

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М. І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГАЛАГАН ЮЛІЯ ВАСИЛІВНА

УДК 616-001.17:615.451.3

ДИСЕРТАЦІЯ
СТРУКТУРНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ НА ТЛІ
ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ
ДОСЛІДЖЕННЯ)

222 – «Медицина»

22 – «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ (підписано ЕП) __ Ю.В. Галаган

Наукові керівники:

Маєвський Олександр Євгенійович, доктор медичних наук,
професор;

Гумінський Юрій Йосипович, доктор медичних наук, професор.

Вінниця – 2023

АНОТАЦІЯ

Галаган Ю. В. Структурні зміни печінки щурів різного віку на тлі гіпергомоцистеїнемії (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина». – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2023.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання щодо встановлення змін структури печінки щурів різного віку, що поглиблюються на тлі хронічної гіпергомоцистеїнемії.

Дисертаційне дослідження здійснене відповідно до планів наукових досліджень Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри біологічної та загальної хімії: «Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфідів та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології» (номер державної реєстрації 0113U006461), «Роль екзогенних та ендогенних сірковмісних сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (номер державної реєстрації 0119U001142).

Експеримент проведено на 64 білих безпородних щурах-самцях (перманентна вага – 61-335 г), що отримані з віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Протягом дослідження експериментальних тварин розподіляли на групу контролю та групу досліду. Кожна з них поділялась на підгрупи в залежності від віку, а саме – молоді щури віком 1-2 місяці, дорослі щури – 6-8 місяців, старі щури – 24-26 місяців.

Хронічну стійку ГГц моделювали шляхом введення D,L-тіолактон гомоцистеїну гідрохлориду (Acros Organics, Італія) тваринам дослідної групи

в дозі 200 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково (в/шл) на 1% розчині крохмального гелю (1 мл /100 г маси щура) 1 раз на добу протягом 8 тижнів. Щурам групи контролю в/ш вводили 1 % розчин крохмального гелю (1 мл /100 г маси щура) 1 раз на добу упродовж 8 тижнів.

Для гістологічного дослідження забирали шматочки печінки у попередньо зважених тварин всіх груп та вивчали за допомогою методів світлової і електронної мікроскопії. Гомогенати печінки та зразки крові експериментальних щурів використовували для проведення біохімічних і лабораторних досліджень.

При світловій мікроскопії печінки інтактних молодих щурів встановлено, що гепатоцити мають полігональну форму, центрально розташоване сферичне ядро з одним або двома ядрцями. У молодих тварин зрідка зустрічаються двоядерні гепатоцити. Гістохімічні дослідження сукцинатдегідрогенази показали, що її вміст виявляється в цитоплазмі гепатоцитів у формі дрібних синіх грудок. Глікоген наявний в цитоплазмі гепатоцитів у формі дифузного, переважно рівномірного скупчення рожево-червоних, малинових гранул.

У зрілих щурів частіше зустрічаються двоядерні паренхіматозні клітини. Синусоїдні капіляри у зрілих щурів мають помірно розширений просвіт і тонку стінку. Сукцинатдегідрогеназа виявляється в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді скупчення невеликих синіх грудок, при цьому більша активність ферменту спостерігається в центролобулярній зоні печінкових часточок.

На відміну від молодих та зрілих щурів, у старих тварин в складі порталних трактів наявне розростання пухкої волокнистої сполучної тканини. Розміри гепатоцитів та їх ядер є незначно збільшені, порівняно з гепатоцитами зрілих тварин. Зростає кількість двоядерних гепатоцитів. Цитоплазма клітин зафарбовується нерівномірно оксифільно, у ній містяться ліпідні включення. У деяких клітинах спостерігається наявність включень ліпофусцину. Встановлено звуження просвіту синусоїдів, розширення перисинусоїдального простору та незначне потовщення периферійної частини

ендотеліальних клітин. Виявлено збільшення кількості клітин Купфера порівняно із зрілими тваринами. Активність сукцинатдегідрогенази дещо нижча порівняно з молодими і зрілими інтактними тваринами, щільність глікогену була нижчою порівняно із молодими та зрілими інтактними тваринами.

При гістологічному дослідженні печінки молодих щурів за умов гіпергомоцистеїнемії виявили деструктивні зміни в органі, які розвивались на тлі порушення кровопостачання. Встановлено незначне потовщення навколочасточкової сполучної тканини, особливо в складі портальних трактів. Альтеративні зміни проявлялись в цитоплазмі гепатоцитів, в більшості клітин спостерігалась вакуольно-гідропічна та жирова дистрофія. Встановлено, що гіпергомоцистеїнемія провокує розвиток структурних змін у судинному руслі печінки. При гістохімічному вивченні сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену в гепатоцитах виявлено зниження активності та їх нерівномірну локалізацію в часточках печінки.

У зрілих тварин при гіпергомоцистеїнемії виявлені більш виражені структурні зміни в органі, порівняно з молодими тваринами: помітне потовщення волокнистої сполучної тканини навколо часточок та в складі портальних трактів, дисконплектація печінкових балок, подекуди зустрічались осередки некрозу паренхіми печінки. Також спостерігались гіпертрофії та гіперплазії гладких міоцитів в середній оболонці та фіброз зовнішньої оболонки стінки міжчасточкових артерій. Наявна лейкоцитарна інфільтрація в портальних трактах. Гістохімічно встановлене значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену, у частини клітин цитоплазма практично позбавлена цих сполук.

Негативний вплив змодельованої гіпергомоцистеїнемії на морфологію печінки найбільш вираженим був у старих тварин. Виявлено фіброз органу, зріс вміст колагенових волокон в перисинусоїдальних просторах, а також в просторах між гепатоцитами. У цитоплазмі клітин виявлено яскраво виражену жирову дистрофію. Також у цій групі тварин осередки некрозу гепатоцитів

були більшими, ніж у тварин інших експериментальних груп. Глибокі структурні зміни виявлялись в судинному та мікроциркуляторному руслі печінки старих тварин. Гістохімічне дослідження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену в даній групі тварин показали їх значне зниження, тільки деякі гепатоцити містили в цитоплазмі грудки диформазану та глікогену.

При електронно-мікроскопічному дослідженні печінки інтактних молодих щурів печінкові пластинки утворені двома рядами гепатоцитів, які обмежують вузькі просвіти жовчних каналців. Подекуди між гепатоцитами виявляли поодинокі жиронакопичувальні клітини, які мали округлу, видовжену або неправильну форму з великим ядром. Відростки цих клітин інтергепатоцелюлярні та субендотеліальні. В просвітах синусоїдів розташовувались формені елементи крові, зірчасті макрофагоцити з ядрами бобоподібної форми.

При ультраструктурному дослідженні печінки інтактних зрілих щурів встановлено, що в цитоплазмі гепатоцитів чисельність включень глікогену, мілких крапель жиру, а також вміст колагенових волокон була більшою, ніж у молодих щурів контрольної групи.

У інтактних старих щурів матрикс в деяких мітохондріях гепатоцитів був просвітленим. В цитоплазмі окремих клітин спостерігались аутофагосоми, в поодиноких полях зору виявляли розширені простори жовчних каналців. Чисельність колагенових волокон в перисинусоїдних просторах переважала таку у молодих та зрілих тварин. В гепатоцитах краплі жиру виявляли частіше, ніж у молодих та зрілих тварин.

При експериментальній гіпергомоцистеїнемії матрикс мітохондрій гепатоцитів печінки молодих щурів був просвітлений, кристи подекуди деструктуровані, однак зовнішня мембрана не зруйнована. Спостерігалось збільшення кількості та розміру крапель жиру. Просвіти жовчних каналців та перисуносоїдні простори були розширені. Відмічалась проліферація жиронакопичувальних клітин. Цитоплазма ендотеліоцитів в стінках синусоїдів

набрякла. В просвітах синусоїдів розташовані зірчасті макрофагоцити, лейкоцити, складжі еритроцитів і тромбоцитів, які контактують з ендотеліоцитами.

У щурів зрілого віку за умов гіпегомоцистеїнемії ультраструктурні зміни в гепатоцитах, ендотеліоцитах стінок синусоїдів, зірчастих макрофагоцитах мали дистрофічний та деструктивний характер. Спостерігалась трансформація жиронакопичувальних клітин в фібробласти.

При експериментальній гіпергомоцистеїнемії в печінці старих щурів відбувались зміни в усіх структурних компонентах. В ендотелії судин спостерігалась деструкція мітохондрій, поряд з деструктованими, виявляли гіпертрофовані органели. Порушення структури ендотеліоцитів призводило до посилення адгезії тромбоцитів, еритроцитів і лейкоцитів. Виникали складжі еритроцитів в просвітах синусоїдів, зростала чисельність зірчастих макрофагоцитів і посилювалась їх міграція в пересинусоїдні простори. Менша кількість жиронакопичувальних клітин вказувала на їх трансформацію в фібробласти, що призводило до розростання колагенових волокон, розширення пересинусоїдних просторів та потовщення бар'єру між кров'ю і гепатоцитами, порушення транспорту речовин, гіпоксії, та створювало умови для розвитку гідропічної, і жирової дистрофії гепатоцитів.

При біохімічному дослідженні крові та гомогенатів печінки щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії встановлено, що патогенез даного патологічного процесу супроводжується протеолітичним дисбалансом у печінці, який виявляється у підвищенні загальної протеолітичної активності, активності серинових протеаз і особливо активності метало-залежних ферментів. Зростання рівня MMP-1, MMP-2 і MMP-3 вказує на участь цих ферментів в посиленні протеолізу, опосередкованого метало-залежними ферментами.

Таким чином, проведенні дослідження печінки на різних рівнях структурної організації у всіх вікових груп піддослідних інтактних тварин показали, що печінка має типову будову, яка характерна для даного виду

тварин. Встановлено, що в стромальних та паренхіматозних компонентах печінки старих тварин вікові зміни проявляються у вигляді порушення кровопостачання органу, незначним потовщенням сполучної тканини та зростанням кількості ліпідних включень у гепатоцитах.

Дослідження структурної організації печінки різних вікових груп при змодельованій гіпергомоцистеїнемії показали, що даний чинник викликає значні пошкодження структурних компонентів органа, глибина яких посилюється з віком. Патологічний вплив гіпергомоцистеїнемії проявляється розвитком фіброзу печінки, значними порушеннями судинного русла, глибокими альтеративними та некротичними змінами з розвитком жирової дистрофії гепатоцитів в органі.

На тлі гіпергомоцистеїнемії в печінці щурів всіх вікових груп відмічається підвищення загальної протеолітичної активності, активності метало-залежних ферментів, а також протеолітична деградація серинових протеаз, що підтверджується змінами якісного складу цих ферментів, зокрема накопиченням низькомолекулярних білків і зниженням частки білків з молекулярною масою понад 50 кДа у даній фракції.

Ключові слова: печінка, щури, гомоцистеїн, H₂S/сірководень, гіпергомоцистеїнемія, цистатіонін бета-синтаза, мітохондрії, ендотеліальна дисфункція, вікові зміни, протеоліз, запалення, гепатотоксичність, цироз печінки, захворювання печінки.

ANNOTATION

Halahan Y. V. Structural changes in the liver of rats of different ages against the background of hyperhomocysteinemia (experimental research). – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 "Health care" in the specialty 222 "Medicine". –National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2023.

The dissertation provides a theoretical generalization and a new solution of the current scientific problem of establishing changes in the liver structure of rats of different ages, which deepen against the background of chronic hyperhomocysteinemia.

The dissertation research was carried out in accordance with the scientific research plans of the National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya and is a fragment of the research works of the Department of Biological and General Chemistry: "Influence of exogenous and endogenous factors on the exchange of hydrogen sulfide and associated metabolic processes in normal and pathological conditions" (state registration number 0113U006461), "The role of exogenous and endogenous sulfur-containing compounds in the mechanisms of internal organs damage and cytoprotection in various pathological conditions" (state registration number 0119U001142).

The experiment was carried out on 64 white outbred male rats (permanent weight – 61-335 g) obtained from the vivarium of the National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya. During the study, the experimental animals were divided into a control group and an experimental group. Each of them was divided into subgroups depending on age, namely, young rats aged 1-2 months, adult rats – 6-8 months, old rats – 24-26 months..

Chronic resistance HHCys was modeled by administering D,L-thiolactone homocysteine hydrochloride (Acros Organics, Italy) to animals of the experimental group at a dose of 200 mg/kg body weight intragastrically on a 1% solution of starch gel (1 ml/100 g of rat weight) once a day for 8 weeks. Rats of the control group were intragastrically injected with a 1% starch gel solution (1 ml/100 g of rat weight) once a day for 8 weeks.

For histological examination, pieces of liver were taken from pre-weighed animals of all groups and studied using the methods of light and electron microscopy. Liver homogenates and blood samples of experimental rats were used for biochemical and laboratory studies.

Light microscopy of the liver of intact young rats revealed that hepatocytes have a polygonal shape, a centrally located spherical nucleus with one or two nucleoli. Binucleated hepatocytes are occasionally found in young animals. Histochemical studies of succinate dehydrogenase showed that its content is found in the cytoplasm of hepatocytes in the form of small blue lumps. Glycogen is present in the cytoplasm of hepatocytes in the form of a diffuse, mostly uniform cluster of pink-red, crimson granules.

Binucleated parenchymal cells are more common in mature rats. Sinusoidal capillaries in mature rats have a moderately widened lumen and a thin wall. Succinate dehydrogenase is detected in the cytoplasm of hepatocytes in the form of a cluster of small blue lumps, while greater activity of the enzyme is observed in the centrolobular zone of the liver lobules.

In contrast to young and mature rats, old animals have an overgrowth of loose fibrous connective tissue in the portal tracts. The sizes of hepatocytes and their nuclei are slightly increased compared to hepatocytes of mature animals. The number of binucleated hepatocytes increases. Cytoplasm of cells is stained unevenly oxyphilically, it contains lipid inclusions. Lipofuscin inclusions are observed in some cells. A narrowing of the lumen of the sinusoids, an expansion of the perisinusoidal space, and a slight thickening of the peripheral part of the endothelial cells were established. An increase in the number of Kupffer cells was detected compared to mature animals. Succinate dehydrogenase activity was slightly lower compared to young and mature intact animals, glycogen density was lower compared to young and mature intact animals.

During histological examination of the liver of young rats under conditions of hyperhomocysteinemia, destructive changes in the organ were revealed, which developed against the background of impaired blood supply. A slight thickening of the perilobular connective tissue was established, especially in the composition of the portal tracts. Alterative changes were manifested in the cytoplasm of hepatocytes, vacuole-hydropic and fatty dystrophy was observed in most cells. It has been established that hyperhomocysteinemia provokes the development of structural

changes in the vascular bed of the liver. A histochemical study of succinate dehydrogenase and glycogen content in hepatocytes revealed a decrease in activity and their uneven localization in the liver lobules.

In mature animals with hyperhomocysteinemia, more pronounced structural changes in the organ were found, compared to young animals: noticeable thickening of fibrous connective tissue around the lobules and in the composition of the portal tracts, dyscompletion of the liver plates, in some places there were foci of necrosis of the liver parenchyma. Hypertrophy and hyperplasia of smooth myocytes in the tunica media and fibrosis of the tunica adventitia of the interlobular arteries wall were also observed. There is leukocyte infiltration in the portal tracts. A significant decrease in succinate dehydrogenase activity and glycogen content was established histochemically, in some cells the cytoplasm is practically devoid of these compounds.

The negative effect of simulated hyperhomocysteinemia on liver morphology was most pronounced in old animals. Fibrosis of the organ was detected, the content of collagen fibers increased in the perisinusoidal spaces, as well as in the spaces between hepatocytes. Pronounced fatty dystrophy was found in the cytoplasm of the cells. Also, in this group of animals, hepatocyte necrosis centers were larger than in animals of other experimental groups. Profound structural changes were detected in the vascular and microcirculatory channel of the liver of old animals. Histochemical study of succinate dehydrogenase activity and glycogen content in this group of animals showed their significant decrease, only some hepatocytes contained clumps of diformazan and glycogen in the cytoplasm.

In the electron microscopic examination of the liver of intact young rats, the liver plates are formed by two rows of hepatocytes, which limit the narrow lumen of the bile ducts. In some places between the hepatocytes, single fat-accumulating cells were found, which had a rounded, elongated or irregular shape with a large nucleus. The processes of these cells are interhepatocellular and subendothelial. Formal blood elements, stellate macrophages with bean-shaped nuclei were located in the lumens of the sinusoids.

During the ultrastructural examination of the liver of intact mature rats, it was established that the number of glycogen inclusions, small drops of fat, and the content of collagen fibers in the cytoplasm of hepatocytes was greater than in young rats of the control group.

In intact old rats, the matrix in some mitochondria of hepatocytes was lightened. Autophagosomes were observed in the cytoplasm of individual cells, expanded spaces of bile ducts were revealed in individual fields of view. The number of collagen fibers in the perisinusoidal spaces was greater than that in young and mature animals. Drops of fat were detected in hepatocytes more often than in young and mature animals.

In experimental hyperhomocysteinemia, the mitochondrial matrix of liver hepatocytes of young rats was enlightened, the cristae were destructured in some places, but the outer membrane was not destroyed. An increase in the number and size of fat droplets was observed. The lumen of the bile ducts and perisinusoidal spaces were expanded. Proliferation of fat-storing cells was noted. The cytoplasm of endotheliocytes in the walls of the sinusoids is swollen. In the lumens of the sinusoids there are stellate macrophages, leukocytes, sludge of erythrocytes and platelets, which are in contact with endotheliocytes.

In adult rats under conditions of hypohomocysteinemia, ultrastructural changes in hepatocytes, endotheliocytes of sinusoidal walls, and stellate macrophages were dystrophic and destructive in nature. The transformation of fat-storing cells into fibroblasts was observed.

During experimental hyperhomocysteinemia, changes in all structural components occurred in the liver of old rats. In the endothelium of blood vessels, destruction of mitochondria was observed, along with destructured, hypertrophied organelles were found. Violation of the structure of endotheliocytes led to increased adhesion of platelets, erythrocytes and leukocytes. Sludges of erythrocytes appeared in the lumens of the sinusoids, the number of stellate macrophages increased, and their migration into the sinusoidal spaces increased. A smaller number of fat-storing cells indicated their transformation into fibroblasts, which led to the growth of

collagen fibers, expansion of the sinusoidal spaces and thickening of the barrier between blood and hepatocytes, impaired transport of substances, hypoxia, and created conditions for the development of hydropic and fatty dystrophy of hepatocytes.

