

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім.М.І.ПИРОГОВА**

**БІЛОШИЦЬКА АЛІНА ВАСИЛІВНА**

УДК 611- 072.7:616.36:616.13-004.6]-001.5.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ  
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ  
ТА ЗА УМОВ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ**

14.03.01 - нормальна анатомія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Вінниця - 2013

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова МОЗ України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор Піскун Раїса Петрівна, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, завідувач кафедри медичної біології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор Гнатюк Михайло Степанович, державний вищий навчальний заклад "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського МОЗ України", професор кафедри загальної, оперативної хірургії з топографічною анатомією.

доктор медичних наук, професор Сікора Віталій Зіновійович, медичний інститут Сумського державного університету МОН України, завідувач кафедри анатомії людини .

Захист відбудеться «           »           2013 року о           годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.02 при Вінницькому національному медичному університеті імені М.І. Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова,56).

Автореферат розісланий «           »           2013 року.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

О.В.Власенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На протязі останніх років серцево-судинні захворювання залишаються першопричиною смерті більшості населення України (М.І.Лутай, 2004; Ю.А.Карпов, 2005; Е.Н.Амосова, 2011). Загальновідомо, що основна причина серцево-судинних захворювань - атеросклероз. Як свідчать результати популяційних досліджень, проведених в Національному науковому центрі «Інститут кардіології ім. акад. М.Д.Стражеска НАМН України», гіперхолестеринемія виявляється у 44%, гіпертригліцеридемія – у 23% мешканців України, а гіпо-альфахолестеринемію – знижений вміст в сироватці крові холестерину ліпопротеїнів високої щільності- мають 26-28% населення віком понад 35 років ( М.Р.Хара, 2009 Е.Н.Амосова, 2011). Розвиток атеросклерозу веде до утворення в інтимі судини ліпідно-фіброзних бляшок, які зменшують просвіт та кровопостачання до серця, головного мозку, нирок, печінки, нижніх кінцівок ( К.И.Теблєв, 2005; С.В.Оксиненко, 2007; Л.Е.Панин, 2009, Р.П.Піскун, 2010; М.С.Гнатюк, 2010).

В нормі в печінці синтезуються та метаболізуються більша частина ліпопротеїнів, в тому числі – ліпопротеїнів дуже низької щільності, ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів високої щільності (Г.Г.Арабидзе, 2005; М.Н.Долженко, 2010). Встановлено, що 75% рецепторів до ліпопротеїнів низької щільності знаходяться на мембрані гепатоцитів. Активними центрами ліганда є білки АРО В та АРО Е. Було доведено, що головна функція гепатоцитів в підтриманні ліпідного гомеостазу полягає в синтезі апобілков та ліпопротеїнів, їх рецепторів, а також регуляції їх метаболічного балансу (Л.Е.Панин, 2009; J.D.Harris, 2002). При довготривалому холестероловому навантаженні та високій концентрації холестерола в плазмі крові порушується ліпорегуляторна функція гепатоцитів (Е.Н.Амосова, 2005; О.С.Хухліна, 2005; Ю.Х.Мараховский, 2006; Я.А.Медражевська, 2006; С.С.Giallourakis; 2002 G.Targer, 2007 ).

Сьогодні активно обговорюється гіпотеза про те, що дисфункція органів травлення, зокрема печінки, може стати ініціюючим чинником у розвитку атеросклерозу .Так як при атеросклерозі клітинами-мішенями є перш за все клітини печінки – гепатоцити, купферові клітини, ендотеліоцити, а також ендотеліальна вистилка судин печінки, то зміни в них розвиваються паралельно розвитку дисліпопротеїнемії, поступово прогресують, ведуть до холестеринового цирозу, а також до типового пошкодження судинної стінки атеросклеротичним процесом (Л.В.Журавлева, 2005; П.Г.Кравчун, 2005; Н.Б.Губергриц, 2008; М.Н.Долженко, 2008, 2010). Для атеросклеротичного враження судин печінки характерні зміни, що відбуваються в судинах інших органів, а також і специфічні структурно-функціональні зміни саме цього органу. Холестеролове навантаження викликає ураження судин печінки, що призводить до порушення відтоку крові і сприяє в свою чергу розвитку холестеронового цирозу печінки (М.Пинциани, 2002; О.І.Лиховський, 2004; Ю.М.Степанов, 2012; G.Bedogni,

2005). Все вищеперераховане дає можливість стверджувати, що дисліпопротеїнемія викликає порушення структури і функції печінки (J.Dixon, 2004; J. Hiromasa, 2004; A.R.Mensenkamp, 2004 I.N.Gucha, 2010).

У такій ситуації привертає увагу можливість корекції морфофункціональних змін печінки при експериментальному атеросклерозі шляхом профілактичного та лікувального введення гену apoE. Адже на сьогоднішній день доведена зворотність змін тканини печінки при інших патологічних станах (А.И.Хазанов, 2005; О.А.Шликова, 2008; О.О.Чернухіна, 2009; М.С.Сікора, 2010; S.Dam-Larsen, 2004). Необхідність даної роботи пояснюється відсутністю морфологічних даних про стан печінки щурів при експериментальному атеросклерозі під впливом генної корекції. Це створює передумови для розробки методів генної корекції для захисту тканини печінки.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Тема дисертації затверджена вченою радою стоматологічного і фармацевтичного факультетів Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова 12 червня 2008 року (протокол №6), проблемною комісією МОЗ і АМН України «Морфологія людини» 28 травня 2009р. (протокол №93). Дисертаційне дослідження виконано відповідно до плану Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова і є частиною комплексної науково-дослідницької роботи кафедри медичної біології «Морфофункціональний стан кровоносного русла та клітинних елементів органів і тканини при експериментальному атеросклерозі в умовах генної терапії», № держреєстрації 0108U001484. Дисертантка є співвиконавцем даної наукової теми.

**Мета дослідження:** встановити структурно-функціональні особливості печінки в нормі, за умов експериментального атеросклерозу та оцінити гепатопротекторну роль профілактичного та лікувального застосування гену apoE.

**Задачі дослідження:**

1. Провести макроморфометричну оцінку структурних компонентів печінки в нормі, при експериментальному атеросклерозі та при його корекції.
- 2.Визначити структурні особливості паренхіми печінки в нормі, при змодельованій патології та її генній корекції
3. Визначити структурні особливості кровоносних судин печінки в нормі, при змодельованій патології та її генній корекції.
4. Провести порівняльне вивчення особливостей біохімічних показників ліпідного обміну та цитолітичних ферментів сироватки крові в нормі, при експериментальному атеросклерозі та при його корекції.
5. З комплексним урахуванням морфофункціональних змін вивчених структур печінки співставити отримані результати для оцінки впливу профілактичного та лікувального введення гену apoE.

**Об'єкт дослідження:** реактивність та морфогенез структурних компонентів печінки щурів при експериментальному атеросклерозі.

*Предмет дослідження:* структурно-функціональні зміни печінки при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції.

*Методи дослідження:* метод моделювання - для створення моделей пригнічення щитоподібної залози та експериментального атеросклерозу; морфологічні: а) макроморфометричні – для визначення параметрів печінки; б) гістологічний, гістохімічний, мікрометричний та електронномікроскопічний – для дослідження якісних і кількісних характеристик клітин і судин печінки в нормі, при експериментальному атеросклерозі та його корекції; біохімічний – для дослідження ліпідного спектру сироватки крові і визначення активності цитолітичних ферментів; статистичний - для оцінки достовірності отриманих показників.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше проведено комплексне дослідження (морфометричне, гістологічне, гістохімічне та електронномікроскопічне ) печінки щурів в нормі, при експериментальному атеросклерозі і його генній корекції.

Вперше якісними та кількісними методами встановлено, що при змодельованій патології в печінці щурів виникає структурна перебудова у вигляді холестеринового циррозу, зміни кровоносних судин, які характеризуються потовщенням стінки, збільшенням площі поперечного перерізу і стінки артерій малого калібру, зменшенням площі просвіту судин, що супроводжується зниженням їх пропускної здатності. В тканині печінки виникають морфофункціональні зміни, які носять дистрофічний та деструктивний характер, що виражається в звуженні просвіту капілярів, зменшенні площі цитоплазми гепатоцитів, збільшенні площі ядер, збільшенні кількості пошкоджених клітин, збільшенні сполучнотканинних прошарків. Порушується функція печінки, що проявляється зростанням цитолітичної активності органу, виникненням деструкції та дистрофії органел гепатоцитів.

