

УДК 616-003.826+616-02/611-018.54+591.4+616.36-002.08

СПЕКТР ЖИРНИХ КИСЛОТ СИРОВАТКИ КРОВІ ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНИМИ ДИФУЗНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПЕЧІНКИ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ЕТІОЛОГІЇ ТА МОРФОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ

Степанов Ю.М., Діденко В.І., Кленіна І.А., Карачинова В.А., Ошмянська Н.Ю.

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро, Україна

Вступ. Патологія печінки займає провідне місце серед хвороб органів травлення. Кожного року в країнах СНД реєструється від 500 тис. до 1 млн людей, які страждають на захворювання даного органу. В Україні за останні 10 років розповсюдженість цих захворювань збільшилась на 20,1% [1, 2]. Серед них – хронічні дифузні захворювання печінки (ХДЗП) різної етіології, які протікають з достатньо неспецифічними клінічними проявами [2, 3, 4]. Спектр структурних порушень при ХДЗП також значно варіює в залежності від нозології: від доброякісного накопичення печінкових тригліцеридів (ізолюваний стеатоз) до запалення та некрозу гепатоцитів – стеатогепатиту, а з часом – до цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) [5, 6, 7]. Вважається, що ХДЗП найближчим часом стане найчастішим показником до трансплантації печінки в світі [8, 9].

Вже доведено, що порушення синтезу та утилізації вільних жирних кислот виступає однією з причин формування ХДЗП та інших захворювань печінки, пов'язаних з порушенням обміну ліпідів (рис. 1).



Рис. 1 – Патофізіологічний шлях розвитку ХДЗП (стеатозу та стеатогепатиту).

Дослідження на тваринах та клінічні спостереження підтверджують концепцію, згідно якій пошкодження гепатоцитів, характерне для ХДЗП, обумовлюється надлишком первинних метаболічних субстратів (глюкози, фруктози та жирних кислот) у печінці, внаслідок чого жирні

кислоти впливають на біохімічні шляхи, що призводять до пошкодження клітин [6, 7]. Різні аспекти цих шляхів, що ведуть до стеатогепатиту, потенційно, варіюватимуть у пацієнтів в залежності від етіології захворювання, наявності ожиріння або діабету, але в результаті однаково призведуть до ускладнень [8].

До 25% всіх випадків хронічних захворювань печінки пов'язано з вживанням алкоголю. ХДЗП як алкогольного, так і неалкогольного генезу характеризується підвищенням відкладення тригліцеридів в гепатоцитах внаслідок надлишкового накопичення вільних жирних кислот (ВЖК) в печінці та/чи їх підсиленого синтезу органом із ацетил-коензиму А (ацетил-КоА), особливо при недостатку останнього. Продукція тригліцеридів в гепатоциті прямо залежить від вмісту в ньому жирних кислот, ацетил-КоА та глюкози, яка в процесі гліколізу перетворюється в фосфатидну кислоту, що запускає синтез тригліцеридів. По мірі накопичення жиру гепатоцити стають більш чутливими до токсичного впливу та втрачають свої функціональні властивості [10]. Головну роль в накопиченні жиру в гепатоциті на тлі споживання алкоголю відіграє ацетальдегід – основний токсичний продукт метаболізму етанолу. В процесі окиснення етанолу відмічається підвищене використання коферменту НАД⁺, який приєднуючи протон, відновлюється до НАДН⁺. Підвищення відновленої форми НАДН⁺ при систематичному вживанні алкоголю знижує активність основних ферментів ліпооксигеназного шляху, які забезпечують транспорт жирних кислот у мітохондрії, зменшує їх внутрішньомітохондріальне окиснення, що призводить до вираженого порушення метаболізму жирів, накопиченню в клітинах печінки тригліцеридів та розвитку стеатозу [9,10].

Сучасні функціональні методи діагностики (якісні показники стеатозу) не завжди відображають реальну картину. Серед них магнітно-резонансна спектроскопія – найбільш точний метод кількісного визначення стеатозу, проте найбільш затратний, тому біопсія печінки, є єдиним тестом, який дозволяє вірогідно встановити діагноз і залишається «золотим стандартом» оцінки тяжкості стеатозу, але є випадки в яких виконання біопсії не рекомендується [2].

Газова хроматографія на сьогодні є єдиним методом, що дозволяє визначити жирнокислотний склад у біологічних субстратах. Перевага цього методу полягає у швидкості виконання і високій чутливості методу, завдяки чому можливо виявити найменші концентрації сполук у дослідному зразку (до 10^{-12} моль). Впровадження цього методу в клінічну практику лікарів дозволяє діагностувати захворювання печінки на ранньому етапі розвитку та коригувати виявлені порушення [11].

Жирнокислотний склад сироватки крові пацієнтів зі стеатозом характеризується зниженням загального вмісту ВЖК за рахунок дефіциту ненасичених жирних кислот. В сукупності з морфологічними методами досліджень, використання довголанцюгових ВЖК для

діагностування захворювань, пов'язаних з порушенням структури, функцій та в'язкості гепатоцитів, відкриває можливість для розкриття патогенезу ХДЗП з метою підвищення диференційованої діагностики та ефективності лікування виявлених порушень [12].

Мета роботи – оцінка вільних жирних кислот у сироватці крові пацієнтів з ХДЗП в залежності від її етіології та морфологічних особливостей, визначення ролі цих змін у прогресуванні патології печінки.