During the biochemical study of blood and liver homogenates of rats of different ages under conditions of hyperhomocysteinemia, it was established that the pathogenesis of this pathological process is accompanied by a proteolytic imbalance in the liver, which is manifested in an increase in the general proteolytic activity, the activity of serine proteases, and especially the activity of metal-dependent enzymes. An increase in the level of MMP-1, MMP-2 and MMP-3 indicates the participation of these enzymes in the enhancement of proteolysis mediated by metal-dependent enzymes.

Thus, liver research at different levels of structural organization in all age groups of intact experimental animals showed that the liver has a typical structure that is characteristic of this species of animal. It was established that in the stromal and parenchymal components of the liver of old animals, age-related changes are manifested in the form of impaired blood supply of the organ, slight thickening of connective tissue, and an increase in the number of lipid inclusions in hepatocytes.

Studies of the structural organization of the liver of different age groups with simulated hyperhomocysteinemia have shown that this factor causes significant damage of the structural components of the organ, the depth of which increases with age. The pathological effect of hyperhomocysteinemia is manifested by the development of liver fibrosis, significant violations of the vascular bed, deep alterative and necrotic changes with the development of fatty dystrophy of hepatocytes in the organ.

Against the background of hyperhomocysteinemia in the liver of rats of all age groups, an increase in total proteolytic activity, activity of metal-dependent enzymes, as well as proteolytic degradation of serine proteases is noted, which is confirmed by changes in the qualitative composition of these enzymes, in particular,

the accumulation of low-molecular-weight proteins and a decrease in the proportion of proteins with a molecular weight of more than 50 kDa in this fraction.

Key words: liver, rats, homocysteine, H₂S/hydrogen sulfide, hyperhomocysteinemia, cystathionine beta-synthase, mitochondria, endothelial dysfunction, age-related changes, proteolysis, inflammation, hepatotoxicity, liver cirrhosis, liver disease.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Halahan, Y. (2020). Submicroscopic changes in the liver of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 26(1), 19-23. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26\(1\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26(1)-03).

2. Raksha, N., Halahan; Y., Guminskyi; Y., & Maievskyi, O (2021). Disorders of proteolytic homeostasis in the liver of rats with hyperhomocysteinemia. *Biomedical Research and Therapy*, 8(9), 4439-4446. (*Web of Science*) <http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/682>.

3. Maievskyi, O. Y., & Halahan, Y. V. (2023). Microscopic and histochemical changes in the liver of adult rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 29(1), 4-8. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(1\)-01](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(1)-01).

4. Halahan, Y. V. (2023). Histological and histochemical changes in liver tissue of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 27(1), 6-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-01](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-01).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

5. Галаган Ю. В. (2023). *Особливості гістологічних змін тканини печінки старих щурів при змодельованій гіпергомоцистеїнемії*. Збірник тез

доповідей 92-а науково-практичної конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (стор. 198). Івано-Франківськ.

6. Галаган Ю. В. (2023). *Електронно-мікроскопічні зміни в печінці щурів віком 1-2 місяці за умов гіпергомоцистеїнемії*. Збірник матеріалів Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (III Жутаєвські читання) (стор. 18). Полтава.

7. Галаган Ю. В. (2023). *Порівняння особливостей структурних змін печінки молодих та зрілих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії*. Збірник тез наукових робіт учасників XX Наукової конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку – 2023» (стор. 591). Вінниця.

8. Галаган Ю. В. (2023). *Features of histological changes in liver tissue of old rats with simulated hyperhomocysteinemia*. Збірник матеріалів науково-практичної конференції «Формування науки: стан і перспективи розвитку в умовах сьогодення» (стор. 76). Київ.

9. Галаган Ю. В. (2023). *Порушення протеолітичного гомеостазу у печінці щурів з моделлю гіпергомоцистеїнемії*. Збірник тез доповідей XIX Наукової конференції “Львівські хімічні читання – 2023” (стор. 198). Львів.

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

10. Halahan, Y. V., Maievskiy, O. Y., Guminskyi, Y. Y., & Korol, A. P. (2019). The effect of hyperhomocysteinemia on the patterns of electron microscopic changes in the liver of adult rats. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (36), 16-21. <https://doi.org/10.31393/bba36-2019-03>.

11. Halahan, Y. V., Maievskiy, O. Y., Guminskyi, Y. Y., Korol, A. P., & Prokopenko, S. V. (2019). Features of electron microscopic changes in the liver of rats aged 24-26 months under conditions of hyperhomocysteinemia. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (37), 60-65. <https://doi.org/10.31393/bba37-2019-10>.

ЗМІСТ

	стор.
АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	17
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОСОБЛИВОСТІ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ПЕЧІНКИ В ПРОЦЕСІ ОНТОГЕНЕЗУ. РОЛЬ ГОМОЦИСТЕЇНУ В ПАТОГЕНЕЗІ ВИНИКНЕННЯ ТА ПРОГРЕСУВАННЯ УРАЖЕНЬ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	26
1.1. Особливості змін структури печінки в різні періоди онтогенезу	26
1.2. Загальні уявлення про гомоцистеїн та його роль в патології захворювань	33
РОЗДІЛ 2 ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА Й ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	46
2.1. Загальна методика та об'єкти дослідження	46
2.2. Методи дослідження	48
2.2.1. Лабораторні та біохімічні.	48
2.2.2. Гістологічні.	56
2.2.3. Ультраструктурні.	56
2.2.4. Гістохімічні.	56
2.2.5. Статистичного аналізу.	57
РОЗДІЛ 3 БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ	58

РОЗДІЛ 4	МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ	72
4.1	Мікроскопічна будова печінки інтактних молодих щурів	72
4.2.	Мікроскопічна будова печінки інтактних зрілих щурів	74
4.3.	Мікроскопічна будова печінки інтактних старих щурів	76
4.4.	Особливості гістологічних змін печінки молодих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії	78
4.5.	Особливості гістологічних змін печінки зрілих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії	82
4.6.	Особливості гістологічних змін печінки старих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії	84
РОЗДІЛ 5	ДИНАМІКА УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ ЗМІН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ	89
5.1.	Ультраструктура печінки інтактних молодих щурів	89
5.2.	Електронно-мікроскопічна будова печінки інтактних зрілих щурів	93
5.3.	Електронно-мікроскопічна будова печінки інтактних старих щурів	98
5.4.	Електронно-мікроскопічна будова печінки молодих щурів при гіпергомоцистеїнемії	103
5.5.	Електронно-мікроскопічна будова печінки щурів зрілого віку при гіпергомоцистеїнемії	109
5.6.	Електронно-мікроскопічна будова печінки старих щурів при гіпергомоцистеїнемії	113
	АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	120
	ВИСНОВКИ	132
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	135
	ДОДАТКИ	162

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ**

АДФ – аденозиндифосфат
АМРА – асиметричний диметиларгінін
АФК – активні форми кисню
ГГц – гіпергомоцистеїнемія
Гц – гомоцистеїн
ГЦК – гепатоцелюлярна карцинома
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ДСН – додецилсульфат натрію
ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота
ЕПС – ендоплазматична сітка
ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності
МАТ – S-аденозилметіонінсинтетаза
МДА – малоновий діальдегід
МСМ – молекули середньої маси
НАДФН – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки
ОРД – о-фенілендіамін
ОС – окисний стрес
ПААГ – поліакриламідний гель
ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів
СРБ – С-реактивний білок
ТМБ – тетраметилбензидин
ТХО – трихлороцтова кислота
ХОЗЛ – хронічне обструктивне захворювання легень
ЦД – цукровий діабет

ЦП – цироз печінки
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
BHMT – бетаїн-гомоцистеїн-S-метилтрансфераза
CBS – цистатіонін β -синтаза
CSE – цистатіонін γ -ліаза
GP – глутатіон пероксидаза
H₂S – гідроген сульфід
HMGR – гідроксиметилглутирил-КоА-редуктаза
MAPK – мітогенактивована протеїнкіназа
MMP – матриксні металопротеїнази
MS – метіонінсинтаза
MTHFR – метилентетрагідрофолатредуктаза
NF- κ B – некротичний фактор капа- β
NMDA – N-метил-D-аспартат
NO – оксид азоту
NOS – синтаза оксиду азоту
PMSF – фенілметилсульфонілфторид
SAH – S-аденозилгомоцистеїн
SAHH – S-аденозилгомоцистеїнгідролаза
SAM – S-аденозилметіонін
SDH – сукцинатдегідрогеназа
SOD – супероксиддисмутаза
TGF β – трансформуючий фактор росту β
TIMP – тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ
TNF- α – туморонекротичний фактор α

ВСТУП

Актуальність теми. Хронічні захворювання гепатобіліарної системи є надзвичайно поширеними в світі. Згідно даних ВООЗ, патологічні зміни в будові та функціях печінки діагностують у понад 2 мільярдів людей, при цьому смертність від зазначених захворювань за останні 20 років збільшилася вдвічі [6].

Проблема хронічних дифузних захворювань печінки на сьогодні є однією з найбільш важливих в сучасній гастроентерології і визначається насамперед тяжкістю прогнозу, складністю діагностики та лікування, має загальномедичне і соціальне значення [61].

Аналіз основних причин хронічних захворювань гепатобіліарної системи в Україні показав, що найбільш частими є неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП), цироз печінки (ЦП), гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК) та вірусні гепатити [6]. Згідно даних наукової літератури, НАЖХП є однією з найбільш поширених та має яскраво виражену тенденцію до зростання. Значна розповсюдженість і мультисистемність даної патології привертають увагу дослідників в Україні і світі [58].

Згідно даних ВООЗ, кількість людей з захворюваннями печінки з кожним роком збільшується. НАЖХП зустрічається у всіх вікових групах і становить 14 – 30% від загальної популяції. У деяких країнах НАЖХП трапляється у третини дорослого населення. Дане захворювання асоціюється з ожирінням та інсулінорезистентністю, вважається печінковим проявом метаболічного синдрому, часто поєднується із цукровим діабетом 2 типу та гіпертонічною хворобою.

НАЖХП охоплює спектр станів від доброякісного гепатоцелюлярного стеатозу до запального неалкогольного стеатогепатиту, фіброзу та цирозу. Більшість гепатоцелюлярних ліпідів накопичуються у вигляді тригліцеридів, але присутні й інші ліпідні метаболіти, такі як вільні жирні кислоти,

холестерин та фосфоліпіди, що можуть грати роль у прогресуванні даного захворювання [184].

Поширеність НАЖХП у країнах Європи складає 25-26% з варіаціями в різних групах населення. Статистика свідчить що, розповсюженість НАЖХП серед дорослих в Греції – 31%, Німеччині – 30%, Італії – 26%, Іспанії – 25,8%, Румунії – 20% [73].

Не дивлячись на значні досягнення сучасної науки у вивченні ролі ГЦ в патогенезі багатьох захворювань внутрішніх органів, на сьогоднішній день відкритим залишається питання щодо морфологічних змін структури печінки.

Таким чином, вивчення особливостей структурної організації печінки є надзвичайно актуальним завданням, оскільки дає змогу визначити патогенетичні механізми розвитку захворювань, удосконалити методи їх діагностики та адекватного лікування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження здійснене відповідно до планів наукових досліджень Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри біологічної та загальної хімії: «Вплив екзогенних та ендогенних чинників на обмін гідроген сульфідів та асоційованих з ним метаболічних процесів в нормі та при патології» (номер державної реєстрації 0113U006461), «Роль екзогенних та ендогенних сірковмісних сполук в механізмах ураження внутрішніх органів та цитопротекції за різних патологічних станів» (номер державної реєстрації 0119U001142).

Мета дослідження – вивчення особливостей морфологічних та біохімічних змін печінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії залежно від віку.

Завдання дослідження:

1. Встановити гістологічні та ультраструктурні особливості печінки інтактних щурів залежно від віку за умов нормального рівня гомоцистеїну плазми крові.

2. Виявити морфологічні зміни печінки щурів різного віку в умовах підвищеного рівня гомоцистеїну плазми крові.

3. Встановити ультраструктурні зміни в печінці щурів різного віку в умовах гіпергомоцистеїнемії.

4. Визначити біохімічні показники в печінці щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії та оцінити їх зв'язок з гістологічними та ультраструктурними змінами.

Об'єкт дослідження – Особливості пошкодження та адаптивних змін у печінці щурів за умов гіпергомоцистеїнемії.

Предмет дослідження – Гістологічні, ультраструктурні та біохімічні зміни печінки щурів на тлі гіпергомоцистеїнемії в різних вікових групах.

Методи дослідження: гістологічний та гістохімічний – для дослідження мікроскопічних змін структури печінки; електронно-мікроскопічний – для визначення ультрамікроскопічних проявів реактивних змін у печінці щурів; біохімічний – для об'єктивної оцінки перебігу адаптивних та деструктивних процесів в печінці щурів за умов експерименту; статистичного аналізу – для забезпечення передбачених описовою статистикою процедур визначення статистичної значущості розбіжностей між групами порівняння.

Наукова новизна одержаних результатів. В ході проведеного дослідження вперше встановлені гістологічні, ультрамікроскопічні та біохімічні зміни печінки різних за віком щурів та за умов гіпергомоцистеїнемії. Розширені уявлення про *гістологічні (у молодих тварин* – зрідка зустрічаються двоядерні гепатоцити, вміст сукцинатдегідрогенази виявляється в цитоплазмі гепатоцитів у формі дрібних синіх грудок, а глікоген наявний у формі дифузного, переважно рівномірного скупчення рожево-червоних, малинових гранул; *у зрілих щурів* – частіше зустрічаються двоядерні паренхіматозні клітини, синусоїдні капіляри мають помірно розширений просвіт і тонку стінку, більша активність сукцинатдегідрогенази спостерігається в центролобулярній зоні печінкових часточок; *у тварин старого віку* – в складі портальних трактів наявне розростання пухкої

волокнистої сполучної тканини, зростає кількість двоядерних гепатоцитів, у деяких клітинах спостерігається наявність включень ліпідів та ліпофусцину, збільшення кількості клітин Купфера при зниженні активності сукцинатдегідрогенази та щільності глікогену в гепатоцитах), *ультраструктурні* (у молодих тварин – подекуди між гепатоцитами виявляються поодинокі жиронакопичувальні клітини округлої, видовженої або неправильної форми з великим ядром, відростки цих клітин інтергепатоцелюлярні та субендотеліальні, в просвітах синусоїдів розташовувались формені елементи крові, зірчасті макрофагоцити з ядрами бобоподібної форми; у щурів зрілого віку – в цитоплазмі гепатоцитів збільшується чисельність включень глікогену, мілких крапель жиру, а також вміст колагенових волокон; у щурів старого віку – матрикс в деяких мітохондріях гепатоцитів просвітлений, в цитоплазмі окремих клітин спостерігаються аутофагосоми, в поодиноких полях зору виявляються розширені простори жовчних каналців, збільшена чисельність колагенових волокон в перисинусоїдних просторах та крапель жиру в гепатоцитах) та *біохімічні* (зниження рівня серинових протеаз в досліджуваному органі з віком) зміни в структурі печінки щурів різного віку при нормальному рівні гомоцистеїну.

При гістологічному дослідженні вперше встановлено, що на тлі гіпергомоцистеїнемії в печінці молодих щурів спостерігається незначне потовщення навколочасточкової сполучної тканини, в більшості клітин вакуольно-гідропічна та жирова дистрофія, зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену в гепатоцитах, їх нерівномірна локалізація в часточках печінки; у дорослих тварин – помітне потовщення волокнистої сполучної тканини навколо часточок та в складі портальних трактів, дисконплектація печінкових балок, осередки некрозу паренхіми печінки, гіпертрофія та гіперплазія гладких міоцитів середньої оболонки та фіброз зовнішньої оболонки стінки міжчасточкових артерій, лейкоцитарна інфільтрація портальних трактів, значне зниження активності

сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену; у щурів старого віку – фіброз печінки, зрістання вмісту колагенових волокон в перисинусоїдальних просторах та просторах між гепатоцитами, у цитоплазмі клітин виражена жирова дистрофія, збільшення осередків некрозу гепатоцитів, значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену.

Вперше на ультрамікроскопічному рівні встановлено, що структурні зміни печінки у молодих щурів за умов гіпергомоцистеїнемії проявляються просвітленням матриксу мітохондрій гепатоцитів, збільшенням кількості та розміру крапель жиру, розширенням просвітів жовчних каналців та перисинусоїдних просторів, проліферацією жиронакопичувальних клітин, набряккістю цитоплазми ендотеліоцитів в стінках синусоїдів, складжаними еритроцитів і тромбоцитів, які контактують з ендотеліоцитами; у дорослих тварин ультраструктурні зміни в гепатоцитах, ендотеліоцитах стінок синусоїдів, зірчастих макрофагоцитах мали дистрофічний та деструктивний характер, спостерігалась трансформація жиронакопичувальних клітин в фібробласти; у старих щурів – деструкція мітохондрій в ендотелії судин, деструкція та гіпертрофія органел, посилення адгезії тромбоцитів, еритроцитів та лейкоцитів, складжі еритроцитів в просвітах синусоїдів, зростання чисельності зірчастих макрофагоцитів і посилення їх міграції в перисинусоїдні простори, зменшення кількості жиронакопичувальних клітин і, відповідно, розростання колагенових волокон, розширення перисинусоїдних просторів та потовщення бар'єру між кров'ю і гепатоцитами, порушення транспорту речовин, гіпоксії, гідропічна та жирова дистрофія гепатоцитів.

При біохімічному дослідженні зразків крові та гомогенатів печінки щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії вперше доведено зростання загальної протеолітичної активності у даному органі тварин всіх експериментальних груп, підвищення активності метало-залежних ферментів, накопичення низькомолекулярних білків та зниження частки білків з молекулярною масою понад 50 кДа, зростання рівня деяких ММП, зокрема ММП-1, ММП-2 і ММП-3.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані морфологічного та біохімічного досліджень тканини, зразків крові та гомогенату печінки щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії свідчать про розвиток негативних гісто-, ультраструктурних та біохімічних змін структури печінки, що зумовлює необхідність в подальшому продовження досліджень щодо використання відповідних корегуючих заходів.