В результаті всебічного наукового аналізу досліджуваного матеріалу вперше представлена порівняльна оцінка гепатопротекторного впливу гена *aroE* при експериментальному атеросклерозі. Встановлено, що використання внутрішньом'язового введення гену *aroE* з профілактичною та лікувальною метою покращує кровопостачання печінки (зменшується товщина стінки, збільшується діаметр і площа просвіту судин), що призводить до регенераторних змін гепатоцитів (зменшується кількість пошкоджених гепатоцитів, відновлюються їх морфометричні та ультраструктурні показники).

**Практичне значення одержаних результатів.** Проведені дослідження розширюють і поглиблюють знання про компенсаторно-адаптаційні можливості печінки при експериментальному атеросклерозі. Результати дослідження показують особливості морфофункціональних змін гепатоцитів та кровоносних судин печінки в умовах даної патології та при її генній корекції, виявляють ефективність досліджуваного гена, а також доцільність його використання в практичній медицині.

На основі отриманих результатів розроблено «Спосіб профілактики холестеринового цирозу печінки в експерименті» (Деклараційний Патент України на корисну модель №67192, Бюлетень №11 від 10.02.2012 р.).

Матеріали дисертації впроваджені в навчально-педагогічний процес і наукову роботу кафедр гістології, оперативної хірургії та топографічної анатомії Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова; кафедри анатомії людини та гістології Ужгородського національного університету; кафедри анатомії людини Буковинського державного медичного університету, кафедри анатомії людини, кафедри клінічної імунології, генетики та медичної біології Одеського національного медичного університету, кафедри анатомії людини Львівського національного медичного університету.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Здобувачем особисто проаналізована наукова література й обґрунтована мета і задачі дослідження, проведено експеримент, забрано матеріал з наступною його обробкою, заливкою та приготуванням препаратів. Зроблено біохімічне, макроморфометричне, гістологічне, гістохімічне дослідження. Здійснено опис гістологічних препаратів і електронограм, проведено мікроморфометрію з наступною статистичною обробкою отриманих результатів та оформленням дисертації. Автором проведено аналіз та узагальнення результатів дослідження. Разом з науковим керівником сформульовано основні положення і висновки. У наукових працях, опублікованих у співавторстві і в актах впровадження, що стосується науково-практичної новизни, використано фактичний матеріал автора.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації оприлюднені на IX з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (Вінниця, 2007); 2-му з'їзді Українського товариства клітинної біології (Київ, 2007 ); науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень» (Тернопіль, 2008); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Експериментальна і клінічна біохімія» (Львів-Люблін, Польща, 2008); науково-практичній конференції «Актуальні проблеми функціональної морфології та інтегративної антропології» (Вінниця, 2009); VI Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології, присвяченій 90-річчю професора О.О.Столярчука (Вінниця, 2010); науково-практичній конференції «Генетична і регенеративна медицина:проблеми та перспективи» (Київ, 2010); на науковому форумі, присвяченому 170-річчю кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О.Богомольця (.Київ, 2011); науково-практичній конференції «Морфологічні аспекти мікроциркуляції в нормі та патології» (Тернопіль, 2011); на Першому Українсько-Йорданському медичному конгресі (Вінниця, 2011); на IV Національному з'їзді фармакологів України (Київ, 2011); на VII Південноукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні проблеми

атеросклерозу - від гіпотез до фактів» (Одеса, 2012); на 3-му з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ялта, 2012).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 21 наукову працю, з них 1 у іноземному журналі, 10 – у фахових виданнях, рекомендованих ДАК України, 7 – у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій, отримано 1 деклараційний патент на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 164 сторінках, з яких 138 сторінок залікового принтерного тексту, і складається із переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, розділу матеріали і методи дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку 245 використаних літературних джерел і додатків, з яких 145 викладені кирилицею та 100 латиницею. Робота ілюстрована 42 рисунками і 18 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження проведене на 73 статевозрілих щурах-самцях масою 150-170 грамів, які утримувалися на стандартному раціоні в умовах науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім.М.І.Пирогова. Утримання тварин та маніпуляції проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985р.), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001р.), а також комітету з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова (протокол №11 від 7червня 2012р.). Всі процедури з тваринами проводили під легким ефірним наркозом.

Модель експериментального атеросклерозу створювали за класичним методом Анічкова шляхом згодовування тваринам холестеролу з соняшниковою олією. На протязі 30 днів щурам внутрішньошлунково за допомогою зонду з оливою вводили холестерол в дозі 0,5г/кг і додатково 4(6)-метил-2-тиоурацил в дозі 12 мг/кг для пригнічення функції щитоподібної залози . Піддослідні тварини були розділені на 5 груп. 1 група - інтактні тварини, які утримувались в звичайних умовах експериментальної клініки; 2 група – тварини з пригніченням функції щитоподібної залози (12 мг/кг 4(6)-метил-2-тиоурацилу щоденно протягом 30 днів); 3 група – тварини з експериментальним атеросклерозом; 4 група - тварини з експериментальним атеросклерозом, яким в перший день моделювання атеросклерозу вводили внутрішньом'язово ген аполіпопротеїну E (apoE) в дозі 50мкг ДНК на тварину); 5 група - тварини з експериментальним атеросклерозом, яка отримувала ген apo E в тій же дозі на 15-й день моделювання .

В дослідженні була використана клонована ДНК (кДНК ) гена apoE, субклонована в вектор pUC18 (плазміді pUCapoE ), подарована Інституту

нейрохірургії імені академіка А.П.Ромаданова АМН України професором George Dickson та науковим співпрацівником Takis Athanapoulus (факультет біохімії Королівського Лондонського університету). Ген *aroE* був переклонований в відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ к.б.н. Цибою Людмилою Олексіївною, плазмідний вектор pCMV•SPORT6 люб'язно були надані чл.-кор. НАНУ Аллою Володимирівною Риндич, за що висловлюємо їм щирю подяку. Факт активної роботи гену *aroE* перевірявся традиційним методом зворотньютранскриптазної полімеразної ланцюгової реакції в лабораторії молекулярної біохімії Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромаданова АМН України. Препарат катіонних ліпосом/ДНК виготовлявся за допомогою реактиву DOTAP Methosulfate виробництва SIGMA-ALDRICH(США) в відповідності до інструкції виробника. Використовувалось 5 мкг DOTAP Methosulfate на 1 мкг ДНК. Суміш катіонних ліпосом та ДНК готувалась безпосередньо перед введенням збовтуванням ДНК з катіонними ліпосомами протягом 10 хвилин .

По закінченню досліду тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Проводилась масометрія тварин і печінки, на основі чого розраховували індекс печінки.

Із видаленої печінки шурів для морфологічного дослідження брали праву бокову долю і занурювали в 10% розчин нейтрального формаліну для фіксації. Зафіксовану печінку промивали під струменем проточної води протягом однієї доби для звільнення від фіксатора, потім зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафін. Блоки нарізали, використовуючи санний мікромом МС-2. Отримані зрізи забарвлювали гематоксилін-еозіном та по Ван Гізон. Забарвленням гематоксилін-еозіном можна отримати дані про характер структури печінки: паренхіму, струму, судини. Забарвлення по Ван Гізон виконувалось гематоксилін-пірофуксином, який дозволяє ідентифікувати в досліджуваній печінці колагенові волокна сполучної тканини. Оцінку мікропрепаратів проводили під мікроскопом МІКМЕД-1 при різних збільшеннях ( окуляр x10, об`єктив x8, x20, x40, x90).

Загальні ліпіди виявляли проведенням дослідження за Лізоном . В якості барвника використовували судан чорний-В, так як він добре розчиняється у ліпідах, цим полегшуючи їх виявлення. Заморожені зрізи печінки промивали в дистильованій воді, занурювали в 70% спирт, фарбували суданом чорним-В протягом 5-7 хвилин, промивали в 30% спирті, дистильованій воді та заключали в гліцерин-желатин.