Методи та методики дослідження. Обстежено 66 пацієнтів з ХДЗП, середній вік ($59,2 \pm 2,4$) років. Всі обстежені хворі були розподілені на групи в залежності від етіологічних факторів при формуванні та прогресуванні стеатозу та фіброзу печінки: I – неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП, $n=38$); II – хронічний гепатит, асоційований з вірусом «С» (ХГС) ($n=13$); III – алкогольна хвороба печінки (АХП, $n=15$). Серед обстежених пацієнтів жінок було 46%, а чоловіків – 54%.

За допомогою методики черезшкірної пункційної трепан-біопсії печінки у кожного пацієнта взято 3 стовбчики тканини з VII сегменту правої долі органу. Цю методику виконували під безперервним ультразвуковим контролем під місцевою анестезією напівавтоматичною голкою «Colt Shot» 16 G. Для гістологічних досліджень біоптати фіксували в 10,0% розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і заливали в парафін (за загальноприйнятим в морфологічній практиці методом). Гістологічні зрізи товщиною 3-5 мкм фарбували гематоксиліном і еозином та за Маллорі в модифікації Слінченко [13].

Для проведення комп'ютерної морфометрії біоптати фотографували і здійснювали вимірювання за допомогою програми ImageJ 1.45S (розроблена в «National Institutes of Health», USA). Комп'ютерний індекс фіброзу – це отримане на цифровому зображенні співвідношення площі колагену до загальної площі біоптату. Напівтонкі зрізи отримували за допомогою ультратому УМТП-7 з використанням скляних ножів. Гістологічні зрізи товщиною 1 мкм фарбували толуїдиновим синім. Дослідження напівтонких зрізів проводили методом високороздільної світлової мікроскопії (імерсійне масло, об'єктив $\times 100$). Отримані данні доповнювали інформаційну картину, отриману при вивченні парафінових зрізів.

Хроматографічне дослідження ВЖК у сироватці крові було проведено з використанням апаратно-програмного комплексу для медичних досліджень на базі газового хроматографу «ХРОМАТЕК-КРИСТАЛЛ 5000».

Обладнання. Газовий хроматограф з полум'яно-іонізаційний детектором. Кварцева капілярна колонка (RESTEK) довжиною 60 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, нерухома фаза типу FFAP і товщиною плівки 0,25 мкм.

Режим приладу при проведенні досліджень. Ізотермічна температура термостату становила 140° С, температура випаровувача і детектора – 230° С. Газ-носії – азот, з тиском на вході до колонки 1,8 атм. Витрати газу-носія 2 мл/хв, водню – 25 мл/хв, повітря – 300 мл/хв. Співвідношення потоків газу-носія на викид і до колонки – 50:1. Ідентифікацію фракцій вільних жирних кислот проводили згідно стандартів метильованих жирних кислот фірми «RESTEK».

КОН-метильовання ліпідів в біологічних субстратах, які містять воду (сироватка крові, гомогенат і т.і.). До 0,14 мл проби додавали 2 мл гексану (30° С) і 0,28 мл КОН (1 М в 70% метанолі, 30° С), пробірки перемішували впродовж 2,5 хв. і витримували на водяній бані при 30° С впродовж 20 хв., періодично помішуючи. Реакцію зупиняли 0,03 мл оцтової кислоти. Метильовані жирні кислоти, які знаходились в гексановому шарі, аналізувались на газовому хроматографі. При малій кількості проби: до 28 мкл додавали 0,5 мл гексану і 56 мкл КОН (1 М в 70% метанолі, 30° С) і проводили всі процедури описані вище [14]. Групу контролю склали відносно здорові особи (n=7).

Для статистичного аналізу даних використовували дескриптивну статистику; порівняння середніх значень перемінних здійснювали за допомогою параметричних методів (t-критерію Стьюдента) за нормального розподілу даних ознак, виражених в інтервальній шкалі. Відповідність виду розподілу ознак закону нормального розподілення перевіряли за допомогою методу Шапіто-Уїлка. В інших випадках використовували непараметричний метод (U-критерій Мана-Уїтні). Всі розрахунки виконували у програмі SPSS 9.0 for Windows [15]. Всі засоби виміральної техніки, які використовувались при виконанні роботи мали метрологічну повірку в установленому порядку.

РЕЗУЛЬТАТИ. Морфологічна картина в I групі пацієнтів представляла собою осередки крупнокрапельної жирової дистрофії на тлі відсутності фіброзу або тонких фіброзних септ та незначного накопичення клітин запалення. Для II групи пацієнтів були характерні найбільш виражені показники запалення та активності гепатиту: інфільтрація портальних трактів від помірної до вираженої, інтрачасточкова інфільтрація, вогнища некрозу гепатоцитів, збільшення кількості лімфоїдних фолікулів та жирова дистрофія, яка найчастіше супроводжувала помірне фіброзування, та в більшості випадків представляла собою осередки дрібнокрапельного або змішаного стеатозу, що розташовані всередині часточок і не зачіпають прикордонну пластинку. Морфологічна картина в III групі пацієнтів характеризувалась в першу чергу значною дезорганізацією ліпідних включень та помітними змінами гістологічної структури, як за рахунок запалення, так гідропічної дистрофії гепатоцитів (рис. 2).