Результати досліджень використовуються в лекційних курсах та в ході проведення практичних занять на кафедрах: гістології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова; гістології, гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; гістології, цитології та ембріології Полтавського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Авторка брала участь у постановці та проведенні експериментального дослідження. Самостійно провела забір і підготовку матеріалу для гістологічного дослідження. Здобувачкою особисто виконано патентно-інформаційний пошук, аналіз наукової літератури та написаний її аналітичний огляд, описані всі глави власних досліджень дисертаційної роботи, здійснено розробку основних теоретичних та практичних положень проведеного дослідження. Разом з науковими керівниками проведено аналіз отриманих результатів і сформульовані висновки. Електронно-мікроскопічні дослідження виконані за консультативною допомогою д.б.н., проф. З. М. Небесної (кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського). Біохімічні дослідження виконані за консультативною допомогою д.б.н, проф. О. М. Савчука (кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка). У сумісних з науковими керівниками та колегами публікаціях

здобувачу належать основні результати стосовно гістологічних та електронномікроскопічних змін у печінці щурів при гіпергомоцистеїнемії.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладені та обговорені на 92-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (Івано-Франківськ, 2023); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (III Жутаєвські читання) (Полтава, 2023); XX Науковій конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку – 2023» (Вінниця, 2023); науково-практичній конференції «Формування науки: стан і перспективи розвитку в умовах сьогодення» (Київ, 2023); XIX Науковій конференції “Львівські хімічні читання – 2023” (Львів, 2023).

Публікації. Оpubліковано 11 наукових праць, з яких 7 самостійних. 3 статті опубліковано в наукових фахових журналах України. 3 статті опубліковано в закордонних наукових фахових журналах (В'єтнам – 1 стаття, що відноситься до міжнародної наукометричної бази Scopus; Польща – 2 статті). 5 тез в матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 172 сторінках. Робота складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, аналітичного огляду літератури, загальної методики й основних методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків, списку літературних джерел, з яких 66 викладені кирилицею і 154 – латиницею, та додатків. Дисертаційне дослідження ілюстровано 52 рисунками та 7 таблицями.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОСОБЛИВОСТІ МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ПЕЧІНКИ В ПРОЦЕСІ ОНТОГЕНЕЗУ. РОЛЬ ГОМОЦИСТЕЇНУ В ПАТОГЕНЕЗІ ВИНИКНЕННЯ ТА ПРОГРЕСУВАННЯ УРАЖЕНЬ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Особливості змін структури печінки в різні періоди онтогенезу

В організмі кожної людини в процесі життя відбувається цілий ряд змін, які в кінцевому рахунку, призводять його до старіння. Цей процес, що має назву інволюції, починається набагато раніше, ніж настає період біологічного старіння, а швидкість його розвитку сильно корелює зі способом життя в молодому і зрілому віці, а також залежить від особливостей пренатального онтогенезу [175].

Печінка починає розвиватись в кінці третього тижня ембріонального розвитку. Її зачаток формується з вентральної стінки дванадцятипалої кишки. В цій ділянці високі епітеліальні клітини формують так зване печінкове поле. Згідно даних наукових джерел, в подальшому в ділянці печінкового поля вентральна стінка дванадцятипалої кишки вип'ячується і вростає у вентральну брижу [209, 157]. Таке вип'ячування носить назву печінкової бухти і поділяється на два відділи – краніальний і каудальний. Краніальний відділ дає початок розвитку печінки і її проток, а каудальний – жовчного міхура та міхурових проток. З устя печінкової бухти, в місці поділу її на краніальний та каудальний відділи, формується загальна жовчна протока [215].

Слід зазначити, що джерелом розвитку гепатоцитів та епітелію жовчовивідних шляхів і жовчного міхура є ентодерма. Сполучна тканина печінки (капсула, перегородки), м'язова тканина жовчовивідних шляхів та

жовчного міхура, кровоносні, лімфатичні судини розвиваються з мезенхіми. Серозна оболонка печінки формується з вісцерального листка спланхнотому та мезенхіми [97].

Дані наукових досліджень свідчать, що в краніальному відділі печінкової бухти епітеліальні клітини поступово розростаються, формують багаточисельні тяжі та анастомози. Між цими тяжами залягає розгалужена сітка капілярів, яка дає початок розвитку ворітної вени. На шостому тижні ембріогенезу виявляють просвіти жовчних капілярів. Кровотворення в печінці починається на 5-6 тижні і досягає максимуму до 22-го тижня внутрішньоутробного розвитку, проходить екстравакулярно по ходу капілярів, що врастають разом з мезенхімою між печінковими балками [98, 158].

В залозистій паренхімі печінки протягом першої половини внутрішньоутробного розвитку ще не виявляється чітка часточкова будова. Вже, починаючи з 7-го тижня ембріогенезу і включно до 8-10 років постнатального розвитку, відбувається подальше диференціювання печінки. Внаслідок вrostання сполучної тканини по ходу гілок ворітної вени всередину органу, формуються часточки печінки. Зірчасті ретикулоендотеліоцити з'являються рано і характеризуються високою фагоцитарною активністю [140].

Протягом всього періоду ембріогенезу та в ранні періоди фетогенезу спостерігаються значні якісні та кількісні зміни гепатоцитів. Вивчення клітинного складу печінки показує наявність різноманітного співвідношення гепатоцитів з різним ступенем розвитку у ембріонів та плодів людини. На 7-8 тижнях ембріогенезу виявляють в основному малодиференційовані гепатоцити. На 9-10 тижнях вже зростає кількість перехідних гепатоцитів. З 11-го тижня фетогенезу можна виявити у великій кількості гепатоцити, що вступили в заключну стадію диференціювання [97].

Малодиференційовані гепатоцити є відносно мілкими клітинами, що мають округлу форму, велике еліпсоподібне чи овальне ядро. Вони

характеризуються слабким розвитком органел, наявністю великих ядер, в яких хроматин розміщений дифузно, а ядерця практично не визначаються. Цитоплазма цих клітин є темною за рахунок наявності значної кількості вільних рибосом. Мітохондрії малодиференційованих гепатоцитів характеризуються невеликими розмірами, кількість їх незначна, кристи на внутрішній мембрані мілкі, а матрикс майже прозорий. Як правило, мітохондрії розміщені поблизу ядра клітини. Гранулярна ендоплазматична сітка представлена нечисельними канальцями, що заповнені мілкодисперсним вмістом. Перехідні гепатоцити мають ядро з дифузно розміщеним хроматином, наявне одне ядерце. Мітохондрії цих клітин мілкі, але чисельні та характеризуються наявністю листоподібних крист і щільного матриксу. Ендоплазматична сітка являє собою мережу вузьких канальців з розміщеними на них рибосомами. В окремих випадках наявний комплекс Гольджі, розміщений поблизу ядра. Характерними ознаками для перехідних гепатоцитів є наявність вільних рибосом і полісом, поява одиничних лізосом, відсутність полярної диференціації та фрагментації ендоплазматичної сітки.

В 11-12 тижнів в печінці плода продовжується диференціація гепатоцитів. Визначається тенденція переважання кількості диференційованих гепатоцитів над малодиференційованими [142]. Для зрілих гепатоцитів характерними ознаками є неправильна форма, наявність ядра з дифузно розміщеним хроматином та 2-3 ядерцями. Мітохондрії їх мають овальну форму, матрикс характеризується посиленням електронної щільності, кристи розміщуються перпендикулярно до довгої осі органел. Добре розвинуті елементи комплексу Гольджі. В 13-14 тижнів відмічається наявність перехідних та диференційованих клітин, з переважанням останніх. В цей період особливими ознаками є збільшення кількості органел, що здійснюють синтетичну функцію, а саме рибосом, ендоплазматичної сітки, полісом та мітохондрій. В комплексі Гольджі щільно розміщені цистерни і везикули містять всередині електронно-щільний матрикс. Визначаються мітохондрії

овальної форми з правильно орієнтованими кристами. В цитоплазмі наявні у значній кількості включення глікогену [37].

Таким чином, зі збільшенням терміну внутрішньоутробного розвитку, спостерігається послідовне зростання числа диференційованих гепатоцитів і зменшення кількості малодиференційованих та перехідних клітин. Гепатоцити і їх ядра збільшуються в розмірах, а ядерно-цитоплазматичний індекс зменшується. В основі збільшення об'єму цитоплазми лежить посилений розвиток мітохондрій, а також зростання числа структур синтетичного апарату – рибосом, гранулярної ендоплазматичної сітки, полісом, комплексу Гольджі.

Отже, процеси диференціювання гепатоцитів ембріона і плода протікають з певною закономірністю, проходячи послідовну зміну трьох типів клітин від малодиференційованих до зрілих.

В новонародженої дитини печінка має відносно великі розміри і займає близько 4 % від загальної ваги. Сполучна тканина ще є слабо розвиненою, тому частки печінки погано розмежовані і їх розміри майже однакові. В подальшому ліва частка починає трохи відставати у розвитку [132]. Цей факт науковці пов'язують з тим, що під час фетального періоду онтогенезу ліва гілка пупкової вени, що кровопостачає ліву частку печінки є ширшою, але після народження значно знижується така перевага в кровопостачанні. Великі розміри печінки новонародженої дитини пов'язані з сильним розвитком судинного русла, яке відповідало за кровотворну функцію в ембріональному періоді. Подальше перекалібрування судин призводить до функціональної перебудови печінки [157, 215]. Характерною особливістю для новонароджених є наявність мілких скупчень вогнищ екстрамедулярного кровотворення та окремих кровотворних клітин, що зникають протягом перших тижнів постнатального періоду. Часточкова будова паренхіми печінки все ще залишається погано розвиненою. Печінкові пластинки є непорядкованими, звивистими. Недосконалий вигляд має також Гліссонова капсула. Вона дуже тонка, містить незначну кількість тонких колагенових

волокон і поодинокі еластичні волокна. Глікогенутворювальна функція печінки в цей період є добре вираженою, на відміну від жовчоутворювальної, що є недостатньою [140].

В перший рік життя спостерігається розвиток печінкових балок, вони стають більш впорядкованими, хоча звивистість ще не втрачається. Недостатньою в цей період є регуляція печінкою вуглеводного і жирового обмінів [97].

З чотирирічного віку починає чітко виявлятися часточкова будова печінки, що пов'язано з посиленням розвитком сполучної тканини та системи кровообігу. Також зі збільшенням маси тіла, печінка збільшується в розмірах. Вдосконалюється секреторна функція, а жовч в своєму складі містить необхідні для процесу травлення речовини. У віці 8-10 років за будовою та функціями вона відповідає таким у дорослих [37].

В нормі в періоди підліткового, юнацького та першого зрілого віку печінка не зазнає помітних структурних та функціональних перебудов. Вона відноситься до органів, що відносно повільно старіють. Дана особливість зумовлена морфофункціональною повноцінністю гепатоцитів та достатнім розвитком імунної системи. Починаючи з другого зрілого віку спостерігаються певні структурні зміни, частина з яких має компенсаторно-приспосувальний характер і забезпечує підтримання всіх функцій печінки на задовільному рівні [142, 157].

У віці 45-50 років відмічається поступове зменшення загальної кількості гепатоцитів приблизно на 6 клітин, в старечому віці – на 3-4 клітини. В осіб 60-89 років переважають гепатоцити нормальних розмірів, є незначна кількість малих та великих. Зменшення сумарного числа клітин печінки з віком є свідченням зниження процесів фізіологічної регенерації органу, що підтверджується тим фактом, що вогнищеві ураження гепатоцитів є частими, а фігури мітозу зустрічаються рідко [175]. За допомогою світлової мікроскопії науковці виявили, що цитоплазма гепатоцитів може бути базофільною, еозинофільною або з ознаками жирової чи гідропічної дегенерації. Змін

зазнають і ядра клітин, що проявляються у вигляді їх пікнозу. Кількість включень глікогену є зниженою. Електронномікроскопічне дослідження виявляє зменшення кількості рибосом, мітохондрій, мікросом та мембран гладенької ендоплазматичної сітки [215].

У людей похилого віку можна спостерігати зростання чисельності гепатоцитів, що характеризуються збільшенням плоїдії ядер. Чисельність мітохондрій є зниженою, однак деякі з них збільшуються в об'ємі без порушення їх функціонального стану. Характерним є зростання кількості лізосом і відповідно активності їх гідролітичних ферментів [140].

В старечому віці в клітинах печінки дуже часто виявляють накопичення ліпофусцину, який, як відомо, є характерною ознакою бурої атрофії печінки. Іноді його називають пігментом старіння. Даний пігмент зазвичай зустрічають в гепатоцитах центральних часточок. Він є продуктом окислення ліпідів і частково протеїнів, що пов'язано зі зниженням активності і кількості лізосомальних ферментів. Згідно наукових даних, накопичення ліпофусцину пов'язують з оксидативним стресом і порушенням деградації денатурованих і пошкоджених білків. На думку дослідників ліпофусцин може втручатись в клітинний метаболізм, завдяки здатності захоплювати катіони металів і сприяти таким чином формуванню вільних радикалів [97, 209].

Вікових змін зазнають і судини. Часто при морфометрії спостерігається зменшення судинно-паренхіматозного відношення, що настає внаслідок редукції судинної стінки. Порушення процесів притоку крові до печінки і зниження транспорту кисню та поживних речовин з віком стає причиною розростання колагенового паравазального каркасу. Характерною ознакою є зменшення діаметру синусоїдних капілярів після 45 років [166]. В старечому віці цей показник становить 10 мкм. Ультразвукове дослідження з метою оцінки портального кровотоку показує значне зниження швидкісних показників, що пов'язано з розвитком атеросклерозу мезентеріальних судин та зниженням серцевого викиду. При цьому у людей похилого віку можна виявити розширені синусоїдні капіляри, розміщені в перицентральної зоні,

фіброз судинної стінки, збільшення діаметру центральної вени та венозне повнокрів'я. Також характерними є поява прямих шляхів відтоку крові від міжчасточкових розгалужень ворітної вени в центральну вену, що на морфологічному рівні проявляється у вигляді петлистої сітки синусоїдних капілярів [142, 166].

Відомо, що з віком відбувається розростання сполучної тканини всередині часток печінки. У людей похилого віку в печінці спостерігається потовщення та склероз прошарків сполучної тканини навколо тріад, що носить локальний, обмежений характер. Досліди, проведені науковцями на старих тваринах часто виявляють такі ознаки старіння печінки як дефенестрація, потовщення ендотелію синусоїдних капілярів, псевдокапіляризація, перисинусоїдна експресія фактору Віллебранда, колагену I та IV типів, посилене утворення колагену в просторі Діссе [98, 140]. Зазначені зміни перисинусоїдного простору стають причиною порушення обміну речовин, кисневого голодування гепатоцитів, пошкодження ДНК, розвитку мутацій. Встановлено також, що при звуженні пор ендотелію синусоїдних капілярів порушується транспорт хіломікронів, підвищується накопичення ліпідів та знижується печінковий кліренс, що в кінцевому рахунку створює умови для посилення процесу колагеноутворення. Редукції зазнають і лімфокапіляри, що супроводжується специфічним розташуванням тканинних базофілів – вони розміщуються вздовж судин. Характерним є зниження фагоцитарної активності клітин Купфера та ендоцитозу ендотеліальних клітин [175, 215].

Результати експериментальних досліджень демонструють, що з віком знижується здатність печінки до регенерації. Наразі дослідники виділяють два основних механізми цього процесу. Перший пов'язаний зі зниженням відповіді гепатоцитів на циркулюючий епідермальний фактор росту, що виникає внаслідок дефіциту EGF рецепторів. Другий механізм виникає при пригніченні циклінзалежних кіназ внаслідок взаємодії з хроматином, ремодельованим протеїном Vim 1, як результат – зниження проліферативної здатності гепатоцитів [121, 153].

Таким чином, виходячи з вище зазначених даних, в процесі життя людини печінка зазнає значних структурних та функціональних змін. Проходячи через низку етапів диференціювання в період пренатального онтогенезу та перші 8-10 років постнатального розвитку, вона досягає таких морфологічних ознак, які дозволяють в повному об'ємі забезпечувати нормальну життєдіяльність людини та підтримувати вітальні функції організму. Старіння печінки відбувається відносно повільно, але значно порушує процеси регенерації та обміну.

1.2. Загальні уявлення про гомоцистеїн та його роль в патології захворювань

За останні декілька років велику увагу дослідників привертає амінокислота гомоцистеїн (ГЦ). Дане явище пов'язане з появою все нових досліджень, що свідчать про надзвичайно негативний вплив підвищених його рівнів на стан організму та участі в патогенезі багатьох захворювань. ГЦ – це небілкова сульфгідрильна амінокислота, що утворюється в процесі метаболізму незамінної амінокислоти метіоніну [3, 4, 5]. Внутрішньоклітинний метаболізм ГЦ здійснюється в декілька етапів. З метіоніну за участю ферменту метіонінаденозилтрансферази синтезується S-аденозилметіонін. Останній, втрачаючи метильну групу, перетворюється на S-аденозилгомоцистеїн. В подальшому завдяки S-аденозилгомоцистеїнгідролази утворюється аденозин і ГЦ. Слід зазначити, що S-аденозилметіонін є важливим донатором метильних груп і, як свідчать наукові джерела, бере активну участь в синтезі креатину, фосфатидилхоліну та метилуванні дофаміну, адреналіну, норадреналіну, ДНК, РНК, білків [2]. Процес елімінації надлишку ГЦ в організмі забезпечується трьома шляхами – реметилування, транссульфування, десульфування. В основі механізму

реметилування лежить процес ресинтезу метіоніну з ГЦ за обов'язкової участі вітаміну В12 та метіонінсинтази. Шляхом перенесення активних метильних груп від 5-метилтетрагідрофолату на ГЦ відбувається ресинтез метіоніну. Завдяки ланцюгу цих реакцій забезпечується підтримання постійного рівня коферменту метилування [104]. В процесі трасульфування відбувається перетворення ГЦ на цистатіон під дією ферменту цистатіон- β -синтетази. В подальшому, утворений цистатіон, вже під впливом залежного від вітаміну В6 ферменту γ -цистатіонази розпадається до цистеїну, аміаку і α -кетобутирату [16]. Завдяки процесу транссульфування забезпечується виведення до 70-80 % надлишкового рівня ГЦ, решта припадає на механізми реметилування та десульфування. В результаті останнього ГЦ перетворюється на гідроген сульфід [22, 24, 26].