Мікроморфометричне дослідження гепатоцитів та артеріальних судин печінки проводили за допомогою аналізатора зображень, який складається з мікроскопа LABORLUX S WILD LEITZ G MBH 02505030, оптичного перехідного пристрою, телевізійної камери SONY CCD-IRIS MODEL-DXC-107P, фреймграббера з програмним забезпеченням Fly та персонального комп'ютера. Для вимірювання метричних характеристик використовували програмне забезпечення UTHSCSA Image Tool<sup>®</sup> for Windows<sup>®</sup> (version 2.00 ) (Відео Тест –



розмір 5.0) в інтерактивному режимі з використанням об'єктива  $\times 40$  та фотоокуляра  $\times 10$ . Для калібрування аналізатора зображень використовували тестовий зразок "МИРА" (ГК 7.216.028-01, виробництва НДІ "Квант").

На парафінових зрізах товщиною 8-10 мкм, забарвлених гематоксилін-еозином, вимірювали периметр профілю та діаметр гепатоцитів, ядер, кількість пошкоджених гепатоцитів. Використовуючи дані цих вимірювань розраховували площу гепатоцитів в трьох зонах: централобулярній, перипортальній, проміжній. Обчислювали ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Морфометрію артерій печінки проводили за методикою С.В.Шорманова (1982).

Для електронномікроскопічного дослідження печінки завжди брали шматочок лівої зовнішньої долі, фіксували його 2,5% розчином глютарового альдегіду на фосфатному буфері (рН 7,4), дофіксували 1% розчином осмію. Заливали в суміш епоксидних смол. Зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП7. Контрастування зрізів проводили 1% розчином ураніацетату і цитратом свинцю за Рейнольдсом (Б.Уіклі, 1975). Ультраструктурне дослідження проводилось на мікроскопі ПЕМ 125К в інституті геронтології МАНУ разом з Михальським С.А., за що висловлюємо йому щире подяку.

Для біохімічного дослідження після декапітації забирали кров щурів для отримання сироватки, в якій визначали показники ліпідного обміну за допомогою наборів для визначення ліпідів сироватки крові фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна).

Активність аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) оцінювали уніфікованими методами Райтмана і Френкеля. Активність гама-глутамілтрансферази (ГГТ) визначали за допомогою наборів для визначення фірми "Філісіт-Діагностика" (Україна).

Активність АЛТ та АСТ виступає в якості показника цитолітичного синдрому, а активність ГГТ свідчить про стан ендоплазматичної сітки гепатоцитів.

### **Результати дослідження та їх аналіз**

За результатами наших досліджень, у щурів з пригніченням функції щитоподібної залози на протязі експерименту відзначалось зменшення волосяного покриву, незначне зниження рухової активності тварин, млявість та пригніченість. На відміну від щурів інтактною групи ці тварини значно менше споживали корм, тим самим спричинялось уповільнення росту маси тіла, яка на кінець досліду була на 5,30% меншою, ніж у інтактних тварин, маса печінки у щурів з пригніченням щитоподібної залози була на 7,80% меншою, ніж у інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ). У щурів з пригніченням функції щитоподібної залози виявлений менший індекс печінки на 2,50%, ніж у інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ).

Результати біохімічних досліджень показали, що через 30 днів від початку експерименту у щурів з пригніченням щитоподібної залози рівень загального холестеролу сироватки крові збільшувався в 1,7 рази у порівнянні з показником у групі інтактних тварин. У щурів цієї дослідної групи відмічено на

7,40% зниження рівня холестеролу  $\alpha$ -ліпопротеїнів і одночасне зменшення вмісту холестеролу в складі пре- $\beta$  ліпопротеїнів на 11,00% у порівнянні з інтактними тваринами. У щурів з пригніченням функції щитоподібної залози в сироватці крові спостерігалось на 3,50% зростання рівня холестеролу  $\beta$ -ліпопротеїнів проти цього показника у інтактних тварин, а також виявлялось зменшення вмісту загальних ліпідів сироватки крові у порівнянні з показником у інтактних тварин. У щурів з пригніченням функції щитоподібної залози в сироватці крові рівень тригліцеридів виявився меншим на 13,70%, ніж у тварин інтактної групи, та виявлено збільшення в 2,5 рази індексу атерогенності.

Проведена мікроморфометрія гепатоцитів щурів з пригніченням функції щитоподібної залози виявляє зміни параметрів клітин у порівнянні з тваринами інтактної групи. Так, в перипортальній, проміжній та централобулярній зонах збільшується площа ядер гепатоцитів (відповідно на 0,73; 0,40; 0,42%); збільшується ядерно-цитоплазматичне співвідношення (відповідно 1,50; 2,20; 1,40%); збільшується кількість пошкоджених гепатоцитів (відповідно в 1,5, 4, 4 рази) збільшується стромально-паренхіматозне співвідношення (відповідно на 10,30; 8,30; 8,60%,  $p \leq 0,05$ ) в порівнянні з показниками тварин інтактної групи.

Викликане пригнічення щитоподібної залози веде до збільшення площі перерізу артерій малого калібру (на 20,77%), зменшення площі просвіту на 17,00%, збільшення зовнішньої максимальної та мінімальної вісей артерій малого калібру (відповідно на 10,72 та 8,75%) у порівнянні з показниками інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ). У дослідних тварин пригнічення щитоподібної залози викликає зменшення внутрішньої максимальної та мінімальної вісей (на 15,00 та 11,00%), збільшення зовнішнього діаметру артерій малого калібру печінки на 9,50%, зменшення справжнього внутрішнього діаметру артерій на 14,70% ( $p \leq 0,05$ ). Збільшення товщини стінки артерій малого калібру печінки у щурів з пригніченням функції щитоподібної залози сягає 40,00% у порівнянні з інтактними тваринами, збільшення площі стінки артерій малого калібру – в 1,43 рази. Погіршення пропускної здатності судин при пригніченні щитоподібної залози характеризується зростанням індексу Вогенворта в 1,64 рази проти показників інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ).

Електронна мікроскопія печінки тварин, яким моделювалось пригнічення щитоподібної залози, показала, що зміни гепатоцитів на субклітинному рівні незначні. Так, в клітинах спотерігається наявність добре розвинених гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, велика кількість мітохондрій, включення ліпідів, глікогену. Зрідка зустрічаються клітини з пікнотичними ядрами, ліпофусцином та мієліновими тілами.

Отримані результати показали, що у тварин з експериментальним атеросклерозом через 30 днів після початку експерименту спостерігаються виражені зміни в ліпідному спектрі крові. Так, рівень загального холестеролу сироватки крові зростає в 3 рази в порівнянні з групою інтактних тварин, рівень  $\beta$  –ліпопротеїнів зростає майже в 10 разів у порівнянні з цим показником у інтактних тварин, збільшується вміст загальних ліпідів майже в два рази, в той

же час відмічається зниження рівня холестеролу  $\alpha$  –ліпопротеїнів на 23,10% у порівнянні з інтактними тваринами, зниження вмісту холестеролу пре- $\beta$  ліпопротеїнів на 57,20% ( $p \leq 0,05$ ). У щурів, яким створювали експериментальний атеросклероз, в сироватці крові майже вдвічі меншим, ніж у інтактних тварин, виявився рівень тригліцеридів. У щурів з експериментальним атеросклерозом в 7,3 рази зростає індекс атерогенності сироватки крові ( $p \leq 0,05$ ).