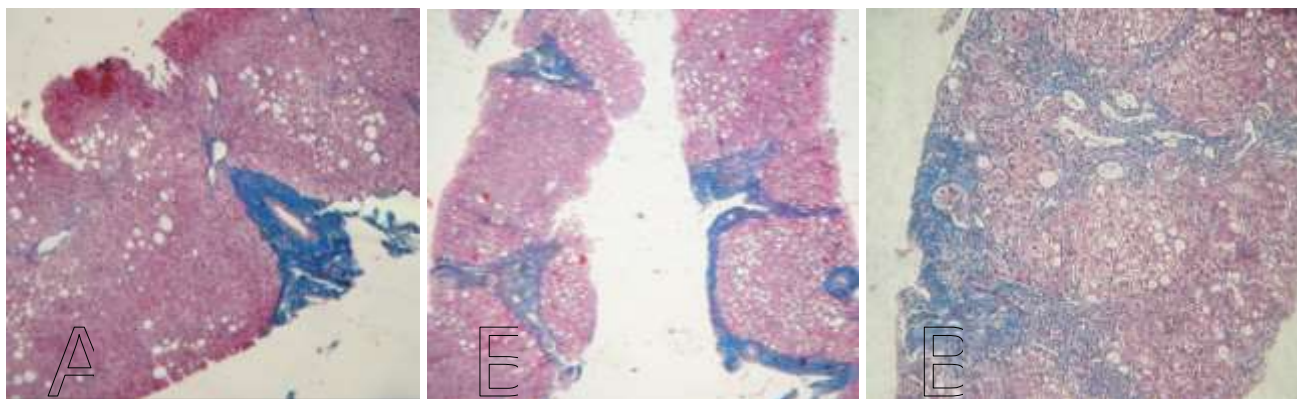


Рис. 2. А) Перипортальний фіброз без септ (F1 за Metavir) за умов розвитку НАЖХП. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченка, зб. X200; Б) Локалізована крупно- та середньокрапельна жирова дистрофія на тлі щільного перипортального фіброзу (F3 за Metavir) за умов розвитку ХГС. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченка, зб. x100; В) Багаточисленні фіброзні септи (F3 за Metavir) та помірна активність гепатиту за умов розвитку АХП. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченка, зб. x200.

При біохімічному дослідженні спектру ВЖК у сироватці крові пацієнтів з ХДЗП нами було ідентифіковано більше 20 фракції, серед яких 5 основних насичених жирних кислот (міристинова C14:0, пентодеканова C15:0, пальмітинова C16:0, стеаринова C18:0) та 4 основних ненасичених жирних кислот (олеїнова C18:1, лінолева C18:3, арахідонова C20:4) (табл. 1).

Незалежно від етіологічного фактору, розвиток ХДЗП супроводжувався статистично значущим підвищенням вмісту пальмітинової та олеїнової жирних кислот с сироватці крові, порівняно з контролем. В усіх групах хворих сумарний вміст ВЖК у сироватці крові був підвищений: в I групі – в 21,2 рази до ($5,528 \pm 0,967$ мкг/мкл, $p < 0,001$); в II групі – в 23 рази до ($5,987 \pm 3,109$ мкг/мкл, $p < 0,001$), в III групі – в 45,5 рази до ($11,83 \pm 6,19$ мкг/мкл, $p < 0,01$) у порівнянні з групою контролю ($0,26 \pm 0,09$ мкг/мкл) (табл. 1).

Для пацієнтів з I та II групи було характерним вірогідне підвищення вмісту найбільш токсичної фракції – пальмітинової (C16:0) відповідно на 22,2% ($p < 0,05$) та на 20,8% ($p < 0,05$) відносно контролю (табл. 1). При цьому, більшість морфологічних показників, пов'язаних із запаленням, були найменш вираженими в I групі пацієнтів (рис. 3А).

Так, дифузна інфільтрація портальних трактів в I групі пацієнтів зустрічалася вірогідно рідше – в 9,1% випадків, у порівнянні з 43,75% випадків в II групі та 37,5% випадків в III групі; осередки некрозу та лімфоїдні фолікули також зустрічались вірогідно рідше, ніж у пацієнтів з ХГС.

З чим же в такому випадку пов'язане збільшення токсичної фракції? На нашу думку, таке збільшення може пояснюватися у томи числі й розповсюдженою гідропічною дистрофією

гепатоцитів, яка зустрічалася в цій групі пацієнтів частіше за інші – в 54,5% випадків, у порівнянні з 18,75% випадків в II групі та 25,0% випадків в III групі.

Таблиця 1 – Спектр вільних жирних кислот сироватки крові у пацієнтів з хронічними дифузними захворюваннями печінки