В нормі рівень ГЦ в плазмі крові складає 5-15 мкмоль/л. Загальний рівень його, як зазначають дослідники, підвищується з віком. В дорослих чоловіків рівень ГЦ плазми є вищим, ніж у жінок. Однак з настанням менопаузи виникає тенденція до підвищення його концентрації [4]. В чистому вигляді ГЦ не потрапляє з продуктами харчування, він синтезується в організмі людини з метіоніну. Як свідчать наукові джерела, в плазмі крові ГЦ можна виявити у вигляді таких форм: 70-80 % – ГЦ зв'язаний з білками, 20-30 % – ГЦ з дисульфідом, 1 % – в вільній формі [25].

За нормальних умов ГЦ має велике значення в організмі людини. Крім підтримання постійного рівня незамінної амінокислоти метіоніну, він також виступає в якості молекули-ініціатора при синтезі білків. Однак при надлишковому синтезі ГЦ приблизно 5-10 % від внутрішньоклітинної його продукції потрапляє в плазму крові. При підвищенні рівня ГЦ вище 15 мкмоль/л, він здатен чинити негативний вплив на організм, а сам стан носить назву синдрому гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ). Загальноприйнятими є такі ступені цього синдрому: 15-30 мкмоль/л – помірний, 31-100 мкмоль/л – середній, 101 і більше – важкий [5, 32].

На даний час існують різні дані щодо причин підвищення рівня ГЦ в плазмі крові. Деякі дослідники вважають, що основними причинами ГЦ є порушення процесів його внутрішньоклітинного обміну та елімінації надлишків з організму [216]. До факторів ризику відносять паління, артеріальну гіпертензію, гіперхолістеринемію, вживання алкоголю, порушення функцій нирок, гіпотиреоз, тощо [35, 62]. Серед важливих причин підвищеного рівня ГЦ є спадкові. Однією з найпоширеніших спадкових патологій є гомозиготна недостатність ферменту цистатіон- β -синтази. Її поширеність складає близько 1 випадку на 335 тисяч населення. Згідно літературних джерел, близько 5-10 % випадків ГЦ обумовлені спадковими дефектами реметилювання [176, 268]. До генетичних причин належать також недостатність ферменту метилентетрагідрофолатредуктази, цистатіон- γ -ліази та метіонінсинтетази. Важливу роль відіграють особливості харчування людей. При недостатній кількості вітамінів, які беруть участь в процесах обміну ГЦ таких, як В6, В12, В9 та ферментів обміну цих вітамінів, концентрація його також зростає. Чисельними дослідженнями доведено, що причиною ГЦ також може бути вживання деяких лікарських засобів [18, 217].

Таким чином, провівши ретельний аналіз даних наукової літератури, можна виділити такі основні групи причин ГЦ:

- 1) генетичні – дефекти генів цистатіон- β -синтази, метилентетрагідрофолатредуктази, мутації генів кобаламіну;
- 2) фізіологічні – вік, чоловіча стать, вагітність, менопауза;
- 3) спосіб життя – паління, вживання алкоголю, гіподинамія, стрес, вегетеріанство, недостатнє надходження з їжею вітамінів В6, В12, В9;
- 4) коморбідні стани – дифузні захворювання сполучної тканини, розсіяний склероз, псоріаз, печінкова і ниркова недостатність, цукровий діабет, гіпотиреоз, атрофічний гастрит, хвороба Крона, неспецифічний виразковий коліт, лімфопроліферативні захворювання;

5) прийом лікарських засобів – метотрексат, фібрати, діуретики, циклоспорин, теофілін, сульфосалазин, триметоприм, пероральні контрацептиви, антиконвульсанти.

Вивченню патогенетичної дії підвищеного рівня ГЦ в плазмі крові призначено багато робіт, однак і до сьогодні це питання залишається не повністю розкритим. Більшість дослідників виділяють декілька механізмів негативної дії ГЦ. До них належать: активація оксидативного стресу, експресія медіаторів запалення та фіброзу, гальмування процесів метилування, гомоцистеїнування білків [49, 50, 51, 52, 54, 162, 216].

Реакції метилування є надзвичайно важливими для регуляції процесів експресії генів, функцій нуклеїнових кислот та білків. Вважають, що за умов ГЦ спостерігається підвищення рівня S-аденозилгомоцистеїну. Останній є інгібітором метилтрансфераз [54, 210]. В нормі S-аденозилгомоцистеїн швидко гідролізується, проте за умов підвищеного вмісту аденозину та ГЦ концентрація його зростає, що в свою чергу призводить до пригнічення або зниження активності процесів метилування. За таких умов виникає зміна експресії деяких генів, що є наслідком гіпометилування ДНК. В кінцевому рахунку ці зміни проявляються у вигляді ураження судин та внутрішніх органів [217].

В основі процесу гомоцистеїнування лежить здатність ГЦ зв'язуватись ковалентними зв'язками з білками, що призводить до модифікації їх структури та функцій. Деякі науковці називають цей процес посттрансляційною модифікацією білків [186]. Ступінь процесу гомоцистеїнування корелює з рівнем ГЦ в плазмі крові. Процес S-гомоцистеїнування полягає в зв'язуванні ГЦ з вільною тіольною групою в білковій молекулі з утворенням дисульфідного зв'язку. В основі N-гомоцистеїнування лежить взаємодія аміногрупи ГЦ з ϵ -аміногрупою залишків лізину в білку. Наслідком цих двох процесів є включення до складу білка ГЦ, що супроводжується зміною його структури. Шляхом процесів гомоцистеїнування може порушуватись діяльність альбумінів, гемоглобіну, імуноглобулінів, трансферину,

фібриногену. Вважається, що N-гомоцистеїнування є прямим наслідком генетичних мутацій ферментів, що відіграють провідну роль в механізмах внутрішньоклітинного обміну ГЦ [133]. Згідно наукових досліджень N-гомоцистеїнування призводить до порушення загального окисно-відновного потенціалу білків, а також спричиняє стрес ендоплазматичної сітки, запускає запальні процеси [150].

В наш час доведено, що одним із механізмів токсичного впливу ГЦ на організм є його здатність генерувати активні форми кисню. Оскільки в його складі є активна тіольна група, він легко окислюється в присутності кисню і іонів металів, призводячи до утворення активних кислотних радикалів – супероксидного аніон-радикалу, перекису водню та гідроксильного радикалу. Тому підвищений рівень ГЦ може спричинити окислювальний стрес [162, 214]. Цей процес здійснюється внаслідок пригнічення транскрипції, трансляції та каталітичної активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази. Підвищення рівня вище перерахованих радикалів в кінцевому рахунку призводить до прямої цитотоксичної дії їх на ендотеліюцити судинної стінки. Слід зазначити, що процесу окислення також підлягають ЛПНЩ, стимулюючи при цьому процеси атерогенезу. В стінках судин ГЦ знижує біодоступність оксиду азоту для клітин, тому при значному його підвищенні спостерігається порушення дилатації судинної стінки [27].

Підсумовуючи слід виділити основні механізми завдяки яким ГЦ може вважатись неспецифічним маркером здоров'я організму.

1) Порушення функцій ендотелію є одним із універсальних механізмів патогенезу багатьох захворювань, оскільки ендотелій інтими судин виконує бар'єрну, секреторну, гемостатичну, вазотонічну функції, грає важливу роль в процесах запалення і ремоделювання судинної стінки. При надлишку ГЦ в організмі, з урахуванням його низької фільтрації навіть здоровими нирками, він швидко окислюється в плазмі крові з утворенням ГЦ, ГЦК, в результаті чого утворюється велика кількість радикалів, що містять активний кисень [54, 216]. При цьому відбувається пошкодження клітин

ендотелію, і порушення їх функцій. Знижуючи біодоступність оксиду азоту, підвищуючи агрегаційну здатність тромбоцитів, посилюючи синтез ІЛ-6, ГЦ створює несприятливий вплив на механізми, що беруть участь в регуляції судинного тону, обміну ліпідів і коагуляційного каскаду [1, 2, 213].

2) Гіпометилування пов'язує з обміном ГЦ. Цю амінокислоту називають «фізіологічним регулятором рівня метилування». Даний процес є одним із фундаментальних механізмів послідовної тканинноспецифічної експресії генів [5, 104].

3) Токсичний ефект впливу ГЦ на культуру нервових клітин. Дія ГЦ, виходячи із структурної схожості його і глутамату, направлена на глутаматні NMDA рецептори на нейронах, що стимулює вхід в нейрони іонів кальцію і призводить до накопичення вільнорадикальних сполук в тканинах. Глутаматні рецептори широко розповсюджені не тільки в нервовій тканині, а також в кардіоміоцитах, мегакаріоцитах, тромбоцитах, еритроцитах, клітинах кісткової тканини, імунної системи, що відповідно надзвичайно розширює ареал впливу ГЦ на тканини [7, 87].

4) Прооксидантні властивості ГЦ проявляються його аутоокисленням (неферментативний шлях) в присутності іонів перехідних металів (наприклад міді), відновлення яких є джерелом електронів під час утворення активних форм кисню, що, реагуючи з ненасиченими жирними кислотами, які входять до складу ліпідів в клітинних мембранах, ініціюють реакцію перекисного окислення ліпідів [77]. Ліпідна фаза мембран є проникною для іонів водню і кальцію. Це призводить до того, що в мітохондріях окислення і фосфорилування порушуються і клітина опиняється в умовах нестачі АТФ. Зменшення стабільності ліпідного шару призводить до втрати мембраною її бар'єрних функцій [101, 102, 123, 211, 214].

Роль ГЦ в патогенезі багатьох захворювань тривалий час встановлюють науковці як в Україні, так і у всьому світі. Проводячи експериментальні дослідження, вони доводять його негативний вплив на структуру на функції всіх внутрішніх органів, обмінні процеси. Ретельний аналіз джерел літератури

показав, що найбільше робіт присвячено впливу підвищеного рівня ГЦ на стан судин, його участі в розвитку порушень процесів коагуляції та коронарного кровотоку [2, 3, 69, 125, 129].

Шляхом моделювання на щурах стану ГЦ було доведено, що спричинені тіолактоном ГЦ порушення обміну аденозину, призводять до формування гіперактивності тромбоцитів, при цьому характерною ознакою є зниження порога їх активації АДФ, а порушення активності тромбоцитарних ензимів перебуває в прямій залежності від ступеня агрегації тромбоцитів [20, 21].

Відомо, що в основі судинних змін лежать процеси безпосередньої прямої токсичної дії ГЦ на ендотеліальні клітини, порушення механізмів їх регенерації. Також виявляють порушення чутливості судин до ацетилхоліну. В ендотеліальних клітинах ГЦ стимулює утворення вільних радикалів, призводить до зниження продукції сульфатованих глікозаміногліканів, релаксуючого фактору [92, 93, 154, 174, 208, 213]. Наслідком цього є зниження еластичності судинної стінки, що супроводжується порушенням синтезу простагліну, зростанням числа гладком'язових клітин. Підвищення рівня плазмового ГЦ супроводжується відкладанням в стінці артерій ЛПНЩ і ЛПДНЩ [204]. Всі перераховані механізми в кінцевому рахунку сприяють формуванню атеротромбозу, а саме його судинного компонента [81]. В свою чергу тромботичний або коагуляційний компонент виникає внаслідок порушення функцій ендотеліальних клітин. Наукові дослідження свідчать, що порушення процесів синтезу тромбомодуліну, який є необхідним для дезактивації тромбіну антикоагулянтними протеїнами, призводить до того, що останні не пригнічують активність факторів V і VIII, активуючи процес тромбоутворення. Механізми згортання крові активуються внаслідок зниження активності антитромбіну III та ендогенного гепарину [7, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 65, 66, 69, 82, 96, 139]. Літературні джерела свідчать, що при ГЦ підвищується агрегаційна здатність тромбоцитів. Дане явище виникає внаслідок активації каскаду арахідонової кислоти внаслідок підвищення

чутливості тромбоцитів до АДФ та адгезивності за рахунок посиленого утворення на ендотелії судинної стінки фактора Віллебранда [82, 136].

Однак на сьогоднішній день відомо, що існують також інші причини та механізми активації процесу тромбоутворення при ГЦ. Дослідники вважають, що в цьому може брати участь пуринергічна сигнальна система та рівень аденозину, який проявляє антиагрегантні властивості [81].

Крім коагуляційних механізмів тромбоутворення, ГЦ може викликати порушення в системі фібринолізу, шляхом втручання у взаємозв'язок між тканинним активатором плазміногену і самим плазміногеном. Останні здатні взаємодіяти на поверхні ендотелію за участі особливих рецепторів, до числа яких входить аннексин. За умов підвищення концентрації ГЦ порушується зв'язування тканинного активатора плазміногена з аннексином і зменшується утворення плазміну. При ГЦ значно знижується фібринолітичний потенціал [116, 119].

Рівень ГЦ корелює з вмістом Д-димеру. Останній є чутливим маркером активації коагуляційного гемостазу і значним предиктором гострих станів серцево-судинної системи та підвищеного рівня смертності від них. Встановлено, що при підвищенні рівня ГЦ плазми більше 15 мкмоль/л в 1,7 разів збільшується ризик смерті від серцево-судинних захворювань, близько в 3,4 рази – від інфаркту міокарду та в 4,3 рази від інсульту [35, 172, 179].

ГЦ є незалежним маркером високої смертності від серцево-судинних захворювань і прирівнюється до такого при гіперхолестеринемії та артеріальній гіпертензії [55, 72, 93]. Згідно наукових досліджень, що проводились всередині великих когорт з участю десятків тисяч пацієнтів, було виявлено сильну кореляцію між рівнем ГЦ плазми крові та розвитком атеросклерозу, його тромботичних ускладнень, ішемічної хвороби серця, інсультів, ішемічних захворювань судин нижніх кінцівок, венозних тромбозів, розвитку рестенозів артерій після ангіопластики [7, 220, 100]. Крім того, багатьма дослідниками доказано, що терапія, яка направлена на корекцію рівня ГЦ в плазмі крові, знижує ризик виникнення вище перерахованих

захворювань. За даними досліджень гостра ГЦ викликає порушення дилатації коронарних артерій, пов'язану зі зниженням біодоступності оксиду азоту. Даний ефект обумовлений окислювальним стресом, що розвивається на фоні ГЦ [70, 106, 129, 189].

Протягом останніх років увагу дослідників привертає також факт виникнення ішемічних інсультів у молодому віці. Численні дослідження допомогли виявити зв'язок між порушенням мозкового кровообігу та наявністю генетично обумовленої ГЦ [36, 126]. Найбільш поширеною генетичною мутацією є порушення гену, що кодує фермент метилентетрагідрофолатредуктазу. Існує декілька алельних варіантів даного гену. Найпоширенішою є точкова мутація, що полягає в заміні нуклеотиду цитозину на тимін в положенні 677 [168]. В кінцевому рахунку це призводить до заміни амінокислоти валіну на аланін у відповідному кодоні білка, що в свою чергу робить фермент МТГФР термолабільним та знижує його активність на 35 %. Гетерозиготні мутації цього гену проявляються помірним підвищенням ГЦ, в той час, як гомозиготні – значною ГЦ. Також існує ще один варіант мутації, а саме заміна аденіну на цитозин в позиції 1298 (мутація А 1298 С). У випадку гетерозиготного носійства гену А 1298 С не супроводжується підвищенням в крові ГЦ, проте комбінація гетерозигот С 677 і А 1298С призводить до значного зниження активності ферменту і підвищення концентрації ГЦ в плазмі крові, порівняне до гомозиготного носійства С 677 [200]. Тому, виходячи з цього, на думку більшості науковців надзвичайно важливим є визначення рівня ГЦ у людей молодого віку, що перенесли ішемічний інсульт [217].

Активно вивчається зв'язок між підвищеним рівнем ГЦ та неврологічними розладами [63, 64]. Згідно останніх досліджень, підвищена концентрація його викликає збільшення вірогідності виникнення симптомів депресії на 26 %. Дієта, збагачена вітамінами В9, В6, В12 та фолієвою кислотою ефективно знижує рівень ГЦ та прояви депресії. В літературних джерелах є згадки про те, що від 10 до 30 % пацієнтів з хворобою Паркінсона

мали підвищений рівень ГЦ. ГГЦ призводить до підвищення активності γ -секретази, накопичення β -амілоїду і може стимулювати процеси гіперфосфорилування тау-білку, що пов'язано з прогресуванням хвороби Альцгеймера. Поліморфізм С677 і А1298С можуть відігравати важливу роль в патофізіології аутизму [109].

З багаточисельних причин порушення утилізації ГЦ при цукровому діабеті 2-го типу найбільш важливе порушення обміну кобаламіну, що призводить до дефіциту вітаміну В12. При цьому блокується один з основних шляхів метаболізму ГЦ – реметилювання, що призводить до ГГЦ. Рівень ГЦ чутливий до раннього клітинного (метаболічного) дефіциту вітаміну В12 і рівень ГЦ підвищується раніше, ніж знижується концентрація вітаміну В12 в сироватці крові. Це означає, що незначний дефіцит вітаміну В12, що протікає безсимптомно, може стати причиною клінічно значимої ГГЦ. За таких умов остання зумовлює розвиток діабетичної поліневропатії шляхом ураження нейронів, нервових волокон і ендотелію мілких судин. Дані наукових джерел свідчать, що ГГЦ пов'язують також з різними захворюваннями шлунково-кишкового тракту, зокрема з хворобою Крона, запальними захворюваннями кишечника, раком товстої кишки [80].

Ретельний аналіз літератури дав змогу виявити той факт, що науковці в усьому світі почали активно вивчати вплив ГГЦ на структуру та функції печінки. Будучи важливим для життєдіяльності органом, вона бере активну участь в процесах обміну та утилізації ГЦ, чим і обумовлена значна цікавість дослідників [6, 9, 21, 27, 28, 29, 46, 47, 48, 185].