За даними літератури патологічні процеси в печінці ведуть до підвищення активності її ферментів (О.Я.Склярів, 2007; Н.Б.Губергриц, 2008; М.Н.Долженко, 2010; J.T. Salonen, 2003; J.Ibdach, 2008). Результати дослідження показали, що у щурів з експериментальним атеросклерозом виявлено майже в 4 рази більшу активність АЛТ і АСТ у порівнянні з інтактними тваринами, зростає активність ГГТ на 4,20% у порівнянні з інтактними тваринами ( $p \leq 0,05$ ). За даними літератури, патологічні процеси, які мають перебіг в печінці, ведуть до зміни структури, маси і розмірів органу (Я.А.Медражевська, 2009; Л.В.Мороз, 2009; О.О.Чернухіна, 2009; В.З.Сікора, 2009; L.Nucetti, 2002; M.Pan, 2004 ). В нашому дослідженні у щурів з експериментальним атеросклерозом маса тіла зменшувалась на 16,50% в порівнянні з тваринами інтактною групи ( $p \leq 0,05$ ). У піддослідних тварин печінка була зменшена в об'ємі, щільної консистенції, зеленувато-жовтого глиняного кольору, маса її у експериментальних тварин була на 23,00% меншою у порівнянні з інтактними тваринами. Відповідно індекс печінки зменшується на 8,30% у тварин з експериментальним атеросклерозом ( $p \leq 0,05$ ).

З літературних джерел відомо, що морфологічні зміни судинної системи, обумовлені атеросклерозом, доцільно позначати терміном «атеросклеротична ангіопатія» (D.Steiberg, 2006). Стосовно до печінки цим терміном варто позначати всі різноманітні процеси, що розвиваються в судинах органу. Вони мають різні механізми розвитку, але загальну причину – атеросклероз. Відомо, що різні критичні стани (гіпоксія, ішемія, порушення мікроциркуляції і метаболічні зміни) найбільш агресивні по відношенню до печінки. А оскільки печінка – центральна біохімічна лабораторія організму, то її враження при атеросклерозі визначає і перебіг патологічних процесів в усьому організмі (D.Steiberg, 2006; G.Targer, 2006). Сполучення патологічних і адаптивних процесів, що розвиваються при атеросклерозі у судинах печінки, являє собою більше ніж їхня сума, тому що ускладнює загальну характеристику захворювання . Вразливими є артерії малого калібру, де спостерігаються найбільш різноманітні атеросклеротичні зміни і їхні ускладнення. На різних структурно-функціональних рівнях єдиної артеріальної системи печінки прояви атеросклеротичної ангіопатії мають свої особливості. Але саме зміни в артеріях малого калібру приводять до порушення кровотоку в органі, що веде до порушення його функції, а потім і будови. В результаті нашого дослідження встановлено, що у щурів з експериментальним атеросклерозом площа перерізу артерій малого калібру збільшується на 70,92% у порівнянні з інтактними тваринами, збільшується зовнішня максимальна та мінімальні вісі відповідно на

17,50 та 11,75% у порівнянні з тваринами інтактної групи ( $p \leq 0,05$ ). У експериментальних тварин встановлено збільшення розмірів зовнішнього діаметру артерій малого калібру печінки на 21,37%, збільшується площа стінки артерій в 2,3 рази у порівнянні з інтактними тваринами, а сама товщина судинної стінки на 82,40% більша, ніж у тварин інтактної групи (рис.1).

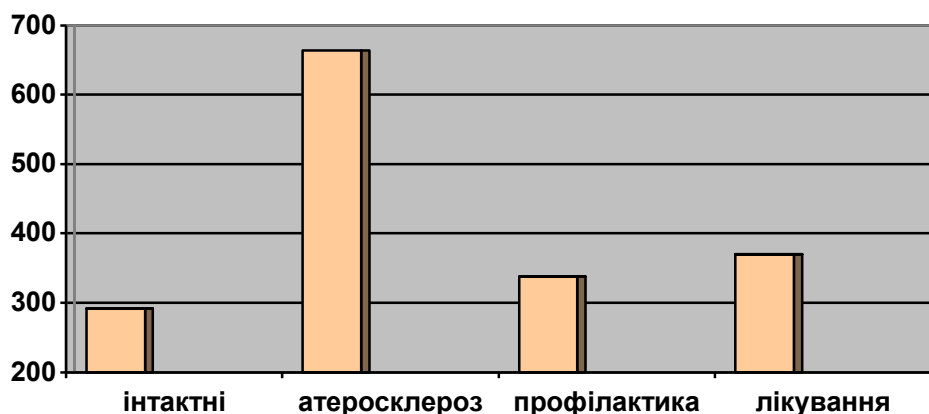


Рис.1. Зміни площі стінки (мкм<sup>2</sup>) артерій малого калібру печінки щурів.

Відповідно індекс Вогенворта у щурів зі змодельованим атеросклерозом збільшується в 3 рази у порівнянні з інтактними тваринами (Рис.2).

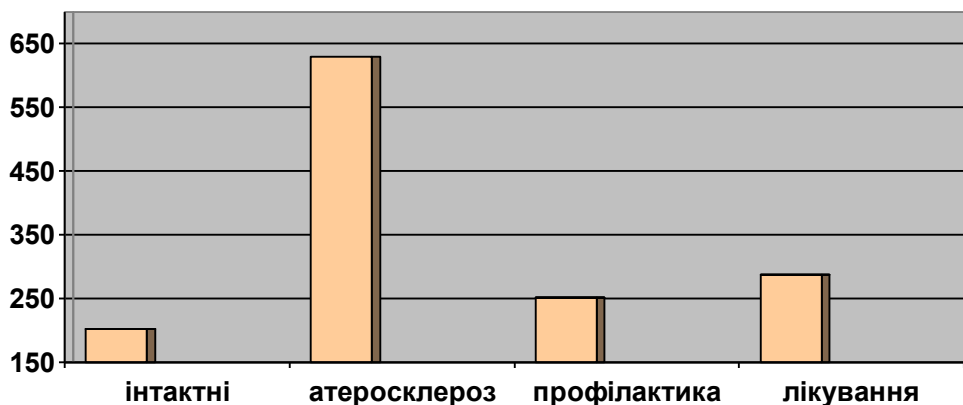


Рис.2 Зміни індексу Вогенворта (%) артерій малого калібру печінки щурів.

В той же час спостерігається зменшення площі просвіту судин на 30,00% у порівнянні з інтактною групою, зменшуються розміри внутрішніх вісей максимальної та мінімальної відповідно на 28,70 та 30,00% ( $p \leq 0,05$ ). Встановлено, що при експериментальному атеросклерозі справжній внутрішній діаметр артерій малого калібру печінки на 26,40% менше, ніж у інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ). Таким чином в печінці виникає хронічна ішемія. Порушення постійного

притоку крові до печінки викликає дистрофічні зміни і загибель клітин печінки з наступним порушенням функцій .

При мікроскопічному дослідженні печінки тварин з експериментальним атеросклерозом було виявлено, що гепатоцити мають світлу цитоплазму з оптично пустими вакуолями та базофільною зернистістю, спостерігається збільшення кількості сполучної тканини, часточки можна розрізнити за наявними міжчасточковими сполучнотканинними прошарками, в яких знаходяться макрофаги, лімфоцити, клітини фібробластного ряду, пучки колагенових волокон. В області триад можна спостерігати скупчення фібробластів. Помічається порушення двохшаровості структури печінкових пластинок, розширення простору синусоїдних капілярів. Ці зміни найбільше виражені в центролобулярній зоні, де переважають клітини набряклі, збільшені в об'ємі, з нечітко структурованими ядрами. Проведена мікроморфометрія гепатоцитів щурів з експериментальним атеросклерозом виявила найбільші зміни параметрів клітин саме в перипортальній зоні: середня площа гепатоцитів на 11,40% менше, ніж у інтактних тварин. Площа ядер гепатоцитів перипортальної зони на 6,40% більше, ніж у інтактних щурів ( $p \leq 0,05$ ). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів перипортальної зони збільшується на 2,80%, стромально-паренхіматозне співвідношення збільшується на 61,30% у порівнянні з інтактними щурами ( $p \leq 0,05$ ). В перипортальній зоні виявлено в 8 разів більшу кількість пошкоджених гепатоцитів, ніж у інтактних щурів. В центролобулярній зоні середня площа гепатоцитів на 11,40% менше, ніж у інтактних щурів. Зміни площі ядер не такі великі, як у перипортальній зоні і не перевищують 1,00%. Збільшення ядерно-цитоплазматичного співвідношення гепатоцитів цієї зони на 10,55% більше, ніж у інтактних тварин ( $p \leq 0,05$ ). Морфометричні показники зміни структури гепатоцитів проміжної зони носять проміжний характер між змінами показників перипортальної і центролобулярної зон. Порушення постійного притоку крові до печінки викликає дистрофічні зміни і загибель клітин печінки з наступним порушенням функцій. В нашому мікроморфометричному дослідженні встановлено, що найбільш чутливими до ішемії є гепатоцити перипортальної зони. В цій зоні переважають клітини змінені в порівнянні з інтактною групою. Наявність у тварин з експериментальним атеросклерозом достовірно більшої кількості, в порівнянні з інтактними тваринами, патологічно змінених гепатоцитів, розростання сполучної тканини, збільшення показника стромально-паренхіматозного співвідношення і є одими із ознак вираженого холестеринового цирозу печінки. . При гістохімічному дослідженні в препаратах печінки піддослідних щурів спостерігається накопичення ліпідів в гепатоцитах у вигляді крупних крапель переважно в зоні центральної вени. Відомо (М.С.Гнатюк, 2008), що внаслідок токсичної дії речовин в першу чергу морфологічні зміни відбуваються в перипортальній зоні, а самі токсичні речовини накопичуються в центролобулярній зоні.