№ з/п	Біохімічний показник	Групи			
		Контрольний показник, (n=7) мкг/мкл	I (n=38)	II (n=13)	III (n=15)
			M±m	M±m	M±m
1	Бутират C4:0	2,63±0,84	5,34±1,18	5,653±2,88	5,354±3,632**
2	Капроат C6:0	0,07±0,02	0,809±0,297*	0,654±0,389	1,397±0,528*
3	Каприлат C8:0	0,51±0,07	1,926±0,761*	1,983±0,816	8,118±5,245
4	Додеканоат C12:0	0,002±0	0,012±0,005	0,004±0,003	0,005±0,002
5	Тридеканоат C:13	0	0,002±0,00	0,002±0	0,001±0
6	Мірилат C14:0	0	0,008±0,005	0,014±0,013	0,067±0,057
7	Пентадеканоат C15:0	0,02±0,003	0,022±0,006	0,006±0,003*	0,007±0,002**
8	Пентадеканоат C15:1 (cis-10)	0	0,008±0,004	0,008±0,006	0,003±0,002
9	Пальмітат C16:0	0,001±0	0,004±0,001*	0,034±0,028*	0,016±0,006
10	Пальмітолеат C16:1 (cis-9)	0,001±0	0,003±0,001	0,004±0,001	0,003±0,00
11	Гептадеканоат C17:0	0,016±0,003	0,024±0,007	0,036±0,026	0,029±0,01
12	Гептадеканоат C17:1 (cis-10)	0,0012±0,00	0,005±0,002	0,005±0,004	0,008±0,004
13	Стеарат C18:0	0,04±0,01	0,052±0,018	0,008±0,003	0,009±0,004
14	Олеат C18:1 (cis-9)	0,007±0,002	0,013±0,005	0,012±0,006	0,062±0,001**
15	Октадеканоат C18:1 (trans-9)	0,003±0,001	0,015±0,009	0,016±0,01	0,044±0,035
16	Лінолеат C18:2 (cis-9,12)	0	0,007±0,003	0,02±0,017	0,011±0,005
17	Лінолеат C18:2 (trans-9,12)	0,015±0,004	0,135±0,074	0,114±0,075	0,059±0,048
18	Ліноленат C18:3(cis-9,12,15)	0,13±0,07	0,368±0,131	0,517±0,336	0,765±0,202
19	Арахідат C20:0	0	0,014±0,006	0,058±0,047	0,083±0,075
20	Ейкозеноат C20:1 (cis-11)	0,009±0,001	0,175±0,145	0,195±0,182	0,031±0,024
21	Генеїкозаноат C21:0	0,04±0,01	0,68±0,576	0,113±0,063	0,295±0,099*
22	ВЖК	0,26±0,09	5,528±0,967***	5,987±3,109***	11,83±6,19**

Примітка: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 - вірогідність змін між показниками хворих, в порівнянні з групою контролю.

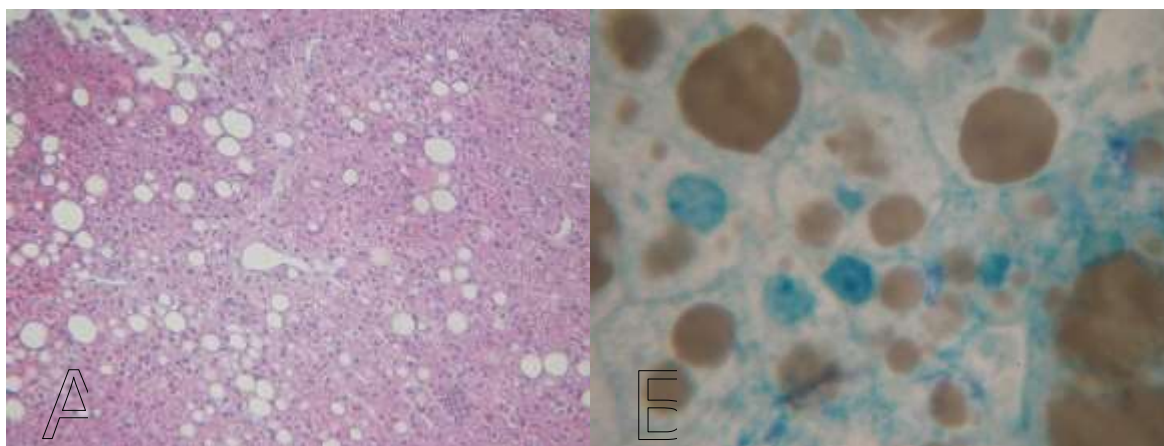


Рис. 3. – Крупнокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів, характерна для пацієнтів I групи. А) Стеатоз без ознак запалення, на тлі портального фіброзу без септ. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченка, зб. х200. Б) Гомогенні ліпідні включення темно-янтарного кольору. Напівтонкий зріз печінки хворого на НАЖХП. Фарбування толуїдиновим синім, зб. Х1000.

Крім цього, у пацієнтів I групи відбувалося підсилення синтезу пентадеканової кислоти (C15:1) з більш низькомолекулярних попередників. Це можна пояснити тим, що при формуванні НАЖХП відбувається перебудова метаболічних шляхів з активним використанням пропіонату, який є субстратом не тільки для синтезу жирних кислот з непарним числом атомів вуглецю, а й для утворення амінокислот (глутамату, аспартату, глутаміну), азотистих основ фосфоліпідів. На мікроструктурному рівні дисліпідемія характеризується наявністю великих гомогенних (простих за складом) жирових крапель в цитоплазмі гепатоцитів. За допомогою методики напівтонких зрізів були локалізовані ці ліпідні включення темно-янтарного кольору, які рівномірно заповнювали всю цитоплазму гепатоцитів (рис. 3Б).

На відміну від цього, для II групи пацієнтів були характерні найбільш виражені показники запалення та активності гепатиту: інфільтрація портальних трактів від помірної до вираженої, інтрачасточкова інфільтрація, вогнища некрозу гепатоцитів (рис.4А).