Визначаються особливості транссульфування ГЦ в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності. Було встановлено, що за умов недостатнього надходження білка з продуктами харчування, спостерігається зниження активності визначного ферменту транссульфування цистатіон- β -синтази, що в кінцевому рахунку стає причиною порушення процесів утилізації ГЦ. В подальшому його надлишок в печінці спричиняє накопичення в гепатоцитах S-аденозилгомоцистеїну і, як наслідок, порушення процесу метилювання.

Останній відіграє визначальну роль в патогенезі ГЦ [75, 83, 87, 90, 91, 94, 103, 170, 107, 127, 134].

Є дані щодо досліджень гендерних особливостей впливу ГЦ на метаболізм сірковмісних амінокислот та гідроген сульфід у печінці, в ході яких вдалось встановити, що введення щурам протягом тривалого часу тіолактону ГЦ призводить до зростання в крові рівнів цистеїну, ГЦ та гідроген сульфід, при цьому було також доведено, що в самців ефект був більш виражений. На думку дослідників, причиною виразнішого прояву порушення активності процесів утилізації ГЦ в самців пов'язане з тим, що в них набагато вища активність оксидативного стресу, а також меншої активності ферментів, що забезпечують утворення гідроген сульфід [34].

Надзвичайно актуальними є роботи стосовно визначення взаємозв'язку між рівнем ГЦ плазми крові у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки в поєднанні з цукровим діабетом 2-го типу. В ході експериментів було встановлено, що за даних умов рівень його є значно підвищеним. Причиною цього є тривале вживання цукрознижуючих засобів, а також недостатність вітаміну В12 та кобаламіну. Тому, як наслідок, спостерігається порушення процесів утилізації ГЦ, а саме механізм реметилування. Внаслідок цього рівень ГЦ зростає, спричиняючи прямий токсичний вплив на ендотелій судин печінки внаслідок утворення великої кількості вільних радикалів та стресу ендоплазматичного ретикулула. Крім того, дослідники встановили, що за даних умов ГЦ викликає порушення активності стеролзв'язуючого регуляторного білка. Наслідком цього є посилення синтезу в печінці холестерину, тригліцеридів, що в кінцевому рахунку призводить до посилення вже існуючого стеатозу [43, 44].

ГЦ в печінці також здатен пригнічувати активність антиоксидантних ферментів, в результаті чого зростає чутливість гепатоцитів до активних форм кисню та цитотоксинів через поглиблення оксидативного стресу [218]. Вільні радикали, накопичуючись, призводять до ушкодження мембран клітин печінки.

ГГЦ при ЦД виступає як маркер ураження печінки. Підвищення його рівня викликало порушення білкового та вуглеводного обмінів в клітинах печінки. При проведенні пункційної біопсії у хворих з ЦД були знайдені значні морфологічні зміни її паренхіми. До них належали: ознаки мілко та крупнокраплинного стеатозу, моно- та мультилобулярний фіброз з помірно вираженими ознаками паренхіматозної та стромальної реакції [9].

На сьогоднішній день вивчений вплив ГЦ на антиоксидантний статус кишечника і печінки. Як зазначено в науковій літературі, він безпосередньо пригнічує каталазну активність, активує процес перекисного окислення ліпідів і підвищує загальний антиоксидантний статус в кишечнику і печінці. Автори експериментального дослідження припустили, що при ГГЦ в ШКТ виникає оксидативний стрес [190].

Встановлено, що дефіцит вітаміну В6 викликає помітне зниження в крові піридоксальфосфату, глутатіону, глутатіон-S-трансферази, глутатіон пероксидази, сприяє накопиченню ГЦ в плазмі крові і S-аденозилгомоцистеїну в печінці та зниження S-аденозилметіоніну. Автори це пов'язують з порушенням катаболізму метіоніну шляхом транссульфування, що стає причиною інгібування реакцій трансметилування ДНК, РНК, білка і призводить до пошкодження печінки [24, 49].

На разі існує певна кількість робіт присвячена вивченню взаємозв'язку між рівнем ГЦ та розвитком і прогресуванням неалкогольної жирової хвороби печінки [8, 27, 28, 39, 43, 44, 57, 68, 90, 91, 185]. Неалкогольна жирова хвороба печінки, викликана високожировою дієтою, є фактором ризику розвитку ГГЦ через порушення активності цистатіон- β -синтази та цистатіон- γ -ліази. Тому високий рівень ГЦ дослідники вважають характерною ранньою ознакою розвитку НЖХП [144, 107, 134, 141, 156, 167, 169, 205].

Сучасні можливості дали змогу виявити новий механізм ушкодження печінки при підвищеному рівні ГЦ. Дослідники встановили, що ГГЦ здатна активувати утворення аутофагосом та експресію білків. Виникає внаслідок пригнічення експресії трансмембранного регулятора кістозного фіброзу

(CFTR), який в нормі регулює взаємодію ДНК метилтрансферази і попереджує ураження гепатоцитів шляхом аутофагії [210].

Не дивлячись на значні досягнення сучасної науки у вивченні ролі ГЦ в патогенезі багатьох захворювань внутрішніх органів, на сьогоднішній день відкритим залишається питання щодо змін структури печінки на світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях. Роботи, що існують розкривають лише певні функціональні зміни органу, не демонструючи при цьому особливостей її морфологічного ураження. Тому тема є актуальною та потребує ретельного вивчення.

РОЗДІЛ 2

ЗАГАЛЬНА МЕТОДИКА Й ОСНОВНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальна методика та об'єкти дослідження

Досліди на експериментальних щурах проведені з дотриманням міжнародних рекомендацій про виконання медико-біологічних досліджень з використанням тварин відповідно до «Загальних принципів роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погоджене з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986) [20]. Комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова затверджено, що робота виконана із дотриманням етичних принципів (протокол № 8 від 17.10.2019 р і протокол № 4 від 18.05.2023 р).

Експеримент проведено на 64 білих безпородних щурах-самцях (перманентна вага – 61-335 г), що отримані з віварію Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова. Лабораторні щури знаходились в звичайних умовах віварію з 12-годинним режимом день/ніч, воду і збалансований гранульований корм отримували *ad libitum* відповідно до встановлених норм. Через зазначені умовами дослідження проміжки часу тварин виводили з експерименту, знеживлюючи методом декапітації та використанням тіопенталового наркозу (тіопентал натрію 100 мг/кг в/оч). Процедури, що передбачені експериментом виконували в проміжках часу з 9⁰⁰ до 10⁰⁰. Загальний стан щурів, кількість спожитого корму та води оцінювали щоденно. Контрольне зважування щурів проводили кожні 7 діб.

Протягом дослідження експериментальних тварин розподіляли на групу контролю та групу досліду. Кожна з них поділялась на підгрупи в залежності

від віку, а саме – молоді щури віком 1-2 місяці, дорослі щури – 6-8 місяців, старі щури – 24-26 місяців. Хронічну стійку ГГц моделювали шляхом введення D,L-тіолактон гомоцистеїну гідрохлориду (Acros Organics, Італія) тваринам дослідної групи в дозі 200 мг/кг маси тіла внутрішньошлунково (в/шл) на 1% розчині крохмального гелю (1 мл /100 г маси щура) 1 раз на добу протягом 8 тижнів. Дані наукової літератури свідчать, що в/шл введення такої дози тіолактону Гц забезпечує зростання рівня його в крові щурів більше, ніж у 2 рази та не спричиняє загибелі їх за умов тривалого введення. Щурам групи контролю в/ш вводили 1 % розчин крохмального гелю (1 мл /100 г маси щура) 1 раз на добу упродовж 8 тижнів.



Рис. 2.1. Загальний дизайн дослідження з розподілом тварин на групи.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Лабораторні та біохімічні.

Реактиви і обладнання. Під час дослідження нами використовувались такі реактиви: тіобарбітурова кислота, 2,4-динітрофенілгідразин, кверцитин, трихлороцтова кислота, феротіоціанат амонію, казеїн, NaOH, 0,05 М (pH=7,4) фосфатний буфер, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), фенілметилсульфонілфторид (PMSF).

Крім того, додатково використано наступні реактиви: 0,05 М Трис-HCl буфер (pH=7,4), Tween-20, сухе молоко, Бредфорд розчин, H₂O₂; первинні антитіла для матричних металопротеїназ; поліклональні анти-кролячі антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому, субстрат для пероксидази хрому о-фенілдіамін (OPD) виробництва фірми «Sigma», США.

До переліку обладнання входили: набір “Homocysteine EIA” (Axis-Shield, Англія), автоматичний аналізатор STAT FAX 303 / PLUS, спектрофотометр СФ-26, імуноферментний набір “Rat TGF beta 1 Platinum ELISA” (eBioscience, Австрія), набір СРБ-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, РФ), апарат для препаративного вертикального диск-електорофорезу (BioRad, США), центрифуга CM-6M «ELMI»; центрифуга Allegra 64R «Beckman Coulter»; мікропланшетний рідер виробництва фірми «BioТес» США; спектрофотометр «Smart Spec Plus» виробництва фірми «BioRad», США; автоматичні піпетки та дозатори «Humapette»; магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати і т.д. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001; пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу; планшети з несорбуючою поверхнею; еппендорфи, пробірки та інше отримано від фірми Sente-Lab; скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

Біохімічні дослідження проводились на базі кафедри біологічної та загальної хімії і науково-дослідної клініко-діагностичної лабораторії ВНМУ ім. М. І. Пирогова (свідоцтво №04915 МОЗ України про атестацію), а також кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка.

Методика забору і приготування зразків матеріалу для дослідження.
Кров у щурів забирали при проведенні декапітації, далі її центрифугували при 1500 g 20 хв і температури 18-22 °С, відбирали аліквоти сироватки крові в пробірки Eppendorf та до моменту виконання власне досліджень зберігали при температурі -20 °С.

Печінку видаляли, перфузували холодним 1,15 % розчином калію хлориду, гомогенізували в скляному гомогенізаторі з тефлоновим пестиком в середовищі 1,15 % калію хлориду (співвідношення 1:3) при 3000 об/хв. протягом 5 хв. Гомогенати центрифугували 30 хв. при 600 g, відбирали аліквоти постядерного супернатанту в пробірки Eppendorf та зберігали при температурі -20 °С.

Рівні Гц в сироватці крові досліджували за допомогою набору «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія), використовуючи оригінальні інструкції фірми-виробника. Принцип методики полягає в наступному: зв'язаний з білками плазми Гц відновлюється до вільного Гц, який згодом перетворюється в SAH. Вміст SAH в зразках визначався методом ІФА. В лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до SAH, додавали по 25 мкл стандартних розчинів (з відомими концентраціями SAH), контрольних проб та проб сироватки крові, 200 мкл моноклональних анти-SAH-антитіл. Інкубували 30 хв. при 18-25 °С. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл ферменту та інкубували ще 20 хв. при 18-25 °С для утворення на твердій фазі комплексу АТ-АГ-АТ- ензим. Потім лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і вносили 100 мкл субстратного розчину, який реагує зі зв'язаним на твердій фазі ензимом з утворенням забарвленої речовини, інкубували 10 хв. при 18-25 °С. Реакцію зупиняли 100

мкл стоп-розчину і фотометрували при 450 нм (диференційний фільтр 630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Чутливість набору складає <math><1,0</math> мкмоль/л, коефіцієнт варіації <math><10\%</math>.

Рекомендована інструкцією інтерпретація діапазону рівнів Гц така: низький рівень – 5,6-8,4 мкмоль/л, середній – 10,0-15,0 мкмоль/л, високий – 20,0-30,0 мкмоль/л.

Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою. При нагріванні в кислому середовищі МДА утворює з тіобарбітуровою кислотою забарвлений комплекс червоного кольору з максимумом світлопоглинання при 535 нм. Для розрахунків використовували молярний коефіцієнт екстинції – $1,56 \times 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Рівні карбонільних груп протеїнів визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [19]. При окисненні протеїнів в аліфатичних амінокислотах утворюються карбонільні групи, а вони за умов взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразином формують фенілгідразони з певним спектром поглинання на довжині хвилі 490 нм. До 0,1 мл гомогенату печінки додавали 0,5 мл 0,5 М НСІ, 0,2 мл 0,2 % розчину 2,4-динітрофенілгідразину у 0,8 М НСІ. Суміш інкубували 10 хв. при 20 °С, осаджували протеїни 0,3 мл 10 % розчину CCl_3COOH , центрифугували 10 хв. при 3000 об/хв. Осад два рази промивали 1,0 мл 5 % розчину CCl_3COOH , центрифугували 10 хв. при 3000 об/хв. До осаду протеїнів додавали 1 мл 0,9 % розчину NaCl і 1 мл 5 % розчину NaOH. Інкубували 20 хв. при 20-22 °С. Фотометрію проводили на довжині хвилі 490 нм.

Активність СОД оцінювали за ступенем інгібування окиснення кверцетину.

Рівні молекул середньої маси (МСМ) в сироватці крові та гомогенатах печінки експериментальних тварин визначали за методом Ліфшиць Р. І. До 0,2 мл плазми крові (гомогенату) додавали 1,8 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти, центрифугували при 3000 об/хв. 30 хв., відділяли супернатант. До 0,5 мл супернатанту додавали дистильовану воду у

співвідношенні 1:10, визначали оптичну щільність на довжині хвилі 254 нм (катаболічний пул МСМ₁) та 280 нм (анаболічний пул МСМ₂) на спектрофотометрі СФ-26. Результати досліджень надаються в умовних одиницях, які відповідають показникам оптичної щільності.

Вміст загальних фосфоліпідів в гомогенатах печінки досліджували екстракційно-фотометричним методом за утворенням гідрофобного комплексу з феротіоціанатом амонію [53].

Рівні TGFβ визначали методом ІФА з використанням набору «Rat TGF beta 1 Platinum ELISA» (eBioscience, Австрія), користуючись інструкцією фірми-виробника. Зразки сироватки крові до ІФА дослідження готували таким чином: до 20 мкл сироватки крові додавали 920 мкл буферного розчину (PBS, 1 % Tween 20, 10 % BSA), 30 мкл 1 М НСІ, перемішували, інкубували 60 хв. при кімнатній температурі, нейтралізували додаючи 30 мкл 1 М NaOH та перемішували.

В лунки планшетів, на стінках яких адсорбовані антитіла до TGFβ, додавали по 80 мкл буферного розчину, 20 мкл стандартних розчинів (з відомими концентраціями TGFβ – 0; 31,3; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 пг/мл), контрольних проб та проб сироватки крові, герметизували адгезивною плівкою, інкубували 2 год. при 18-25 °С на шейкері. Лунки відмивали від надлишку незв'язаних реагентів, вносили в них 100 мкл кон'югату антитіл до TGFβ з біотином, герметизували адгезивною плівкою, інкубували 1 год. при 18-25 °С. Далі лунки знов відмивали від надлишку незв'язаних реагентів і додавали 100 мкл ензимного кон'югату (стрептавідин-пероксидаза хріна), герметизували адгезивною плівкою, інкубували 30 хв. при 18-25 °С. Лунки відмивали від надлишку реагентів, вносили 100 мкл хромогену – тетраметилбензидину (ТМВ-субстрату), інкубували 30 хв. при 18-25 °С в темному приміщенні, реакцію зупиняли 100 мкл стоп-розчину, а фотометрію проводили при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр 630 нм) на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS. Коефіцієнт

варіації складає <10 %, аналітична чутливість методу – 7,8 пг/мл TGFβ. При обчисленні результатів нами враховувався фактор розведення проб.

C-реактивний білок (СРБ) в сироватці крові визначали методом ІФА. Чутливість набору складає $\leq 0,05$ мг/л, а коефіцієнт варіації <10 %. Дослідження проводилось на автоматичному аналізаторі STAT FAX 303/PLUS при довжині хвилі 450 нм (диференційний фільтр 630 нм).

Вивчення загальної протеолітичної активності. Загальну активність протеїназ у гомогенатах печінки аналізували методом визначення казеїнолітичної активності в модифікації. 500 мкл гомогенату тканин доводили 0,05 М (рН 7,4) фосфатним буфером до об'єму 1 мл. Перемішували та додавали 1 мл 4 % казеїну. Потім інкубували протягом 30 хв. у термостаті при +37°. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 15 % ТХО з послідуочим центрифугуванням при 2000 об/хв. 30 хв. Надосадову рідину відбирали та визначали екстинцію при довжині хвилі 280 нм. Контрольний зразок складався з суміші казеїну, відповідного фосфатного буфера і ТХО у однакових співвідношеннях. Казеїнолітичні одиниці обчислюються за формулою:

$$K.o/1mg.білка = \Delta E_{280} \times K/A, \quad (2.1)$$

де ΔE – E холостої проби - E досліджуваної проби; K – 1,3; A – кількість білка в пробі (мг).

% інгібування визначаємо за формулою:

$$[1 - (E_2 / E_1)] \times 100 \%, \quad (2.2)$$

де E_2 – значення оптичної щільності проби за присутності інгібітора; E_1 – значення оптичної щільності проби без інгібітора.

Для приготування 4 % казеїну підготовлений реактив масою 4 г розчиняли в 80 мл 0,05 М фосфатного буфера рН 7,4 і 1,6 мл 1 М NaOH. Суміш

залишали при кімнатній температурі на 40 хв. для набухання. Далі кип'ятили 15 хвилин на водяній бані. Після охолоджували, рН розчину казеїну доводили до 7,4 1 М NaOH та доводили об'єм до 100 мл фосфатним буфером.

Визначення рівнів ММР у гомогенатах печінки щурів. Дослідження вмісту ММР у гомогенатах печінки проводили за допомогою методу ІФА у 96-лункових мікропланшетах із поглинаючою здатністю згідно стандартної методики для розчинних білків [88]. Антиген розводили за допомогою 0,05 М Трис-НСІ-буфері, рН 7,4 до концентрації 1 мкг/мл та інкубували в лунках планшетів при температурі 4 °С упродовж ночі. Після інкубації, для видалення антигену, що не зв'язався, лунки промивали буфером для іммобілізації. Блокування неспецифічних місць зв'язування проводили методом інкубації з 5 % розчином знежиреного молока протягом однієї години при 37 °С. Після інкубації лунки відмивали робочим буфером з вмістом 0,1 % Tween-20 та інкубували з розчином первинних антитіл для матричних металопротеїназ, розведення яких було 1:3000 впродовж однієї години при 37 °С. Потім проводили відмивку робочим буфером з 0,1 % вмістом Tween-20 та інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (розведення 1:3000) одну годину при 37 °С. Після закінчення інкубації лунки ще раз відмивали буфером з вмістом 0,1 % Tween-20 та інкубували з субстратом о-фенілендіаміну (OPD), концентрацією 0,4 мг/мл розведеному у 0,05 М фосфатно-цитратному буфері з додаванням 30 % H_2O_2 для візуалізації зв'язування вторинних антитіл. Пероксидазну реакцію зупиняли шляхом додавання 100 мкл 1 М H_2SO_4 через 10 хв. Оптичне поглинання вимірювали на довжині хвилі 492 нм за допомогою мікропланшетного спектрофотометра.