Електронномікроскопічні дослідження гепатоцитів показали, що в умовах експериментального атеросклерозу виявляється пошкодження клітин печінки. Спостерігаються клітини з ознаками деструкції і некрозу, пікнотичними ядрами, великою кількістю крапель ліпідів. Глибока деструкція мітохондрій проявляється гомогенізацією і просвітлення матриксу, руйнуванням крист і зовнішніх формуючих мембран. В цитоплазмі гепатоцитів помітні слабо розвинені цистерни гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, значно зменшена кількість глікогену. Звертає на себе увагу велика кількість мієліноподібних структур та ліпофусцину. В стінці капілярів спостерігається значна кількість ендотеліоцитів з ознаками деструкції, перисинусоїдний простір виглядає значно розширеним в порівнянні з тваринами інтактної групи. В цьому просторі доволі часто зустрічаються краплі ліпідів, перисинусоїдні ліпоцити та колагенові волокна. Простір між сусідніми гепатоцитами виглядає дещо розширеним. В цитоплазмі клітин Іто, переважно перинуклеарно, локалізуються краплини ліпідів різної величини. Поміж ендотеліоцитами синусоїдних капілярів визначаються розсіяні чисельні макрофаги з багаточисельними лізосомами та відростками. Просвіт синусоїдних капілярів вузький, або зовсім не визначається.

Таким чином, в результаті проведеного комплексного дослідження ми виявили каскад патогенетичних змін, що проявляються пошкодженням печінки за механізмами некрозу і фіброзу.

В результаті досліджень (Athanasopolus T., 2000) при експериментальному атеросклерозі введення гену apoE веде до збільшення експресії білку аполіпопротеїну E, який в якості ліганда  $\beta$ -ліпопротеїнів відіграє важливу роль в метаболізмі, транспорті та регуляції рівня холестеролу. Надлишок холестеролу та тригліцеридів видаляється завдяки ефективному зв'язуванню атерогенних ліпопротеїнів з рецепторами печінки.

В наших дослідженнях позитивний вплив введення гену apoE з профілактичною та лікувальною метою відмічається вже при масоморфометричних дослідженнях. Так, у тварин з експериментальним атеросклерозом, яким вводили ген як з метою профілактики так і лікування, в кінці експерименту відзначається незначне зменшення волосяного покриву в ділянці живота. Не спостерігається змін рухової активності тварин. Щурі із профілактичної та лікувальної групи мають більшу масу, ніж в групі з експериментальним склерозом без корекції (відповідно на 2,20 та 1,60%), масу печінки (відповідно на 7,60 та на 2,60%), індекс печінки (відповідно на 7,60 та 3,40% ( $p \leq 0,05$ )). У тварин з профілактичним та лікувальним введенням гену apoE печінка була щільної консистенції, переважно темно-вишневого кольору. Результати біохімічних досліджень підтверджують позитивний вплив введення гену apoE з профілактичною та лікувальною метою. Так, через 30 днів від початку експерименту у тварин з профілактичним та лікувальним введенням гену apoE на тлі холестеролової дієти рівень загального холестеролу виявився в 1,4 та 1,6 рази меншим, відповідно в порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом без корекції ( $p \leq 0,05$ ). У тварин на тлі

холестеролової дієти з профілактичним та лікувальним введенням гену apoE зменшується рівень холестеролу  $\beta$  –ліпопротеїнів (в 1,6 та в 1,8 рази, відповідно); зменшується вміст загальних ліпідів (на 12,50 та 20,9%), рівень холестеролу  $\alpha$  –ліпопротеїнів збільшується (на 30,40 та 31,20%, відповідно). Виявляється збільшення рівня пре- $\beta$ ліпопротеїнів (на 17,00 та 8,90% відповідно) ( $p \leq 0,05$ ). В профілактичній та лікувальній групі зростають показники тригліцеридів у порівнянні з групою з експериментальним атеросклерозом (відповідно на 17,00 та 9,00% ( $p \leq 0,05$ )). При генній корекції з профілактичною та лікувальною метою зменшується індекс атерогенності (на 50,70 та на 20,90%, відповідно) ( $p \leq 0,05$ ). Активність ферментів АЛТ, АСТ та ГГТ, які є показниками цитолітичної активності тканини печінки, значно зменшується (в 4, 3, в 3 та в 1,02 рази в групі з профілактичним введенням, та в 3,7; в 2,8 та в 1,03 рази в групі з лікувальним введенням гену apoE відповідно) ( $p \leq 0,05$ ).

При мікроскопічному світлооптичному дослідженні тканини печінки щурів дослідних груп з профілактичним та лікувальним введенням гену apoE визначається незначне порушення двохшаровості структури печінкових балок, незначне розширення простору синусоїдних капілярів, зменшення кількості макрофагів, лімфоцитів, клітин фібробластного ряду. Гепатоцити мають гомогенну цитоплазму, деякі з оптично пустими вауколями. При гістохімічному дослідженні окремі краплі ліпідів спостерігаються переважно в гепатоцитах зони центральної вени. Проведена мікроморфометрія гепатоцитів тварин профілактичної та лікувальної групи також показала позитивну картину: збільшується площа гепатоцитів в перипортальній, проміжній та центролобулярній зонах у порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом без корекції (для профілактичної групи на 10,80; на 12,30; на 11,80%; для лікувальної групи на 8,90; на 11,50; на 12,00% відповідно) ( $p \leq 0,05$ ). Зменшується площа ядер гепатоцитів в перипортальній, проміжній та центролобулярній зонах (для профілактичної групи на 4,90; на 3,00; на 0,50%; для лікувальної групи на 4,90; 2,80; 0,20% відповідно) ( $p \leq 0,05$ ). Показники ядерно-цитоплазматичного співвідношення в усіх трьох досліджуваних зонах профілактичної та лікувальної груп значно відрізняються від показників групи з експериментальним атеросклерозом (для профілактичної і лікувальної груп на 14,00; 14,00; 8,90% ( $p \leq 0,05$ )). Кількість пошкоджених клітин стає меншою в групі з профілактичним введенням гену apoE (в 3,3 рази в перипортальній зоні, в 2,3 рази в проміжній зоні, в 1,5 рази в центролобулярній зоні ( $p \leq 0,05$ )). Для лікувальної групи ці показники мають слідуєчий характер: в 3,3 рази, в 2,8 рази, в 1,3 рази ( $p \leq 0,05$ ). Позитивний вплив профілактичного і лікувального введення гену apoE виражений в рівній мірі за даними стромально-паренхіматозного співвідношення (і в профілактичній, і в лікувальній групах цей показник в 1,5 рази менший, ніж в групі з експериментальним атеросклерозом ( $p \leq 0,05$ )). Очікувані позитивні зміни в морфометричних параметрах артерій малого калібру печінки щурів, яким вводили ген apoE, виражені сильніше в групі тварин, яким проводилась генна корекція з профілактичною метою: площа перерізу артерій