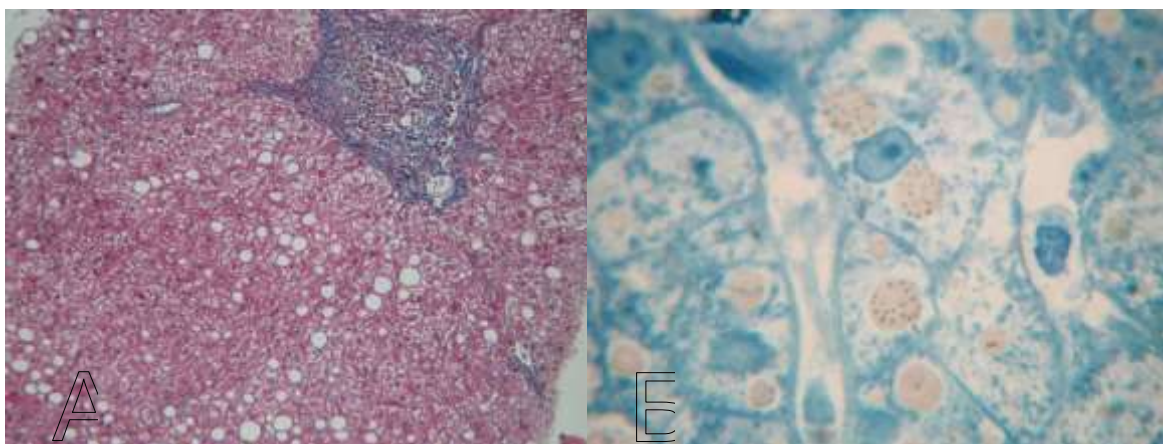


Рис. 4. – Жирова дистрофія гепатоцитів, характерна для пацієнтів II групи. А) Характерна локалізація ліпідних крапель, перипортальне запалення та фіброзування. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченка, зб. х200; Б) Гетерогенність ліпідних крапель, інкрустація ліпідних включень ліпідами високої щільності. Напівтонкий зріз печінки, фарбування толуїдиновим синім.

Необхідно зазначити, що збільшення кількості лімфоїдних фолікулів – яке є ознакою персистенції ХГС – вірогідно частіше зустрічалось в цій групі, у порівнянні з 12,5% випадків в III групі пацієнтів, та зовсім не зустрічалось в I групі. Вірогідна різниця між досліджуваними групами проявлялась і у частоті виявлення адгезії лімфоцитів та нейтрофільних лейкоцитів в синусоїдах. У досліджуваних препаратах напівтонких зрізів паренхіми печінки пацієнтів II групи адгезія нейтрофільних лейкоцитів в синусоїдах була виявлена в 31,25% випадків, а адгезія лімфоцитів – в 75,0%, у той час, як I групі пацієнтів адгезія нейтрофільних лейкоцитів була виявлена в 9,1% випадків, а адгезія лімфоцитів – в 27,3%.

Зміни в спектрі ненасичених жирних кислот при ХДЗП характеризувалися накопиченням моноєнових жирних кислот за рахунок зростання частки пальмітолеїнової кислоти (C16:1) в I групі пацієнтів в 1,8 разів, в II групі – в 1,7 разів та в III групі – в 8,8 разів, а також зниженням вмісту полієнових кислот, що виникало лише завдяки відсутності фракції жирної кислоти C20:4. Отже, треба зазначити, що II група пацієнтів характеризувалася менш вираженими, але більш різноманітними змінами ліпогенезу. Це підтверджується також і тим, що дослідження біоптатів методикою напівтонких зрізів дозволило продемонструвати гетерогенність складу ліпідних крапель в гепатоцитах, а також гетерогенність їх розміру. Так, за допомогою методики напівтонких зрізів в II групі пацієнтів були виявлені ліпідні краплі янтарного кольору, дрібні та середні ліпідні краплі бурого кольору, та дуже дрібні прозорі краплі, які рівномірно заповнювали цитоплазму гепатоцитів. В ліпідних краплях великого розміру спостерігалась інкрустація ліпідами більш високої щільності, що характеризувалась більш темним кольором (рис. 4Б).

В III групі пацієнтів спостерігалися найбільш помітні зміни морфологічної будови здебільшого за рахунок дезорганізації будови, запалення, апоптозу та некрозу гепатоцитів, осередкової жирової дистрофії гепатоцитів (рис. 5). Також у пацієнтів цієї групи виявлено й вірогідне підвищення пальмітинової (C16:0) та олеїнової (C18:1) кислот.

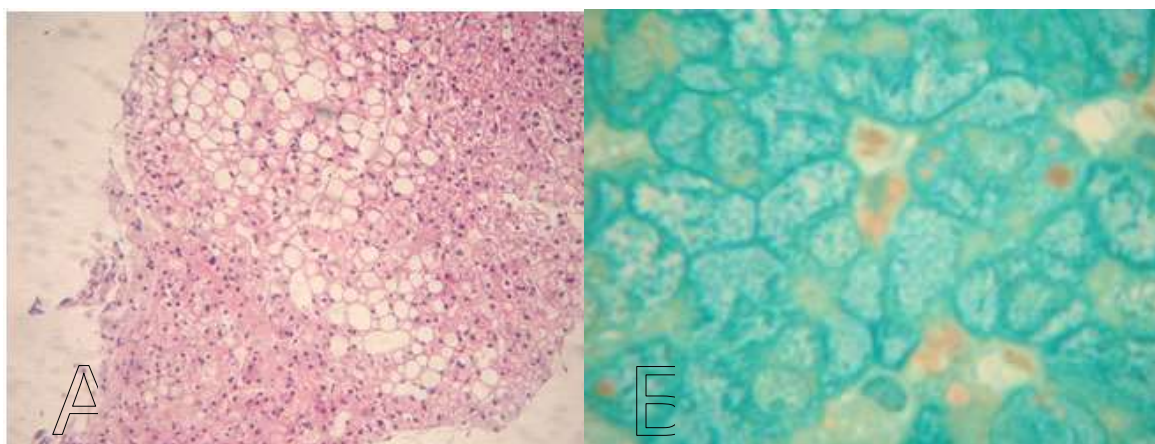


Рис. 5. – Жирова дистрофія гепатоцитів, характерна для пацієнтів III групи. А) На тлі поширеної білкової дистрофії осередки крупно-среднекапельного стеатозу займають до 30% біоптату. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб. $\times 200$; Б) Ліпідні краплі поряд із загиблими гепатоцитами. Напівтонкий зріз печінки, фарбування толуїдиновим синім.