Дослідження кількісного вмісту білка. Кількість білка визначали методом Bradford [79]. Останній полягає в здатності барвника Кумасі діамантово-синього G-250 змінювати забарвлення при зв'язуванні з білком, при цьому максимум поглинання зміщується відповідно з 465 до 595 нм. За даних умов концентрація барвника, що зв'язалась з білком прямопропорційна кількості білку в пробі.

Для визначення концентрації білка до проби додавали 30 % розчин NaOH, дистильовану воду та робочий розчин реактиву Бредфорд. Для приготування робочого розчину змішували стоковий розчин реактиву, 95 % етанол і 88 % ортофосфорну кислоту у співвідношенні 2:1:2 та доводили водою до об'єму 100 мл. До складу стокового розчину входили 10 мл 95 % етанолу, 20 мл 88 % ортофосфорної кислоти та 35 мг кумасі діамантового синього. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв., вимірювали спектрофотометрично на довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду. Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

Приготування проб для електрофорезу. Для отримання якісної інформативної картини у поліакриламідному гелі (ПААГ) використовують метод концентрування зразків за допомогою ТХО. Для цього зразки в мікропробірках змішують з 55 % ТХО у співвідношенні 1:1 і залишають на 10 хв. Після центрифугування протягом 5 хв. при 10 000 g зливають надосадову рідину і додають 0,5 мл ацетону на пробу та знову центрифугують. Процедуру з ацетоном повторюють 2-3 рази, після цього зразки залишають на ніч для випаровування залишків ацетону.

Після випаровування зразки розчиняють у буфері для електрофорезу, що містить 0,01 М трис-НСІ буфер, рН 6,8, 2 % додецилсульфат натрію, 10 % сахарозу та 0,01 % бромфенолового синього, у співвідношенні 1:1. Для диск-електрофорезу зразки прогрівали протягом 2 хв., в свою чергу проби для ензим-електрофорезу нагріванню не піддавали.

Диск-електрофорез в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. Для отримання електрофореграми проводили диск-електрофорез за методом Леммлі [76]. Камера для вертикального електрофорезу є пластиковим резервуаром з анодними та катодними буферними відсіками, в яких містяться відповідні електроди (Bio-Rad laboratories inc., 2015). Для дослідження готували пластини гелю товщиною 1

мм, застосовували 12 % ПААГ в якості гелю для розділення макромолекул, а також використовували 4 % ПААГ в якості гелю для концентрації досліджуваних зразків. Для проведення електричного струму через електроди в камері для фореу готували електродний буфер, який містив Tris, гліцин та додецилсульфатнатрію (ДСН).

Гель для розділення макромолекул (12 % ПААГ) додавали між двома зафіксованими в положенні скельцями, які були закріплені бортами внизу і по бокам. Після внесення гелю очікували 1 год до повної полімеризації останнього. Зразки, які містять білки поміщали у лунки, сформовані в ПААГ для концентрації, котрий вносили над гелем для розділення, в якому вже відбулась полімеризація. Електроди камери для вертикального електрофореу (матеріал – платина) підключали до гнізда джерела живлення PowerPac Basic Power Supply (Bio-Rad). При проведенні досліду застосовували силу струму 19 мА в час проходження білкового вмісту зразків через гель для концентрації. В фазі проходження білкового вмісту зразків через гель для розділення – застосовували силу струму 38 мА (Bio-Rad laboratories inc., 2015).

Після завершення зазначених процесів, отриманий гель забарвлювали розчином Кумасі G-250 (0,125 %), що містить 96 % етанол, ізопропанол, а також концентровану оцтову кислоту. Далі пластину гелю промивали в 8 % розчині оцтової кислоти протягом години. За допомогою камери CANON IXUS 185 фотографували в цифровому форматі. Досліджені зразки аналізували, використовуючи програмне забезпечення від лабораторії TotalLab – CLIQS Gel Image Analysis Software.

Аналіз фракції пептидного пулу методом хроматографії, що поділяє за розмірами. Для розділення фракції пептидного пулу використовували хроматографію, що розподіляє за розміром [117]. Аліквоти об'ємом в 1 мл наносили на колонку з сефадексом Ж 15 в 0,05 М Tris-HCl буфері, рН 7,4, з додаванням 130 мМ NaCl. Стабільна швидкість нанесення складала 0,5 мл/хв. Для калібрування колонки використовували стандартні маркерні речовини з відомою молекулярною масою.

2.2.2. Гістологічні.

Для світлооптичного дослідження відбирали шматочки печінки у завчасно зважених тварин всіх груп. Відібрані зразки фіксували в 10 % розчині формаліну, при цьому тривалість даного процесу не перевищувала 1 – 2 доби. Зазначений фіксатор попереджує процеси ауторозщеплення та стабілізує клітини і тканини для їх подальшої обробки, та використання в процедурах забарвлення. Наступним етапом було проведення дегідратації зразків в спиртах зростаючої концентрації та заливка в парафінові блоки. З готових блоків виготовляли зрізи товщиною 4 – 5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином. Гістологічні препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera з системою виводу зображення з гістологічних препаратів [15].

2.2.3. Ультраструктурні.

Для проведення субмікроскопічних досліджень печінки експериментальних щурів забирали зразки органу розміром 1 мм та фіксували в 1 % розчині чотирьохокису осмію за Колфільдом. Далі проводили зневоднення у спиртах зростаючої концентрації (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) та ацетоні. Отриману суміш заливали в епон-аралдит, відповідно до стандартних методик. З блоків виготовляли напівтонкі зрізи, які забарвлювали толуїдиновим синім і за Хаят. Після попередньої орієнтації на напівтонких зрізах на ультратомах LKB III (Швеція) та Reihart (Австрія) виготовляли ультратонкі зрізи, які контрастували 2 % розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом ПЕМ-125К при збільшеннях в 4–10 тисяч раз.

2.2.4. Гістохімічні.

Для вивчення динаміки компенсаторно-приспосувальних процесів печінки при ГГЦ особливий інтерес представляє дослідження ключового

ферменту циклу трикарбонних кислот – сукцинатдегідрогенази. Гістохімічно виявляли цей мітохондріальний фермент за методом Нахласа. Ці дослідження здійснювали на зрізах, виготовлених в мікромом-кріостаті з нефіксованої тканини та використанням нітро-синього тетразолу. Осад у вигляді гранул диформагану синього кольору свідчив про наявність і локалізацію ензима.

Для вивчення особливостей накопичення глікогену в клітинах печінки зрізи забарвлювали за допомогою реактиву Шиффа, після попередньої обробки йодною кислотою (PAS-реакція) в модифікації Шабаша.

2.2.5. Статистичного аналізу.

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили, використовуючи комп'ютерні програми Origin 7.0, TotalLab 2.01. та Microsoft Excel. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

БІОХІМІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

Вагомим маркером розвитку патологічних змін в тканинах та органах організму є збільшення концентрації плазмового гомоцистеїну [188]. Це обумовлює визначення його рівнів в крові піддослідних тварин саме на початку дослідження, що дає змогу визначати відмінності концентрації гомоцистеїну в залежності від віку щурів контрольної групи та ступінь вираженості гіпергомоцистеїнемії у тварин дослідної групи, в порівнянні з контрольною. У старих щурів контрольної групи рівень гомоцистеїну був незначно вищим, ніж в дорослих і молодих, але не виходив за межі встановлених норм (див. табл. 3.1). В той же час, у тварин дослідної групи спостерігалось значне підвищення концентрації гомоцистеїну в порівнянні з контрольними – в 2,98 рази у молодих, 2,79 рази у дорослих і 2,58 рази у старих.

Таблиця 3.1

Рівень загального гомоцистеїну в сироватці крові тварин різного віку.

Підгрупи тварин		Умови дослідження	Гомоцистеїн, мкмоль/л
1	Молоді тварини	Контроль	6,23±0,38
		ГГц	18,61±1,83 ^{***}
2	Дорослі тварини	Контроль	6,89±0,71
		ГГц	19,24±0,57 ^{***}
3	Старі тварини	Контроль	8,46±0,46 [#]
		ГГц	21,82±2,46 ^{***}

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю у відповідній групі (***) – $p < 0,001$);

– $p < 0,05$ відносно молодих тварин; § – $p < 0,05$ відносно дорослих тварин.

За можливістю запуску процесів вільнорадикального окислення печінка займає одне з самих важливих місць в організмі. Враховуючи, що в печінці наявна значна кількість поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), тут створюються дуже сприятливе середовище для протікання ПОЛ. Стан ГГц сприяє надмірній продукції АФК, які утилізуються компонентами системи антиоксидантного захисту, захищаючи клітини від дії вільних радикалів (за нормальних умов). Одним із визначальних ферментів, що елімінує АФК є SOD [31]. В нашому дослідженні у щурів дослідної групи визначалось зниження рівня SOD, в порівнянні з тваринами контрольної групи, що може бути свідченням виснаження запасів ензиму та посиленням використання його для боротьби з вільними радикалами (див. табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Вплив ГГц на показники оксидативного стресу та активність SOD в печінці молодих, дорослих та старих тварин.

Підгрупи тварин		Умови дослідження	МДА, мкмоль/мг протеїну	Карбонільні групи, нмоль/мг протеїну	SOD, ум.од./мг протеїну
1	Молоді тварини	Контроль	2,84±0,08	1,63±0,13	3,53±0,35
		ГГц	3,93±0,17*	2,10±0,08*	2,45±0,20*
2	Дорослі тварини	Контроль	3,22±0,26 [#]	1,87±0,13 [#]	4,92±0,12 [#]
		ГГц	4,24±0,22**	2,46±0,14*	3,12±0,24***
3	Старі тварини	Контроль	3,93±0,22 [#]	2,17±0,13 ^{#§}	3,64±0,22 [§]
		ГГц	6,15±0,35*** ^{#§}	3,43±0,14*** ^{#§}	2,24±0,29* [§]

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю у відповідній групі (** – $p < 0,01$); # – $p < 0,05$ відносно молодих тварин; § – $p < 0,05$ відносно дорослих тварин.

Крім вищенаведених даних нами було проведено визначення рівнів МДА, які є маркерами ПОЛ і ОС та реєструються в організмі за умов деградації ПНЖК при значній кількості АФК. В результаті дослідження

спостерігається зростання вмісту МДА у молодих, дорослих та старих тварин дослідної групи в порівнянні з контролем – в 1,38, 1,31 та 1,56 рази відповідно (див. табл. 3.2).

ГГц, крім активації ПОЛ, часто асоціюють з окисним моделюванням білків, характерною ознакою чого є підвищене накопичення продуктів метаболізму білків, зокрема карбонільних груп [138]. За отриманими нами даними у тварин з ГГц спостерігається підвищення рівня карбонільних груп протеїнів в тканині печінки в порівнянні з контрольною групою (у молодих тварин в 1,29 рази, дорослих – 1,32 рази, старих – 1,58 рази (див. табл. 3.2).

Ймовірною причиною значного зниження вмісту загальних фосфоліпідів в печінці дослідних щурів всіх вікових категорій в порівнянні з контролем є активація ПОЛ. У молодих щурів з ГГц даний показник зменшувався у 1,57 рази, дорослих – 1,44 рази, старих – 1,59 рази (див. табл.3.3).

До розвитку деструктивних процесів, які спричиняють неспецифічний синдром ендогенної інтоксикації, одним з маркерів якого є МСМ, призводить активація ОС [71, 160]. МСМ належать до сполук з молекулярною масою 300-5000 Да та є токсичними продуктами деградації білків, що накопичуються в тканинах органів у фрагментованому вигляді. В ході нашого експерименту ми спостерігали у тварин з ГГц значне підвищення рівнів МСМ в печінці (див. табл. 3.3) та в сироватці крові (див. табл. 3.4), в порівнянні з щурами контрольної групи.

Таблиця 3.3

Вплив ГГц на вміст загальних фосфоліпідів в печінці молодих, дорослих та старих тварин.

Підгрупи тварин		Умови дослідження	Фосфоліпід, мкг/мг протеїну	МСМ ₁ , ум.од.	МСМ ₂ , ум.од.
1	Молоді тварини	Контроль	21,64±1,68	0,47±0,01	0,19±0,04
		ГГц	13,8±0,45*	1,97±0,06***	0,93±0,09***

Продовження табл. 3.3

2	Дорослі тварини	Контроль	26,16±1,04	0,47±0,01	0,26±0,03
		ГГц	18,20±0,99* [#]	1,43±0,04*** [#]	0,64±0,07*** [#]
3	Старі тварини	Контроль	24,30±0,66	0,72±0,04	0,23±0,04
		ГГц	15,30±0,74*	1,58±0,09*** [#]	0,72±0,05* [#]

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю у відповідній групі (** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$); # – $p < 0,05$ відносно молодих тварин; § – $p < 0,05$ відносно дорослих тварин.

Таблиця 3.4

Вплив ГГц на маркери ендогенної інтоксикації та рівень СРБ в сироватці крові молодих, дорослих та старих тварин.

Підгрупи тварин		Умови дослідження	МСМ ₁ , ум.од.	МСМ ₂ , ум.од.	СРБ, мг/л
1	Молоді тварини	Контроль	0,26±0,03	0,13±0,02	3,89±0,54
		ГГц	0,75±0,01*	0,41±0,06*	13,46±0,79***
2	Дорослі тварини	Контроль	0,45±0,03 [#]	0,17±0,02 [#]	3,87±0,30
		ГГц	0,67±0,05*	0,38±0,04*	16,43±0,68*** [#]
3	Старі тварини	Контроль	0,37±0,05 [#]	0,24±0,03 ^{#§}	4,98±0,63
		ГГц	0,63±0,06*	0,38±0,04*	9,987±0,74*** ^{#§}

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю у відповідній групі; # – $p < 0,05$ відносно молодих тварин; § – $p < 0,05$ відносно дорослих тварин.

Підтвердженням запуску запальних процесів та ендогенної інтоксикації було підвищення в крові рівня СРБ. У молодих щурів дослідної групи даний показник зростав в 3,46 рази, дорослих – 4,24 рази, старих – 2,0 рази (див. табл. 3.4).

Продукція запальних медіаторів, які пошкоджують печінку, є характерним проявом ГГц. Це, в свою чергу, є фактором, що стимулює

експресію TGF β (який є причиною важкого, незворотнього фіброзу печінки), диференціацію фібробластів в міофібробласти і надлишкову продукцію компонентів екстрацелюлярного матриксу. Згідно отриманих даних, найбільш вираженою була продукція TGF β у старих щурів з ГГц. Цей показник підвищувався в порівнянні з контрольною групою щурів в 2,02 рази. У молодих та дорослих тварин дослідної групи TGF β підвищувався в 1,39 та 2,03 рази відповідно, в порівнянні з контролем (див. табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вплив ГГц на рівень TGF β в сироватці крові молодих, дорослих та старих тварин.

Підгрупи тварин		Умови дослідження	TGF β , нг/мл
1	Молоді тварини	Контроль	27,2 \pm 6,15
		ГГц	54,9 \pm 2,18*
2	Дорослі тварини	Контроль	38,6 \pm 1,63
		ГГц	78,5 \pm 5,53*#
3	Старі тварини	Контроль	48,4 \pm 3,68#§
		ГГц	93,2 \pm 3,55***#§

Примітки: * – $p < 0,05$ відносно контролю у відповідній групі (***) – $p < 0,001$); # – $p < 0,05$ відносно молодих тварин; § – $p < 0,05$ відносно дорослих тварин.

Низкою клінічних досліджень підтверджено, що підвищений рівень гомоцистеїну є незалежним чинником ризику серцево-судинних патологій, нейродегенеративних захворювань, захворювань печінки та нирок. Незважаючи на те, що основною причиною гіпергомоцистеїнемії є дефекти на рівні генів, продукти яких задіяні у метаболізмі гомоцистеїну, відсоток хворих з цією патологією наразі швидко зростає. Окрім того, стан гіпергомоцистеїнемії часто супроводжує патогенез інших захворювань. Стан гіпергомоцистеїнемії може розвиватися внаслідок порушення збалансованих

умов харчування, що призводять до тривалого дефіциту вітамінів В6, В12 або фолієвої кислоти; може бути результатом шкідливих звичок, у тому числі хронічного вживання алкоголю або куріння; іноді спостерігається після прийому деяких ліків, а саме холестираміну і метформіну [202].

Печінка - ключовий орган, що залучений у підтримання гомеостазу [196]. Крім того, печінка є місцем для синтезу низки ферментів, які беруть участь у метаболізмі гомоцистеїну. Отже, порушення функціонального стану печінки може сприяти подальшому прогресуванню гіпергомоцистеїнемії та розвитку супутніх ускладнень. Розуміння патогенетичних механізмів змін на рівні печінки, спричинених порушенням обміну гомоцистеїну, має важливе значення для правильного і ефективного лікування пацієнтів з гіпергомоцистеїнемією та, у ряді випадків, навіть може попередити розвиток деяких серйозних ускладнень, таких як фіброз печінки, цироз або навіть рак.

У нашій роботі було досліджено протеолітичний гомеостаз, зокрема активність та рівень серинових протеаз, метал-залежних протеаз в печінці щурів з моделлю гіпергомоцистеїнемії.

Протеолітичну активність в печінці визначали загальноприйнятим методом використовуючи казеїн як субстрат, такий підхід дозволяє оцінити загальну протеолітичну активність. Наші результати виявили зростання цього показника у печінці щурів всіх експериментальних груп - казеїнолітична активність зростала у 1,3, 1,2 і 1,1 рази відповідно у молодих (група №1), зрілих (група №2) та старих (група №3) щурів (рис. 3.1).