малого калібру печінки тварин з профілактичним введенням гену ароЕ зменшується на 38,00, а при лікувальному на 35,20% у порівнянні з тваринами з експериментальним атеросклерозом ( $p \leq 0,05$ ). Площа просвіту при профілактичному введенні гену збільшується на 27,50%, а при лікувальному на 22,00% у порівнянні з групою з експериментальним атеросклерозом без корекції ( $p \leq 0,05$ ). У щурів з профілактичним введенням гену ароЕ спостерігається зменшення зовнішньої мінімальної та максимальної вісей на 12,60 та 11,00% відповідно у порівнянні з експериментальним атеросклерозом, а при лікувальному введенні на 18,70 та на 6,50% відповідно у порівнянні з атеросклерозом без корекції ( $p \leq 0,05$ ). Збільшення показників внутрішньої максимальної та мінімальної вісей виражено сильніше в групі з профілактичною корекцією (на 33,00 і на 35,50% відповідно), ніж в лікувальній групі (на 26,90 та 27,40 % відповідно) ( $p \leq 0,05$ ). У щурів з профілактичним введенням гену ароЕ спостерігається значне зменшення справжнього зовнішнього діаметру (на 14%) у порівнянні з групою з експериментальним атеросклерозом ( $p \leq 0,05$ ). В групі з лікувальним введенням справжній зовнішній діаметр зменшується на 16,00% у порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом без корекції ( $p \leq 0,05$ ). Справжній внутрішній діаметр артерій малого калібру печінки тварин з профілактичним введенням гену ароЕ зростає на 33,00%, а в лікувальній групі у порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом на 25,70% ( $p \leq 0,05$ ). Товщина стінки артерій малого калібру зменшується і в профілактичній, і в лікувальній групі (на 38,60 та на 34,00% відповідно) у порівнянні з показниками тварин з експериментальним атеросклерозом ( $p \leq 0,05$ ). Аналогічно зменшуються і показники площі стінки артерій в профілактичній (на 49,00% ) та лікувальній (на 44,00%) групах у порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом ( $p \leq 0,05$ ). Індекс Вогенворта як показник пропускної здатності судин печінки малого калібру найбільше знижується в профілактичній групі (в 2,5 рази ), в лікувальній групі в 2 рази відрізняється від показників групи з експериментальним атеросклерозом без корекції ( $p \leq 0,05$ ).

Відмічений позитивний вплив профілактичного та лікувального введення гену ароЕ на ультраструктурний рівень печінки щурів. В гепатоцитах тварин профілактичної та лікувальної груп наявні ядра, гранулярний та агранулярний ендоплазматичний ретикулум, велика кількість мітохондрій, полісом, комплекс Гольджі, вакуолярні структури, зрідка в гепатоцитах зустрічаються невеликі краплі ліпідів. В синусоїдах звертають на себе увагу ендотеліоцити, які мають великий рівень гетерохроматину в ядрах, що свідчить про високу мітотичну активність. В перисинусоїдному просторі печінкових часточок відсутні фібробласти, колагенові волокна, незначна кількість ліпідів. Просвіт між сусідніми гепатоцитами незмінений у порівнянні з інтактними тваринами. В просвіті синусоїдних капілярів зрідка спостерігаються еритроцити. На біліарній поверхні гепатоцитів добре видно велику кількість коротких виростів цитолемі, а просвіт жовчевих капілярів у порівнянні з даними тварин інтактної групи не відрізняється за розмірами. В гепатоцитах тварин з лікувальним введенням гену



ароЕ, порівнянню з групою профілактичного введення, частіше зустрічаються ділянки з гепатоцитами з ознаками некрозу, але у порівнянні з групою тварин з експериментальним атеросклерозом без корекції їх кількість незначна. В перисинусоїдному просторі печінкових часточок лікувальної групи спостерігається менша кількість поодиноких фіброblastів, колагенових волокон, макрофагів, жировмісних клітин. Іноді зустрічаються ендотеліоцити з ознаками деструкції, але їх кількість незначна у порівнянні з групою щурів з експериментальним атеросклерозом. В групі з лікувальним введенням гену ароЕ спостерігається деяке звуження просвіту синусоїдних капілярів в порівнянні з профілактичною групою, але в порівнянні з групою з експериментальним атеросклерозом фіксується позитивна картина.

Таким чином, досліджуючи морфофункціональні особливості печінки при експериментальному атеросклерозі та за умов профілактичної та лікувальної генної корекції – геном ароЕ, ми виявили дещо різну позитивну дію генної терапії на структуру та функцію печінки. Так, менша ефективність лікувального введення гену ароЕ виявляється при корекції ліпідного обміну, функціонального стану печінки. При вивченні наслідків профілактичного та лікувального введення гену ароЕ відмічається покращення кровотоку печінки, а саме збільшення діаметра і площі просвіту судин, зменшення товщини стінки. Майже в рівній мірі профілактичне та лікувальне введення гену ароЕ сприяє покращенню макроморфометричних та мікроморфометричних показників печінки. Як показали наші дослідження, по ефективності на першому місці стоїть профілактичне, а на другому – лікувальне введення гену ароЕ.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуального наукового завдання, що полягає у з'ясуванні особливостей структурно-функціональних змін печінки при експериментальному холестероловому атеросклерозі та встановленні ефективності генної терапії для його корекції.

1. Експериментальний атеросклероз призводить до зміни макроморфометричних показників печінки. Відмічається зменшення маси печінки на 23,00% порівняно з аналогічними показниками інтактної групи, що є ознаками дистрофії печінки.

2. В кровоносних судинах печінки з експериментальним атеросклерозом виникають наступні зміни: збільшення площі поперечного перерізу на 70,92%, зовнішнього діаметру – на 21,37%, товщини стінки судин – на 82,40%, площі стінки – в 2,3 рази, індексу Вогенворта – в 3 рази, а також зменшення площі просвіту на 30,00% та внутрішнього діаметру артерій – на 26,40% в порівнянні з групою інтактних тварин.

3. В печінці при експериментальному атеросклерозі встановлено збільшення пошкоджених гепатоцитів в 10 разів; зменшення площі цитоплазми на 11,40%, збільшення площі ядра на 6,40% та ядерно-цитоплазматичного

співвідношення на 2,80%. Порушується структура печінки за рахунок розростання сполучної тканини, виникає деструкція та дистрофія органел гепатоцитів.

4. Експериментальний атеросклероз призводить до порушення показників ліпідного обміну сироватки крові щурів, про що свідчить зростання рівнів загального холестеролу майже в 3 рази, загальних ліпідів - в 2 рази,  $\beta$ -ліпопротеїнів – в 10 разів, індексу атерогенності в 7,3 рази, а також зниження концентрації  $\alpha$ -ліпопротеїнів на 23,10% порівняно з показниками інтактних тварин. При експериментальному атеросклерозі в сировотці крові спостерігається збільшення активності АЛТ в 4 рази, АСТ майже в 4 рази, ГГТ на 4,20% в порівнянні з тваринами інтактної групи.

5. Профілактичне та лікувальне внутрішньом'язове введення гену apoE для корекції патологічних змін печінки в умовах експериментального атеросклерозу проявляє позитивну ефективність, що сприяє покращенню показників ліпідного обміну в сироватці крові (зменшення рівню загального холестеролу в 1,4 в профілактичній та в 1,6 рази в лікувальній групах; зменшення рівню пре- $\beta$  ліпопротеїнів відповідно в 1,6 та 1,8 рази; зменшення вмісту загальних ліпідів на 12,50 та 20,90%; зменшення індексу атерогенності на 50,70 в профілактичній групі та на 20,90% в лікувальній групах; збільшення рівня  $\alpha$ -ліпопротеїнів на 30,40 та на 31,20% відповідно), стабілізації активності цитолітичних ферментів (зменшення активності АЛТ в 4,3 рази в профілактичній групі та в 3,7 рази в лікувальній групі; зменшення активності АСТ в 3 рази та в 2,8 рази відповідно; зменшення активності ГГТ в профілактичній групі на 2,00 та на 3,00% в лікувальних групах), зменшенню товщини стінки (в профілактичній групі на 38,60 та в лікувальній групі на 34, 50%), збільшенню діаметра і площі просвіту судин (на 33,00 та на 25,70%; на 27,50 та на 22,00% в профілактичній та лікувальній групах відповідно) що призводить до внутрішньоклітинної регенерації структурних компонентів печінки: зменшується кількість пошкоджених гепатоцитів, відновлюються їх лінійні показники та ультраректура.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1 Characteristics of lipid spectrum of blood serum in experimental atherosclerosis and in gene therapy / Raisa Piskun, Alina Biloshycka, Valerij Istoszyn, Galina Beregela, Natalia Mrych, Alisia Biloshicka //Annales universitatis Mariae Curie-Sklodowska. – 2008. – Vol. XXI, № 34. – P.207–209. (Здобувач проводила експеримент, забор крові для визначення ліпідів у сироватці, біохімічне дослідження сироватки крові, готувала матеріал до друку).