З метою об'єктивізації результатів, було проведено послідовне морфометричне дослідження біоптатів з підрахунком індексу фіброзу (відношення площі фіброзної тканини до загальної площі біоптату), індексу стеатозу (кількість гепатоцитів в стані жирової дистрофії на 100 клітин) та кількості апоптотично змінених клітин в 5-ти послідовних великих полях зору.

Морфометричне дослідження показало, що індекс стеатозу був найвищим в I групі пацієнтів – $(0,36 \pm 0,11)$, що підтверджує дані морфологічного дослідження щодо розповсюдженості жирової дистрофії, при цьому індекс фіброзу був найменшим та склав $(0,0443 \pm 0,011)$. В II групі пацієнтів було зафіксовано найбільш значні коливання індексу стеатозу із середнім значенням $(0,23 \pm 0,09)$, у той час, як індекс фіброзу склав $(0,0812 \pm 0,06)$. III група пацієнтів вірогідно відрізнялась від I групи за індексом фіброзу $(0,1266 \pm 0,013)$ та стеатозу $(0,2289 \pm 0,15)$, при цьому ці показники в даній групі були найвищими.

При розрахунку коефіцієнтів співвідношення окремих фракцій жирних кислот було виявлено зниження k_1 в групах пацієнтів: I – в 1,4 рази; II – в 8,5 разів; III – в 38,0 разів, що свідчить про зниження активності основного ферменту ліпооксигеназного шляху $\Delta 9$ -десатурази та, як наслідок, зниження клітинного росту та диференціації за рахунок її впливу на текучість мембран та сигнальної трансдукції (рис. 5). Було виявлено зниження k_2 в I групі пацієнтів в 1,3 рази, в II групі – в 8,3 рази та в III групі – в 5,3 рази, в порівнянні з контролем, що може свідчити про зниження активності $\Delta 6$ -десатурази.

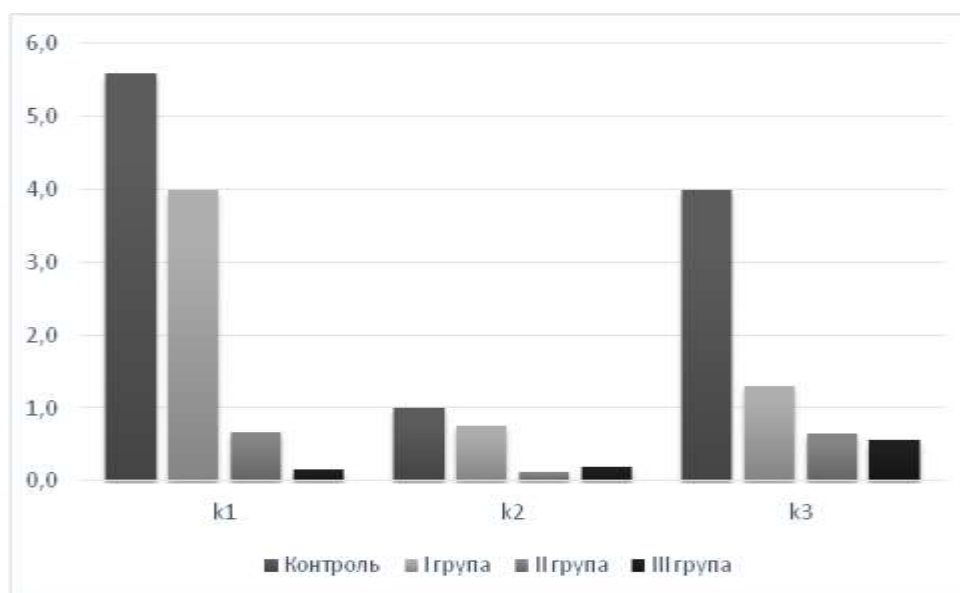


Рис. 5. – Коефіцієнти співвідношення фракцій вільних жирних кислот ліпідного екстракту сироватки крові.

Примітка: $k1$ – співвідношення концентрацій стеаринової кислоти до олеїнової (C18:0/C18:1); $k2$ – співвідношення концентрацій пальмітолеїнової кислоти до пальмітинової (C16:1/C16:0), $k3$ – співвідношення концентрацій стеаринової кислоти до пальмітинової (C18:0/C16:0).

Про недостатню активність ферменту елонгази свідчило зниження $k3$ в I групі – в 3 рази, в II групі – 6,0 разів та III групі – в 7,0 разів, в порівнянні з контролем, що відображає зниження активності синтезу ненасичених жирних кислот у пацієнтів всіх груп (рис 5).

Таким чином, для пацієнтів з НЖХП є характерними багаточисельні морфологічні та біохімічні патомеханізми – підвищення синтезу ВЖК у сироватці крові та їх накопичення у печінці (токсичний вплив), запальні процеси (ушкодження гепатоцитів), присутність окисного стресу (рис. 6).



Рис. 6. Узагальнююча схема морфо-біохімічних змін при ХДЗП.

