zminy pechinky pry eksperymentalnomu steatozi [Submicroscopic changes in experimental hepatic steatosis]. *Visnyk morfolohii*, 21(1), 69–72. [in Ukrainian].
 5. Pivtorak, K. V. (2015) Submikroskopichni stan pechinky pry korektsii steatozu hepatoprotektorom aminokyslotnoho pokhodzhennia [Submicroscopic State of the Liver in the Correction of Steatosis Using the Hepatoprotector of Amino Acid Origin]. *Visnyk problem biologii i medytsyny*, 3, 2(123), 310–313. [in Ukrainian].
 6. Kharchenko, N. V., Anokhina, H. A., Kharchenko, V. V., Opanasiuk, N.D., Lopukh, I. Ya., & Korulia, I. A. (2011) Osoblyvosti likuvannia nealkoholnoho steatohepatytu u khvorykh na tsukrovyyi diabet [Peculiarities of the treatment of non-alcoholic steatohepatitis in patients with diabetes mellitus]. *Suchasna gastroenterolohiia*, 2(58), 60–64. [in Ukrainian].
 7. Belenichev, I. F., Mazur, I. A., & Bukhtiyarova, N. V. (2013) The endothelium-protective effect of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate(S)-2,6-diaminohehexanic acid (Lysinium: Effects on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and the characteristics of the endotheliocytes of the cerebral vessels of animals with cerebral ischemia. *Neurochem. J.*, 7(4), 296–303.
 8. Fargion, S., Porzio, M., & Fracanzani, A. L. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art. *World J. Gastroenterol.*, 20(37), 13306–13324. doi: 10.3748/wjg.v20.i37.13306.
 9. Kucera, O., & Cervinkova, Z. (2014) Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J. Gastroenterol.*, 20(26), 8364–8376. doi: 10.3748/wjg.v20.i26.8364.

Відомості про авторів:

Півторак К. В., к. мед. н., доцент каф. клінічної фармації та клінічної фармакології, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова, E-mail: ek3727@gmail.com.

Мазур І. А., д. фарм. н., професор каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет.

Волошин М. А., д. мед. н., професор, зав. каф. анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії, Запорізький державний медичний університет.

Сведения об авторах:

Пивторак Е. В., к. мед. н., доцент каф. клинической фармации и клинической фармакологии, Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова, E-mail: ek3727@gmail.com.

Мазур И. А., д. фарм. н., профессор каф. фармацевтической химии, Запорожский государственный медицинский университет.

Волошин Н. А., д. мед. н., профессор, зав. каф. анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии, Запорожский государственный медицинский университет.

Information about authors:

Pivtorak K. V., MD, PhD, Associate Professor, Department of Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology, Vinnytsya National Medical University n.a. M.I. Pirogov, E-mail: ek3727@gmail.com.

Mazur I. A., MD, PhD, DSci., Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University.

Voloshin M. A., MD, PhD, DSci., Professor, Head of the Human Anatomy, Operative Surgery and Topographic Anatomy, Zaporizhzhia State Medical University.

Надійшла в редакцію 17.09.2015 р.