Для з'ясування природи основних ферментів, відповідальних за посилення протеолізу в печінці щурів з гіпергомоцистеїнемією, нами було оцінено активність метало-залежних та серинових протеаз. Згідно з даними, наведеними на рисунку 3.2 А, у щурів з гіпергомоцистеїнемією було виявлено підвищення активності метало-залежних ферментів.

Активність метало-залежних ферментів перевищувала значення відповідного контрольного показника на 42% для групи №1; на 17% для групи № 2 і на 31% для групи № 3. Також було виявлено підвищення активності

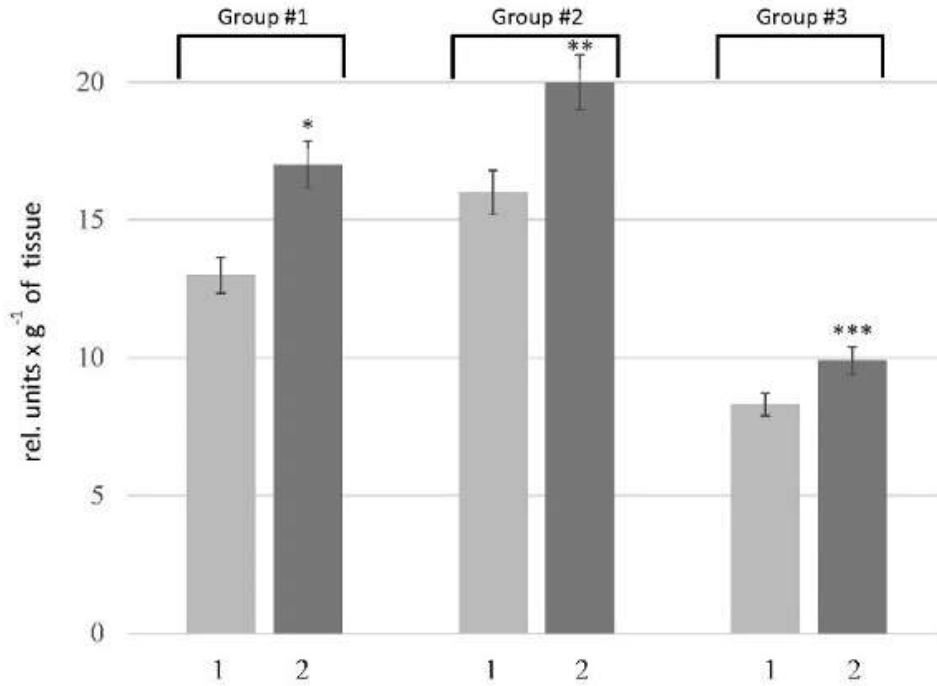
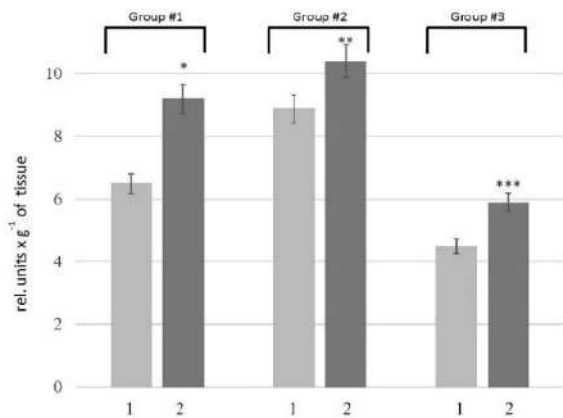


Рис. 3.1. Загальна протеолітична активність у гомогенаті печінки: 1 – контрольна група щурів; 2 – щури з моделлю гіпергомоцистеїнемії ($M \pm m$, $n=10$); * – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №1; ** – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №2; *** – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №3.

А



Б

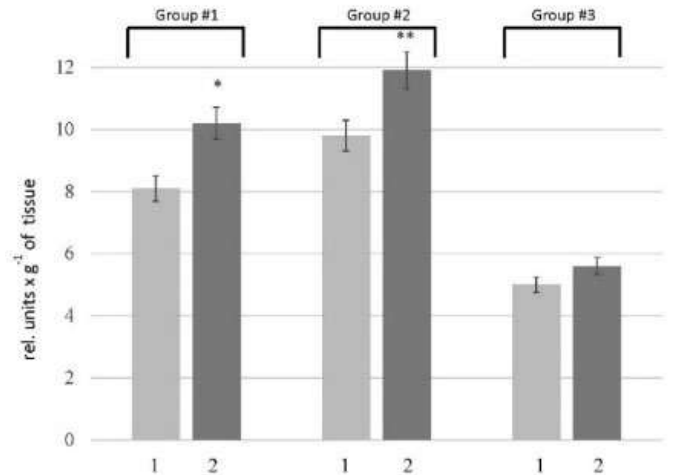


Рис. 3.2. Активність метало-залежних (А) та серинових протеаз (Б) у гомогенаті печінки: 1 – контрольна група щурів; 2 – щури з моделлю гіпергомоцистеїнемії ($M \pm m$, $n=10$); * – $p < 0,05$ різниця достовірна по

відношенню до контролю у групі №1; ** – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №2; *** – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №3.

серинових протеаз (рис. 3.2 Б). Однак зміни активності серинових протеаз не були настільки виражені, як у випадку метало-залежних ферментів. Активність серинових протеаз у щурів груп №1 і №2 зростала на 12-23% в порівнянні з відповідними контролями. У печінці щурів 3-ї групи змін цього показника не виявлено.

Для аналізу якісного складу серинових протеаз нами було виділено фракцію серинових протеаз з печінки тварин з гіпергомоцистеїнемією. Фракцію протеаз виділяли методом афінної хроматографії на бензамідин-сефарозі. Такий підхід дозволяє отримати загальну фракцію, що складається як з активних ферментів, так і з ферментів, нативна структура яких може бути порушена, проте активний центр збережено. Встановлено, що рівень серинових протеаз в печінці контрольних щурів з віком знижується (рис. 3.3).

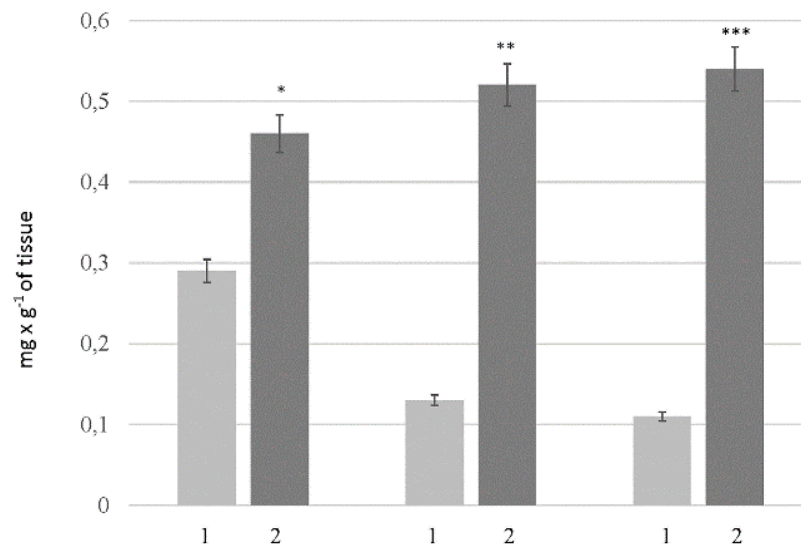


Рис. 3.3. Рівень серинових протеаз у гомогенаті печінки: 1- контрольна група щурів; 2 – щурі з моделлю гіпергомоцистеїнемії ($M \pm m$, $n=10$); * – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №1; ** – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №2; *** – $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №3.

Так, рівень серинових протеаз склав $0,291 \pm 0,014$; $0,135 \pm 0,006$ і $0,111 \pm 0,003$ мг на 1 г загальної маси печінки в печінці контрольних щурів 1, 2 і 3 груп відповідно. Навпаки, рівень серинових протеаз у щурів ГМ виявився вищим у старих тварин. Цей параметр становив $0,462 \pm 0,023$; $0,520 \pm 0,026$ і $0,541 \pm 0,027$ мг на 1 г загальної маси печінки для щурів груп №1, №2 та №3. Електрофоретичний аналіз отриманої фракції виявив зміни якісного складу серинових протеаз в печінці щурів з ГМ (табл. 3.6).

Основні відмінності від показників у групі контрольних тварин полягали у накопиченні низькомолекулярних білків та зниженні частки білків з молекулярною масою понад 50 кДа. Відсоток білків з молекулярною масою понад 50 кДа був вищим у фракції серинових протеаз контрольних тварин. Протилежна динаміка спостерігалася у щурів з гіпергомоцистеїнемією - відсоток білків з молекулярною масою в діапазоні 50-150 кДа знижувався, а відсоток низькомолекулярних білків значно зріс. Рівень білків з молекулярною масою 70-100 кДа знизився у 3,8 рази у щурів групи №1; у 4,1 рази у щурів групи №2 та у 5,3 рази у щурів групи №3. Відсоток білків з молекулярною масою менше 30 кДа склав $53,70 \pm 2,63\%$ у порівнянні з $1,61 \pm 0,08\%$ у контрольних тварин групи №1; $70,56 \pm 3,51\%$ у порівнянні з $11,33 \pm 0,47$ у контрольних тварин групи №2 та $74,12 \pm 3,51\%$ у порівнянні з $9,02 \pm 0,41$ у контрольних тварин групи №3.

Для більш детальної картини стану протеолізу у печінці тварин з моделлю гіпергомоцистеїнемії було визначено рівень деяких ММП, зокрема ММП-1, ММП-2 і ММП-3, що належать до метало-залежних ферментів. Було встановлено, що патогенез гіпергомоцистеїнемії супроводжується зростанням рівня цих ферментів - у щурів групи №1 рівні ММП-1, ММП-2 і ММП-3 зростали відповідно у 2,35 рази, 1,29 рази і 1,48 рази у порівнянні зі значенням у групі контрольних тварин (табл. 3.7).

Подібна тенденція була виявлена і в групі №3 - рівні ММП-1, ММП-2 і ММП-3 перевищували значення контролю в 1,16 рази, 1,9 рази і 1,3 рази відповідно. У щурів групи № 2 рівень ММП-1 навпаки знизився в 1,22 рази, а

Таблиця 3.6

Якісний склад фракції серинових протеаз печінки щурів з моделлю ГМ ($M \pm m$, $n=10$).

Білкова фракція, кДа	Група #1		Група #2		Група #3	
	Контроль, %	ГМ, %	Контроль, %	ГМ, %	Контроль, %	ГМ, %
>150	-	-	-	-	-	-
150-100	36,61±1,87	8,32±0,41*	25,57±1,23	8,23±0,40**	38,28±1,87	3,67±0,18***
100-70	29,56±1,35	7,75±0,35*	25,48±1,24	6,13±0,30**	25,31±1,25	4,76±0,21***
70-50	20,43±1,01	8,03±0,38*	23,47±1,20	2,62±0,11**	21,46±1,03	16,0±0,80***
50-30	11,82±0,54	22,18±1,09*	14,14±0,07	12,45±0,57**	5,94±0,25	1,46±0,07***
<30	1,61±0,08	53,70±2,63*	11,33±0,47	70,56±3,51**	9,02±0,41	74,12±3,51***

Примітки: * - $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №1; ** - $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №2; *** - $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №3.

Таблиця 3.7

Рівень ММП у гомогенаті печінки щурів з моделлю ГМ (M±m, n=10).

	Група #1		Група #2		Група #3	
	Ум. од·(мг білка) ⁻¹					
	Контроль	ГМ	Контроль	ГМ	Контроль	ГМ
ММР-1	17,10±0,85	40,21±2,1*	43,26±2,15	35,42±1,65**	49,75±2,41	57,85±2,85***
ММР-2	62,35±3,12	80,00±3,85*	70,23±3,44	141,13±7,00**	75,37±3,75	145,21±7,15***
ММР-3	99,77±4,55	147,31±7,25*	81,04±4,05	121,43±6,00**	73,41±3,65	95,22±4,75***

Примітки: * - $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №1; ** - $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №2; *** - $p < 0,05$ різниця достовірна по відношенню до контролю у групі №3.

рівні ММП-2 і ММП-3 також зростали - у 2 рази для ММП-2 і у 1,49 рази для ММП-3.

Згідно сучасної парадигми протеоліз відіграє ключову роль у підтримці загального «здоров'я» клітин. За фізіологічних умов швидкість протеолітичних процесів підлягає строгому контролю, щоб уникнути патологічних наслідків. За відсутності компенсаторних механізмів спрямованих на нормалізацію протеолітичного дисбалансу внутрішньоклітинні шляхи можуть бути порушені, що в багатьох випадках призводить до індукції апоптотичної чи некротичної програми загибелі клітин.

Результати проведеного дослідження доводять вплив гіпергомоцистеїнемії на протеолітичний баланс в печінці. Це проявляється у підвищенні загальної протеолітичної активності, активності метало-залежних та серинових протеаз. Враховуючи роль печінки як своєрідного «метаболічного хаба», що координує та визначає загальний метаболічний статус організму, зростання загальної протеолітичної активності в печінці щурів з моделлю гіпергомоцистеїнемії може бути одним з механізмів, що беруть участь в прогресуванні порушень, пов'язаних з гіпергомоцистеїнемією, не лише у межах цього органу, а й в інших тканинах і органах.

У сучасній літературі представлено значний масив даних, що свідчать про те, що навіть помірно підвищений рівень гомоцистеїну є вагомим незалежним чинником ризику атеросклерозу та тромботичних ускладнень [106]. Реалізація впливу гомоцистеїну може відбуватися за різними механізмами, наприклад, через вплив на ендотеліальну дисфункцію, посилення коагуляції, порушення фібринолізу. Структурні модифікації факторів згортання крові, викликані гомоцистеїном або його похідним тіолактоном, мабуть, є однією з найбільш важливих причин опосередкованих гомоцистеїном порушень гемостазу [206]. Значна кількість досліджень присвячена вивченню впливу гомоцистеїну на фактори системи гемостазу, присутні в кровотоці. Однак питання про те, чи впливає гіпергомоцистеїнемія на ці фактори в місці їх синтезу, залишається відкритим і потребує уточнення.

Оскільки більшість факторів системи гемостазу є сериновими протеазами, що синтезуються у печінці, можна припустити, що печінка може відігравати певну роль в порушенні гемостазу, спричиненого розвитком гіпергомоцистеїнемії саме за рахунок синтезу факторів з порушеною функціональною активністю [198].

З огляду на все вищезазначене, ми досліджували вміст і кількісний склад серинових протеаз в печінці щурів з моделлю гіпергомоцистеїнемії. Значне підвищення рівня серинових протеаз з молекулярною масою нижче 30 кДа одночасно зі зниженням рівня білків з молекулярною масою вище 50-70 кДа може бути результатом посиленого протеолізу і деградації серинових протеаз в межах органу. Серед можливих наслідків деградації серинових протеаз, в тому числі і факторів гемостазу, є поява молекул, які втратили свою біологічну активність, а відтак не можуть реалізувати властиві їм функції. У той же час, деякі з цих деградованих молекул потенційно можуть зберігати ферментативну активність за рахунок збереження активного центра [86]. Однак через порушення їх нативної структури вони можуть уникнути регуляції з боку канонічних інгібіторів. З цих причин утворення та накопичення деградованих форм серинових протеаз в печінці щурів з гіпергомоцистеїнемією може бути молекулярним механізмом, що лежить в основі прогресування захворювання і розвитку серйозних ускладнень. Отримані нами дані свідчать про участь ММП в розвитку протеолітичного дисбалансу в печінці. Надмірна або невідповідна активація ММП створює протеолітичне середовище сприятливе для деградації клітинних білків. За таких умов видається, що ММП можуть виконувати неканонічні функції, зокрема активувати інші ферменти, у тому числі й серинові протеази. Це припущення частково узгоджується зі збільшенням активності серинових протеаз в печінці щурів з гіпергомоцистеїнемією. Підвищений рівень ММП у печінці тварин частково може бути наслідком оксидативного стресу, який є типовою складовою патогенезу гіпергомоцистеїнемії [200]. Згідно з літературними даними, активні форми кисню через регуляцію окислювально-

відновних шляхів можуть впливати на експресію як протеаз, так і їх тканинних інгібіторів (ТІМП), що призводить до аномальної активності ММП [105]. Більш того, гомоцистеїн може активувати про-ММП в активні форми. Незважаючи на той факт, що ММП виявляють антифібротичний ефект, регулюючи обмін білків позаклітинного матриксу, неконтрольована та тривала активація деяких ММП, а саме ММП-3, навпаки може сприяти розвитку фіброзу. Крім того, доведено, що підвищений рівень ММП-2 пов'язаний з прогресуванням деяких пухлин [70, 160]. Отже, підвищення рівня і активності метало-залежних ферментів є негативним прогностичним критерієм за гіпергомоцистеїнемії.

Таким чином, у ході роботи було встановлено, що патогенез ГМ супроводжується протеолітичним дисбалансом у печінці, який виявляється у підвищенні загальної протеолітичної активності, активності серинових протеаз і особливо активності метало-залежних ферментів. Зростання рівня ММП-1, ММП-2 і ММП-3 вказує на участь цих ферментів в посиленні протеолізу, опосередкованого метало-залежними ферментами. Незважаючи на значне збільшення вмісту серинових протеаз, їх активність істотно не зростала. Це може бути пов'язано з протеолітичною деградацією серинових протеаз, що підтверджується змінами якісного складу цих ферментів, зокрема виявлено накопичення низькомолекулярних білків і зниження частки білків з молекулярною масою понад 50 кДа у фракції серинових протеаз. На підставі отриманих результатів можна говорити, що порушення протеолізу може бути важливою детермінантою розвитку порушень в печінці.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в одній міжнародній статті, що відноситься до міжнародної наукометричної бази Scopus (В'єтнам) [177] та одних тезах науково-практичної конференції [14].