Для пацієнтів з НАЖХП та ХГС терапія перш за все повинна бути направлена на детоксикацію організму, зниження вмісту ВЖК; для пацієнтів з токсичним гепатитом алкогольного генезу – на зниження окисного стресу та захист органел клітин, всі ці факти слід враховувати при призначенні лікування пацієнтам з хронічними дифузними захворюваннями печінки.

Висновки.

1. У пацієнтів з ХДЗП у ліпідному екстракті сироватки крові було виявлено підвищення вмісту ВЖК, що підтверджує гіпотезу про пролонговану ліпотоксичну дію цих кислот на печінку, різнонаправлені зміни окремих фракцій ВЖК, зниження/відсутність вмісту арахідонової жирної кислоти (С20:4) в мембранних структурах гепатоцитів як наслідок інтенсивного використання цієї фракції у вільнорадикальних реакціях та синтезі простагландинів.
2. Типова морфологічна картина при НАЖХП представляла собою осередки крупнокрапельної жирової дистрофії на тлі незначного фіброзування та запалення. Для ХГС були характерні найбільш виражені показники запалення та активності гепатиту на тлі помірного фіброзування та дрібнокрапельного або змішаного стеатозу. В групі ХГС було зафіксовані найбільш значні коливання індексу стеатозу зі середнім значенням ($0,23 \pm 0,09$), у той час, як індекс фіброзу склав ($0,0812 \pm 0,06$). В групі АХП

індекси фіброза ($0,1266 \pm 0,013$) та стеатоза ($0,2289 \pm 0,15$) були найвищими, а типова морфологічна картина характеризувалась в першу чергу значною дезорганізацією ліпідних включень та помітними змінами гістологічної будови, за рахунок як запалення так і гідропічної дистрофії гепатоцитів.

3. При розрахунку коефіцієнтів співвідношення окремих жирних кислот було виявлено зниження k_1 в групах пацієнтів: I – в 1,4 рази; II – в 8,5 разів; III – в 38,0 разів; k_2 в групах пацієнтів: I – в 1,3 рази, II – в 8,3 рази, III – в 5,3 рази, що свідчить про зниження активності ферментів ліпооксигеназного шляху, які приймають участь у подовженні вуглеводного ланцюга та утворенні подвійного зв'язку в молекулі жирної кислоти; k_3 в групах пацієнтів: I – в 3 рази, II – 6 рази, III – в 7 рази, в порівнянні з контролем, відображає зниження синтезу ненасичених жирних кислот у пацієнтів всіх груп.
4. Морфологічні та біохімічні показники при АХП достовірно відрізнялись від НАЖХП: за індексом фіброза ($0,1266 \pm 0,013$) у порівнянні з ($0,0443 \pm 0,011$) та стеатоза ($0,2289 \pm 0,15$) у порівнянні з ($0,36 \pm 0,11$)).

Науково-практичне впровадження. Дана робота відноситься до числа фундаментальних досліджень в галузі біохімії та морфології. Отримані результати значно доповнюють сучасні уявлення щодо біохімічних механізмів розвитку хронічних дифузних захворювань печінки. Визначення вмісту вільних жирних кислот у сироватці крові пацієнтів з хронічними дифузними захворюваннями печінки впроваджено в клінічну практику нашого інституту, що дозволяє значно покращити диференційовану діагностику та ефективність лікування виявлених порушень. Метод кількісної гістологічної оцінки стадії фіброзу та стеатозу при хронічних дифузних захворюваннях печінки за допомогою комп'ютерної морфометрії дозволяє отримати числові дані та проаналізувати їх зв'язок із іншими гістологічними, лабораторними та клінічними даними. В перевагу над звичайною гістологічною оцінкою біоптатів додаткова морфометрична характеристика дає можливість отримання більш точних, об'єктивних, відтворюваних результатів. Розробка пройшла апробацію в лабораторії патоморфології ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», КЗ УОЗ МКЛ №2 в м. Харків, КЗ «ЦПМСД №2», м. Вінниця з позитивними результатами (значне підвищення точності морфологічного дослідження).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці статті.

Резюме. В статті представлено морфологічні особливості (за даними гістологічних методів дослідження, методу напівтонких зрізів та комп'ютерної морфометрії) розвитку та

прогресування хронічних дифузних захворювань печінки, хронічного гепатиту, асоційованого з вірусом С та алкогольної хвороби печінки. Показано, що в залежності від етіологічного фактору, важлива відмінність була виявлена за характером, ступенем стеатозу та локалізацією ліпідних крапель, що свідчить про розбіжність деяких біохімічних механізмів накопичення ліпідів в гепатоцитах.

Розглянуто роль вільних жирних кислот сироватки крові при даних захворюваннях, виявлено підвищення їх вмісту у сироватці крові, встановлено дефіцит деяких фракцій, що може бути однією з причин формування неалкогольної жирової хвороби печінки та інших захворювань, пов'язаних з обміном речовин. В якості маркерів запальних процесів можна вважати ленолеву (C18:3) і арахідонову (C20:0) вільні жирні кислоти. Запропоновано індекси співвідношення жирних кислот, які дозволяють охарактеризувати та встановити метаболічні шляхи розвитку та прогресування захворювання, що відіграє важливу роль у диференційованому підході при встановленні нозологічних форм захворювань печінки.

Ключові слова: хронічні дифузні захворювання печінки, хронічний гепатит, асоційований з вірусом «С», алкогольна хвороба печінки, стеатоз печінки, хронічний гепатит, асоційований з вірусним гепатитом С, газова хроматографія, вільні жирні кислоти, поліненасичені жирні кислоти.