2. Морфофункціональне дослідження ефективності генної терапії при експериментальному атеросклерозі /А.В.Білошицька, Р.П.Піскун, С.М.Горбатюк, Н.М.Мрих, В.В.Білошицький, І.І.Піскун, Т.І.Шевчук// Матеріали конференції Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2009. – Т.9. – С.298–303.

*(Здобувач проводила експеримент, генну терапію, вивчала і аналізувала гістологічні препарати, проводила мікроморфометрію судин тканини печінки дослідних тварин, проводила підготовку статті до друку).*

3. Характеристика функциональной морфологии сердца, легких, печени и почек в компенсаторно-приспособительных процессах при экспериментальном атеросклерозе /Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, Н.Н.Мрых, Е.А.Ромашкина, А.А.Савицька // Вісник морфології. – 2010. – Т.16, № 1. – С. 159–163. *(Здобувач проводила експеримент, генну корекцію атеросклерозу та вивчала аналізувала гістологічні препарати, проводила мікроморфометрію судин тканини печінки дослідних тварин, готувала статтю до друку).*

4. Піскун Р.П. Можливості використання генної терапії при експериментальному атеросклерозі /Р.П.Піскун, Н.М.Мрых, А.В.Білошицька // Журнал Академії медичних наук України. – 2010. – Т.16. – Додаток. – С.148–149. *(Здобувач проводила експеримент, генну корекцію атеросклерозу, вивчала та аналізувала гістологічні препарати тканини печінки дослідних тварин, готувала статтю до друку).*

5. Білошицька А.В. Ультраструктурні зміни печінки щурів при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції /А.В.Білошицька, Р.П.Піскун, С.А.Міхальський // Галицький лікарський вісник. – 2010. – Т.17, № 2. – Ч.2. – С.32–34. *(Здобувач проводила дослід, генну корекцію тваринам зі змодельованим атеросклерозом, описувала і аналізувала отримані електронограми, готувала статтю до друку).*

6. Пат.на корисну модель 67192 Україна <sub>51</sub>МПК <sub>19</sub>UA <sub>11</sub>67192 <sub>13</sub>U G09B 23/28 (2006.01) Спосіб профілактики холестеринового цирозу печінки в експерименті /Білошицька А.В., Піскун Р.П., Истошин В.М. – заявл.20.06.2011; опубл. 10.02.2012, Бюл.№3.*(Здобувач проводила експеримент, вивчала та аналізувала гістологічні препарати, проводила генну терапію дослідних тварин).*

7. Піскун Р.П. Про можливість корекції морфофункціональних змін печінки при експериментальному атеросклерозі / Р.П.Піскун, А.В.Білошицька // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2007. – Т.11, № 2/2. – С.797. *(Здобувач проводила постановку дослід, забір тканини печінки для подальшого гістологічного дослідження, описувала гістологічні препарати та проводила мікроморфометрію клітин та судин, готувала статтю до друку).*

8. Піскун Р.П. Особливості моделювання атеросклерозу / Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, В.М.Истошин // Матеріали ІХ з'їзду Всеукраїнського лікарського товариства.- Вінниця, 10-12 травня 2007 року. – С. 331. *(Здобувач проводила постановку дослід, проводила масоморфометричні дослідження інтактних тварин та тварин з експериментальним атеросклерозом, готувала статтю до друку ).*

9. Piskun R. The intercellular interaction during the experimental atherosclerosis/R.Piskun, A.Biloshitska, O.Savytska // Збірник тез 2го з'їзду Українського товариства клітинної біології.- 2007.- С. 195. *(Здобувач проводила*

*експериментальне дослідження на щурах, проводила генну корекцію, гістологічне дослідження тканини печінки, готувала статтю до друку ).*

10. Зміни ліпідного спектра крові при експериментальному атеросклерозі та його корекції/ Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, Г.С.Берегеля, В.М.Истошин, Н.М.Мрих, І.І.Піскун // Вісник Вінницького національного медичного університету. –2008. – Т.12, №1. – С.243–244. *(Здобувач проводила експеримент, забір крові у тварин для визначення ліпідів, готувала статтю до друку).*

11. Піскун Р.П Масометричні дані печінки та щитовидної залози при експериментальному атеросклерозі / Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, І.І.Піскун // Збірник матеріалів науково-практичної конференції Прикладні аспекти морфології експериментальних і клінічних досліджень. – 29-30 травня 2008 року. – С.105–106. *(Здобувачем проведений експеримент, масометричні дослідження печінки піддослідних тварин, описані отримані результати, проведена підготовка статті до друку ).*

12. Функціональна морфологія серця, печінки і щитоподібної залози при експериментальному атеросклерозі / Н.М.Мрих, Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, С.М.Горбатюк, І.І.Піскун, Т.І.Шевчук// Матеріали науково-практичної конференції Прикладні аспекти морфології.- Вінниця 20-21 травня 2009 року. С.212-214. *(Здобувач проводила експеримент, забирав кров для подальшого біохімічного дослідження, вивчала та аналізувала гістологічні препарати дослідних тварин ).*

13. Піскун Р.П. Можливості генної терапії при атеросклерозі в експерименті /Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, Ромашкіна О.А., Савицька А.А. // Матеріали XIV конгресу світової федерації українських лікарських товариств. – Донецьк – 4-6 жовтня 2012. - – С.132. *(Здобувач проводила експеримент, генну корекцію атеросклерозу, вивчала та аналізувала гістологічні препарати тканини печінки дослідних тварин, готувала статтю до друку).*

14. Білошицька А.В. Функціональні зміни печінки при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції / А.В.Білошицька, Р.П.Піскун, В.М.Истошин// Клінічна та експериментальна фармакологія. VI Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю з клінічної фармакології, присвячена 90-річчю професора О.О. Столярчука.- 2010. – С. 157-160. *(Здобувач проводила експеримент, проводила генну корекцію, вивчала та аналізувала гістологічні препарати дослідних тварин, готувала статтю до друку ).*

15. Вивчення атерозахисних властивостей гену apoE на судинне русло в експерименті / Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, Н.МГринчак, І.І.Піскун, А.О.Савицька, В.М.Истошин // Матеріали Першого Українсько-Йорданського медичного конгресу 12-17 вересня 2011 р. – С.8–9. *(Здобувач проводила експеримент, вивчала та аналізувала гістологічні препарати, проводила мікроморфометрію судин тканини печінки дослідних тварин, готувала статтю до друку ).*

16. Гринчак Н.М. Мікроморфометричні зміни артерій серця та печінки щурів при експериментальному атеросклерозі та при його корекції/ Н.М.Гринчак, Р.П.Піскун, А.В.Білошицька // Збірник матеріалів науково-практичної конференції Морфологічні аспекти мікроциркуляції в нормі та патології. – 17-18 червня 2011 р.Тернопіль. – С.62–64. *(Здобувач проводила експеримент, отримувала зразки тканини печінки, вивчала та аналізувала гістологічні препарати, проводила мікроморфометрію артерій малого калібру печінки, проводила підготовку статті до друку).*

17. Генна терапія в корекції морфогенезу експериментального атеросклерозу / Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, Н.М.Мрих, І.І.Піскун, О.А.Ромашкіна, А.А.Савицька// Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2011. – Спеціальний випуск № 4-.С.77 *(Здобувачем проводився експеримент, генна корекція та дослідження гістологічних змін в печінці піддослідних груп тварин, підготовка статті до друку )*.