Література

1. Степанов Ю.М. Применение эссенциальных фосфолипидов для лечения жировой болезни печени / Ю.М. Степанов / Гастроэнтерология. – №4(62). – 2016. – С. 58-63.
2. Диденко В.И. Современные достижения в оценке стеатоза печени / В.И. Диденко // Гастроэнтерология. – №3(57). – 2015. – С. 94–100.
3. Chen R. Serum fatty acid profiles and potential biomarkers of ankylosing spondylitis determined by gas chromatography–mass spectrometry and multivariate statistical analysis / R. Chen, S. Han, D. Dong [et al.] // Biomed Chromatogr. – 2014. – Vol. 29 (4). – P. 604–11. doi: 10.1002/bmc.3321.
4. Wang D. C. Serum fatty acid profiles using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease / D. C. Wang, C. H. Sun, L. Y. Liu [et al.] // Neurobiol Aging. – 2012. – Vol. 33(6). – P. 1057–66. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.
5. Pat. US 9239334 B2, IPC/US2009/056176. Fatty acid C16: 1N7-palmitoleate a lipokine and biomarker for metabolic status / Haiming Cao, Gokhan S. Hotamisligil; Owner. – President And Fellows Of Harvard College. – No. US 13/062,527; Date of Pat. Jan. 19, 2016.
6. Jiang M. Serum metabolic signatures of four types of human arthritis / M. Jiang, T. Chen, H. Feng [et al.] // J Proteome Res. – 2013. – Vol. 12(8). – P. 3769–79. doi: 10.1021/pr400415a.

7. Perez-Cornago A. Metabolomics identifies changes in fatty acid and amino acid profiles in serum of overweight older adults following a weight loss intervention / A. Perez-Cornago, L. Brennan, I. Ibero-Baraibar [et al.] // *J Physiol Biochem.* – 2014. – Vol. 70(2). – P. 593–602. doi: 10.1007/s13105-013-0311-2.
8. Copaci I. Noninvasive markers of improvement of liver steatosis achieved by weight reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease / I. Copaci, I. Lupescu, E. Caceane [at al.] // *Rom J Intern Med.* – 2015. – №53(1). – P. 54–62.
9. Буторова Л.И. Гепатопротективная терапия жировой болезни печени неалкогольного и алкогольного генеза / Л.И. Буторова, М.А. Калашникова, Н.Г. Крайникова [и др.] // *Эффективная фармакотерапия.* – №34. – 2016. – С. 12–21.
10. Барышникова Н.В. Алкогольная болезнь печени: особенности диагностики и лечения / Н.В. Барышникова, Л.Н. Белоусова // *Гастроэнтерология. Приложение к журналу Consilium Medicum.* – 2014. – № 2. – С. 16–18.
11. Діденко В.І. Актуальність визначення спектра жирних кислот у біологічних субстратах у діагностиці гастроентерологічних захворювань / В.І. Діденко, І.А. Кленіна, С.О. Бабій, В.А. Карачинова // *Гастроентерологія.* 2017.– Т. 51(2). – С. 137–141.
12. Роль кишкової мікробіоти у розвитку порушень ліпідного обміну у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки / Зигало Е.В., Ягмур В.Б., Кленіна І.А., Меланіч С.В., Попок Д.В. / *ММФ.* –2017. – С. 57–60
13. Сапожников А.Г. Гистологическая и микроскопическая техника / А.Г. Сапожников, А.Е. Доросевич // *Руководство.* – Смоленск: САУ, 2000. – 476 с.
14. Ichihara K. Preparation of fatty acid methyl esters by selective methanolysis of polar glycerolipids / K. Ichihara, Ch. Yamaguchi, Y. Araya [et al.] // *Lipids.* – 45. – 2010. – P. 367–374.
15. Енюков И.С. Методы, алгоритмы, программы багатомірного статистичного аналізу/ И.С. Енюков. М.: Фінанси і статистика. – 1986. – 86 с.; Викел П. Статистика / П. Викел, Д. Доскман. М.: – 1983 . – 42 с.

**Liver histology and serum fatty acids spectrum in patients with chronic diffusive liver diseases,
depending on its etiology**

Stepanov Y.M., Didenko V.I., Klenina I.A., Karachinova V.A., Oshmianska N.Y.

SI “Institute of Gastroenterology”, National Academy of Medical Sciences of Ukraine,
Dnipro, Ukraine

Summary. The study analyzes morphological features, specific to the development and progression of hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease, chronic hepatitis C and alcoholic fatty liver disease. Depending on the etiologic factor, the important difference was noted in the content, steatosis degree and localization of lipid drops, which proves the discrepancy between some biochemical mechanisms of lipids accumulation in the hepatocytes.

The role of serum free fatty acids for the given diseases has been considered, the increase of their content in blood serum has been revealed, deficiency of certain fractions has been found, which may be one of the reasons for the formation of non-alcoholic fatty liver disease and other diseases associated with metabolism of lipid substances. It has been proved that linoleic (C18: 3) and arachidone (C20: 0) free fatty acids can be considered as markers of inflammatory processes. The indices of the fatty acids ratio have been proposed, which allows better characterization and analysis of metabolic pathways responsible for the development and progression of fatty liver diseases. All this plays an important role in the establishment of differentiated approaches to the diagnosis and treatment of liver diseases.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease, alcoholic steatohepatitis, liver steatosis, chronic hepatitis C, gas chromatography, free fatty acids, polyunsaturated fatty acids.