18. Корекція морфофункціональних змін внутрішніх органів щурів при експериментальному атеросклерозі /Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, І.І.Піскун, О.А.Ромашкіна// Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2011. – № 5 ( 24 ). – С.249–250. *(Здобувач проводила постановку досліду, забір тканини печінки для гістологічного дослідження, мікроморфометрію судин малого калібру печінки, готувала статтю до друку).*

19. Піскун Р.П. Морфологічні особливості холестеринового цирозу печінки та його генної корекції у щурів / Р.П.Піскун, А.В.Білошицька, В.М.Истошин // VIII південноукраїнська науково-практична конференція Сучасні проблеми атеросклерозу – від гіпотез до фактів.- 11 квітня 2012 р. Одеса. – С.31–32. *(Здобувач проводила експеримент, вивчала та аналізувала гістологічні препарати, проводила генну корекцію, готувала статтю до друку )*.

20. Piskun R. The activity of hepatocyte enzymes of the rats during the experimental atherosclerosis and its geonotherapy / R. Piskun, A Biloshitska // International symposium on cell biology. Abstract book. – May 16-20 2012. – P.145. *(Здобувач проводила експеримент, вивчала та аналізувала гістологічні препарати, проводила мікроморфометрію судин тканини печінки дослідних тварин, готувала статтю до друку )*.

21. Piskun R. Ultra structural changes of renal corpuscles in experimental atherosclerosis in conditions of its gene correction / R. Piskun, O.Romashkina, S.Gorbatyuk, A.Biloshitska // International symposium on cell biology. Abstract book. – May 16-20. – 2012. – P.137. *(Здобувач проводила експеримент, вивчала та аналізувала гістологічні препарати, проводила оформлення матеріалів до друку).*

## АНОТАЦІЯ

**Білошицька А.В. Структурно-функціональні зміни печінки при експериментальному атеросклерозі та за умов генної корекції. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидати медичних наук за спеціальністю 14.03.01 – нормальна анатомія. Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2013.

Дисертація присвячена вивченню структурно-функціональних змін печінки при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції.

Експериментальний атеросклероз призводить до зміни макро- та мікроморфометричних показників печінки, порушення кровопостачання за рахунок зменшення площі просвіту та збільшення товщини стінки судин в порівнянні з групою інтактних тварин.. Порушується структура печінки за рахунок розростання сполучної тканини, виникає деструкція та дистрофія органел гепатоцитів.

Профілактичне та лікувальне внутрішньом'язове введення гену ароЕ для корекції патологічних змін печінки проявляє позитивну ефективність, що сприяє покращенню кровопостачання, відновленню лінійних показників та ультраструктури органу. Більшу ефективність проявляє профілактичне введення гена ароЕ в порівнянні з лікувальним введенням

**Ключові слова:** атеросклероз, генна корекція, печінка, гепатоцити, судинне русло.

## АННОТАЦІЯ

**Белошицкая А.В. Структурно-функциональные изменения печени при экспериментальном атеросклерозе и при условии генной коррекции.-** На правах рукопису.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – нормальная анатомия, Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И.Пирогова МЗ Украины, Винница, 2013.

В диссертации представлены результаты изучения структурно-функциональных особенностей печени при экспериментальном атеросклерозе и при его генной коррекции.

Модель экспериментального атеросклероза создавали по классической методике Аничкова путем скармливания животным холестерина с подсолнечным маслом. На протяжении 30 дней крысам внутрижелудочно с помощью зонда с оливой вводили холестерол в дозе 0,5 г/кг и дополнительно 4(6)-метил-2-тиоурацил в дозе 12 мг/кг для угнетения функции щитовидной железы. Подопытные животные были разделены на 5 групп. 1 группа – интактные животные, которые содержались в обычных условиях экспериментальной клиники, 2 группа – животные с угнетением функции щитовидной железы (12 мг/кг 4(6)-метил-2-тиоурацила ежедневно на протяжении 30 дней), 3 группа – животные с экспериментальным атеросклерозом, 4 группа –профилактическая, животные с экспериментальным атеросклерозом, которым в первый день внутримышечно вводили ген аполипопротеина Е (ген аро Е ) в дозе 50 мг ДНК на животное, 5 группа – лечебная, животные с экспериментальным атеросклерозом получали ген ароЕ в той же дозе на 15 день эксперимента.

Факт активной работы гена проверялся традиционной обратнотранскриптазной полимеразной цепочной реакцией.

Для оценки структурной перестройки печени использовали гистологический, гистохимический, микроморфометрический, электронномикроскопический методы. Из фиксированного в 10% растворе формалина материала изготавливали парафиновые блоки. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином, по Ван Гизону, а для выявления липидов в тканях печени – суданом черным В по Лизону. На срезах измеряли площадь гепатоцитов, площадь ядер гепатоцитов, паренхиматозно-стромальное соотношение, процент поврежденных и двухъядерных гепатоцитов. Микроморфометрию сосудов малого калибра печени проводили по методике С.В.Шорманова (1982).

Результаты биохимического исследования сыворотки крови животных с экспериментальной патологией показали увеличение всех показателей липидного обмена (общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, триглицеридов, общих липидов) и уменьшение липопротеинов высокой плотности. Результаты исследования уровня активности цитолитических ферментов сыворотки крови животных с экспериментальным атеросклерозом показали их увеличение (АЛТ и АСТ в 4 раза, ГГТ на 4,2%).

Результаты макроморфометрического исследования показали уменьшение массы тела на 16,50%, уменьшение массы печени на 23,00% уменьшение индекса печени на 8,30% у животных с экспериментальным атеросклерозом по сравнению с интактными животными. При исследовании артерий малого калибра печени выявлено увеличение площади поперечного сечения на 70,92%, увеличение площади стенки в 2,3 раза, утолщение самой стенки на 82,40% и суживание просвета артерий малого калибра на 30,00% по сравнению с интактными животными. В печени возникают явления дистрофии, деструкции, фиброза. Эти изменения наиболее выражены в перипортальной зоне, где процент поврежденных гепатоцитов увеличивается в 8 раз, стромально-паренхиматозное соотношение увеличивается на 61,30%, ядерно-цитоплазматическое соотношение увеличивается на 2,80% по сравнению с интактными животными. На ультраструктурном уровне наблюдается глубокая деструкция митохондрий, обращает на себя внимание появление большого количества миелиноподобных структур и липофусцина, расширение перисинусоидного пространства, появление большого количества капель липидов в цитоплазме гепатоцитов и клеток Ито, в перисинусоидном пространстве, сужение капилляров.

Введение гена аroE с профилактической и лечебной целью приводит к улучшению кровоснабжения печени: уменьшению толщины стенки (на 38,60 и на 34,00%, соответственно), расширению просвета артерий малого калибра (на 27,50 и на 22,00%, соответственно), нормализации цитогепатометрических показателей - в перипортальной зоне профилактической и лечебной групп снижается в 3,3 раза количество поврежденных гепатоцитов. Большую

эффективность оказывает профилактическое введение гена apoE. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейшего экспериментального и клинического изучения гена apoE при атеросклерозе.

**Ключевые слова:** атеросклероз, генная коррекция, печень, гепатоциты, сосудистое русло.

## ANNOTATION

**Biloshytska A.V. Structural and functional changes in the liver in experimental atherosclerosis and its gene correction.** – Manuscript

Dissertation for a scientific degree of candidate of medical sciences in speciality 14. 03. 01 - normal anatomy. Vinnitsa National Medical University named M.I. Pirogov of Ministry of Health of Ukraine, Vinnitsa, 2013

The dissertation is devoted to the investigation of the structural-functional changes of the liver in experimental atherosclerosis and its gene correction.

The experimental atherosclerosis results to the macro- and micromorphometrical changes of the liver indexes, the disturbances of the blood circulation owing to the decrease of the area of the vessels gap and increase of the vessel's wall thickness in compare with the intact group. The liver structural breaches are owing to the connective tissue's growing and the dystrophy of the liver's components.

The prophylactic and therapeutic intramuscular injection of the gene apoE for the pathological liver's changes manifest to the positive effect, which contribute to blood circulation improve, restore the linear indexes and liver's ultrastructure. In compare with the therapeutic the prophylactical injection of gene apoE is the most effective.

**Key words:** atherosclerosis, liver, hepatocytes, vessel gap, gene correction