РОЗДІЛ 4

МОРФОЛОГІЧНИЙ СТАН СТРУКТУРНИХ КОМПОНЕНТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

4.1. Мікроскопічна будова печінки інтактних молодих щурів

Дослідження мікроскопічної організації печінки інтактних молодих щурів показали, що орган має типову будову, яка характерна для даного виду тварин. Класичні печінкові часточки, як структурні одиниці, розділені тонкими прошарками пухкої волокнистої сполучної тканини. В центрі часточки знаходиться центральна вена, яка має помірний, часто повнокровний просвіт. У кутах часточки проходять тріади, до складу яких входять міжчасточкові артерії, вени та жовчні протоки. Тріаду оточує невелика кількість пухкої сполучної тканини.

Паренхіму печінки складають гепатоцити, які формують трабекули, що радіально сходяться до центральної вени. Гепатоцити мають полігональну форму, центрально розташоване сферичне ядро з одним або двома ядерцями. У молодих тварин зрідка зустрічаються двоядерні гепатоцити. На гістологічних препаратах, зафарбованих гематоксиліном та еозином, цитоплазма клітин є слабо оксифільною. Синусоїдні капіляри, які проходять між трабекулами і впадають у центральну вену, у молодих щурів мають розширений просвіт і тонку стінку, яка утворена плоскими видовженими ендотеліальними клітинами з овальним ядром (рис. 4.1). Між ендотеліоцитами зустрічаються поодинокі клітини Купфера.

Проведені гістохімічні дослідження сукцинатдегідрогенази інтактних молодих тварин показали, що її вміст визначається в цитоплазмі гепатоцитів у формі дрібних синіх грудок (рис. 4.2).

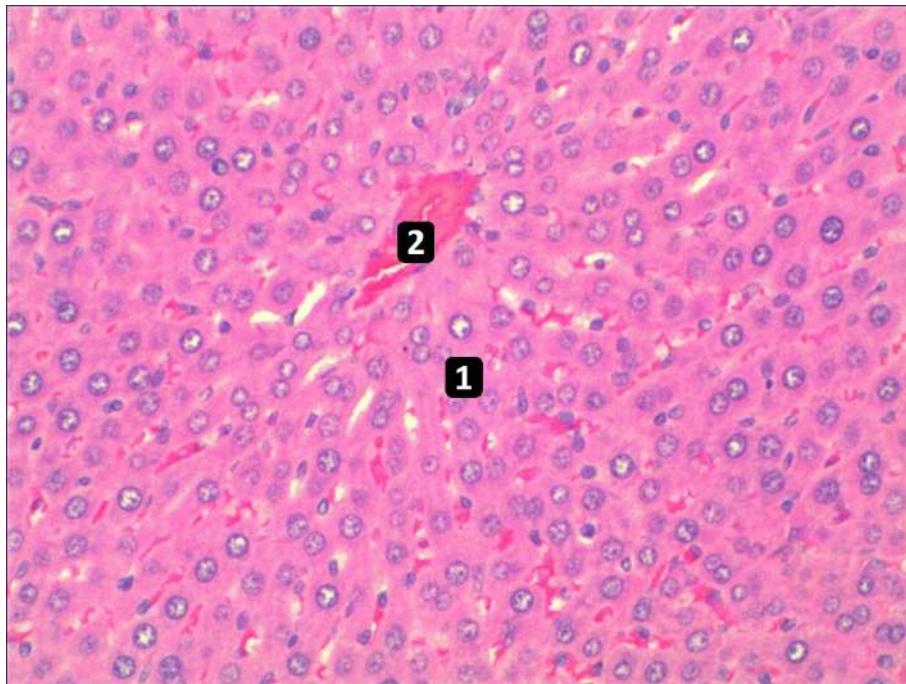


Рис. 4.1. Мікроскопічна будова печінки інтактної молоді тварини. Часточково-балкове розміщення гепатоцитів (1), центральна вена (2). Зabarвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

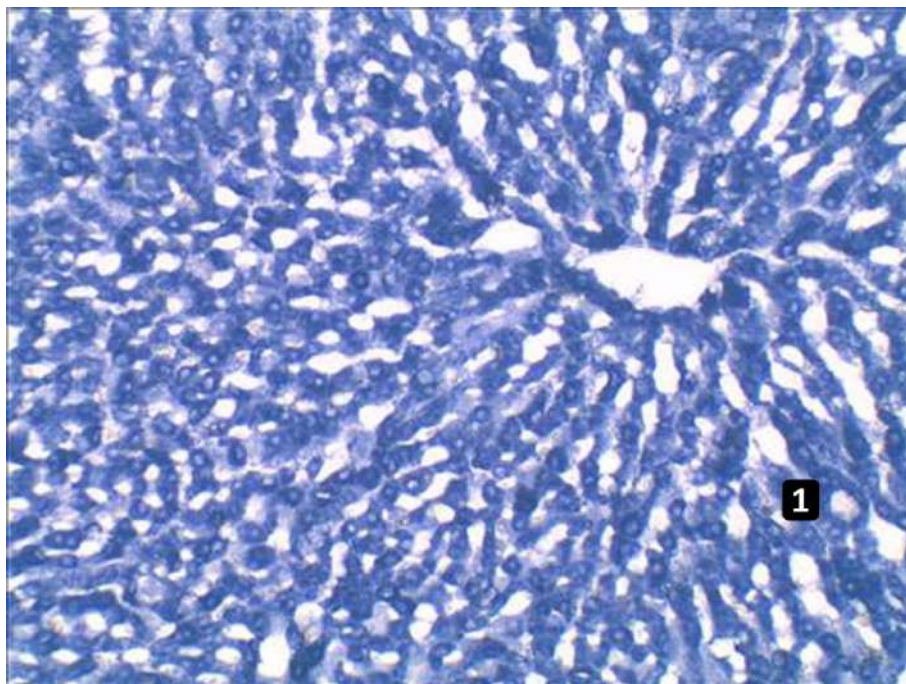


Рис. 4.2. Активність сукцинатдегідрогенази в печінці інтактної молоді тварини. Локалізація ферменту в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді інтенсивно забарвлених грудок диформазау (1). Метод Нахласа. $\times 200$.

Гістохімічне визначення вмісту глікогену в печінці інтактних молодих тварин показало, що вказана трофічна сполука наявна в цитоплазмі гепатоцитів у формі дифузного, переважно рівномірного скупчення рожево-червоних, малинових гранул (рис. 4.3).

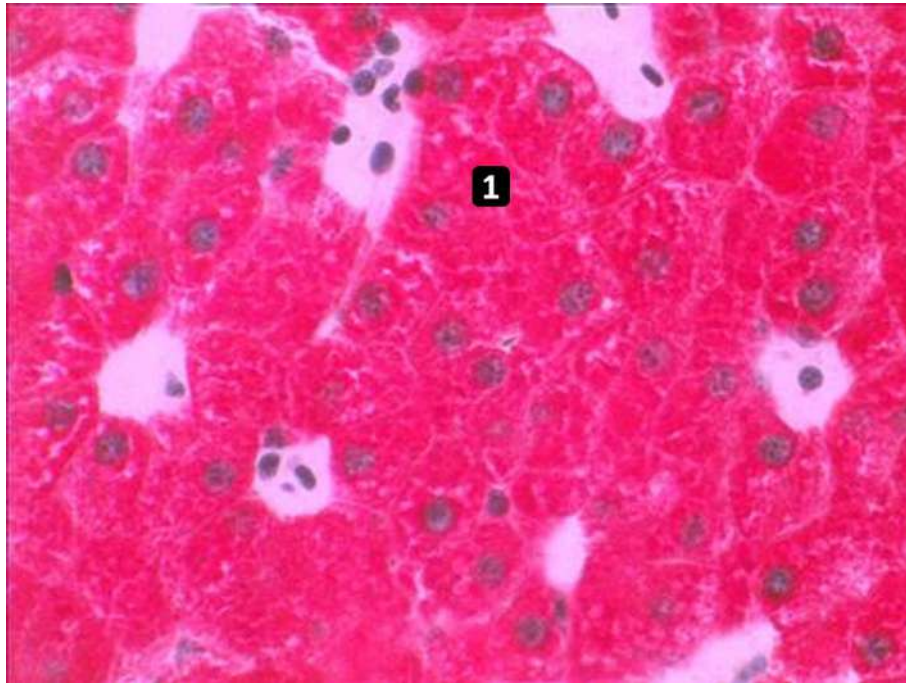


Рис. 4.3. Активність глікогену в печінці інтактних молодих тварин. Наявність трофічного включення в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді чисельних червоних грудок (1). Метод Шабадаша. $\times 400$.

4.2. Мікроскопічна будова печінки інтактних зрілих щурів

Мікроскопічна організація печінки інтактних зрілих щурів подібна до печінки молодих тварин. Класична печінкова часточка огорнута тонким прошарком пухкої волокнистої сполучної тканини. В центрі часточки знаходиться центральна вена безм'язового типу, форма якої така, як в молодих тварин. У кутах часточки проходять портальні тракти, які містять тріади, лімфатичні судини та невелику кількість пухкої сполучної тканини. Печінкові балки або перекладини радіально сходяться до центральної вени. Вони

утворені гепатоцитами, які мають полігональну форму, центрально розташоване сферичне ядро, оксифільну цитоплазму. На відміну від молодих тварин, у зрілих щурів частіше зустрічаються двоядерні паренхіматозні клітини (рис. 4.4).

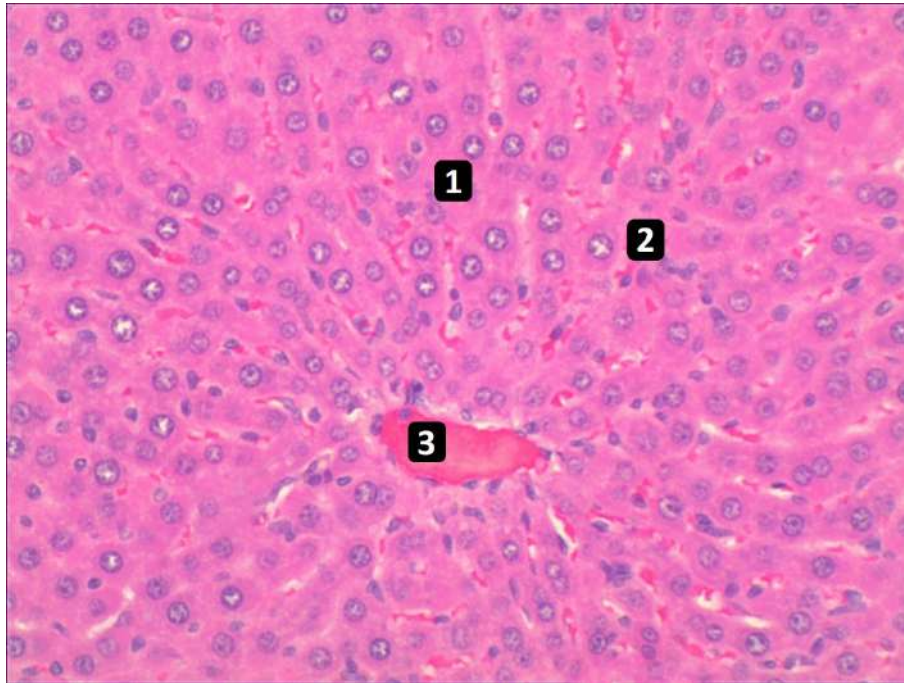


Рис. 4.4. Мікроскопічна будова печінки інтактної зрілої тварини. Радіальне, балкове розташування гепатоцитів (1), синусоїдні капіляри (2), центральна вена (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

Синусоїдні капіляри, які проходять між трабекулами і впадають у центральну вену, у зрілих щурів мають помірно розширений просвіт і тонку стінку. Ендотеліальні клітини, які вистеляють синусоїди, мають видовжену форму та овальне ядро. Між ендотеліоцитами зустрічаються поодинокі клітини Купфера, як і в молодих тварин.

Гістохімічне вивчення вмісту сукцинатдегідрогенази інтактних зрілих тварин показало, що даний ферментний білок виявляється в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді скупчення невеликих синіх грудок, при цьому більша активність ферменту спостерігається в централобулярній зоні печінкових часточок (рис. 4.5).

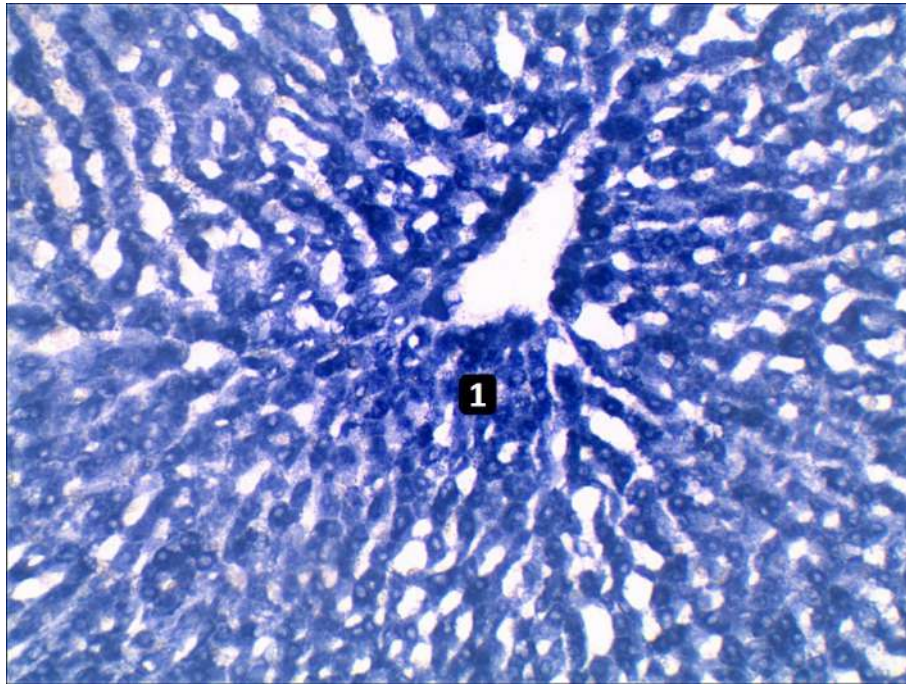


Рис. 4.5. Активність сукцинатдегідрогенази в печінці інтактної зрілої тварини. Вміст ферменту в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді інтенсивно забарвлених грудок диформазану (1). Метод Нахласа. $\times 200$.

Гістохімічне дослідження наявності глікогену в печінці інтактних зрілих тварин показало, що вказаний складний вуглевод виявляється в цитоплазмі паренхіматозних клітин – гепатоцитів у вигляді яскраво рожево-червоних грудок по всій площі цитоплазми клітин (рис. 4.6).

4.3. Мікроскопічна будова печінки інтактних старих щурів

Мікроскопічна будова печінки інтактних старих щурів подібна до печінки зрілих тварин. На гістологічних препаратах чітко виражені класичні печінкові часточки, які оточені тонким прошарком пухкої сполучної тканини. Центральна вена має помірно розширений, повнокровний просвіт. Порівнюючи з молодими і зрілими тваринами, у старих тварин у складі портальних трактів наявне розростання пухкої волокнистої сполучної тканини. Печінкові балки

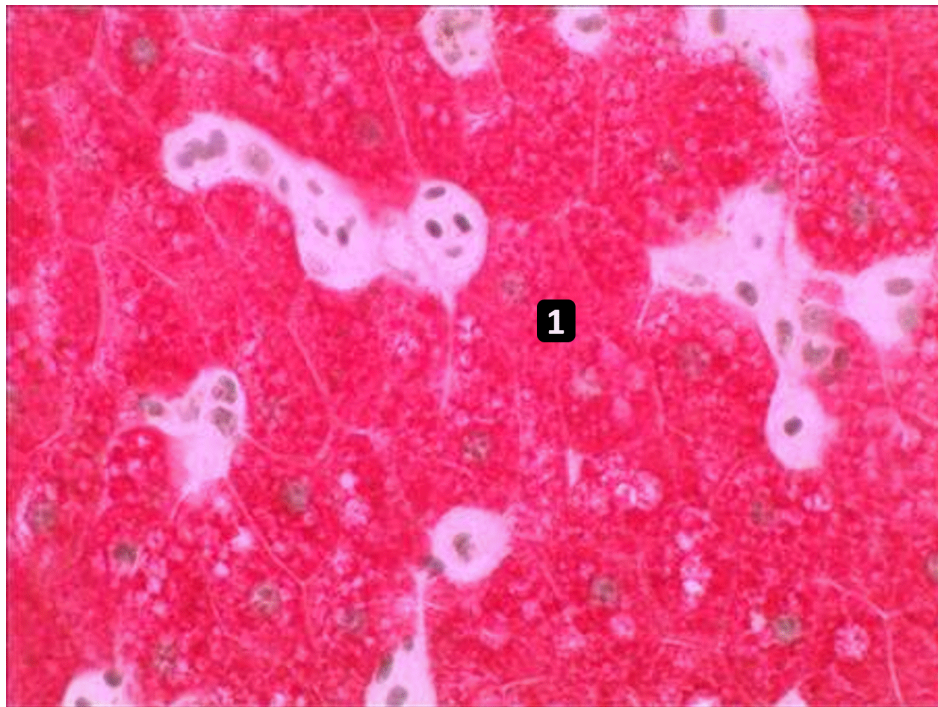


Рис. 4.6. Активність глікогену в печінці інтактної зрілої тварини. Вміст трофічного включення в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді чисельних червоних грудок (1). Метод Шабадаша. $\times 400$.

розташовуються переважно радіально по відношенню до центральної вени. Проведені дослідження показали, що розміри гепатоцитів та їх ядер є незначно збільшеними порівняно з гепатоцитами зрілих тварин. Зростає кількість двоядерних гепатоцитів. Цитоплазма клітин зафарбовується нерівномірно оксифільно, у ній містяться ліпідні включення. У деяких клітинах спостерігається наявність включень ліпофусцину (рис. 4.7).

Проведені мікроскопічні дослідження виявили зміни в синусоїдних гемокапілярах класичної печінкової часточки. Встановлено звуження просвіту синусоїдів або розширення перисинусоїдального простору та незначне потовщення периферійної частини ендотеліальних клітин. Виявлено збільшення кількості клітин Купфера порівняно із зрілими тваринами.

Гістохімічне дослідження сукцинатдегідрогенази інтактних старих тварин виявило, що її активність висока, проте дещо нижча порівняно з молодими

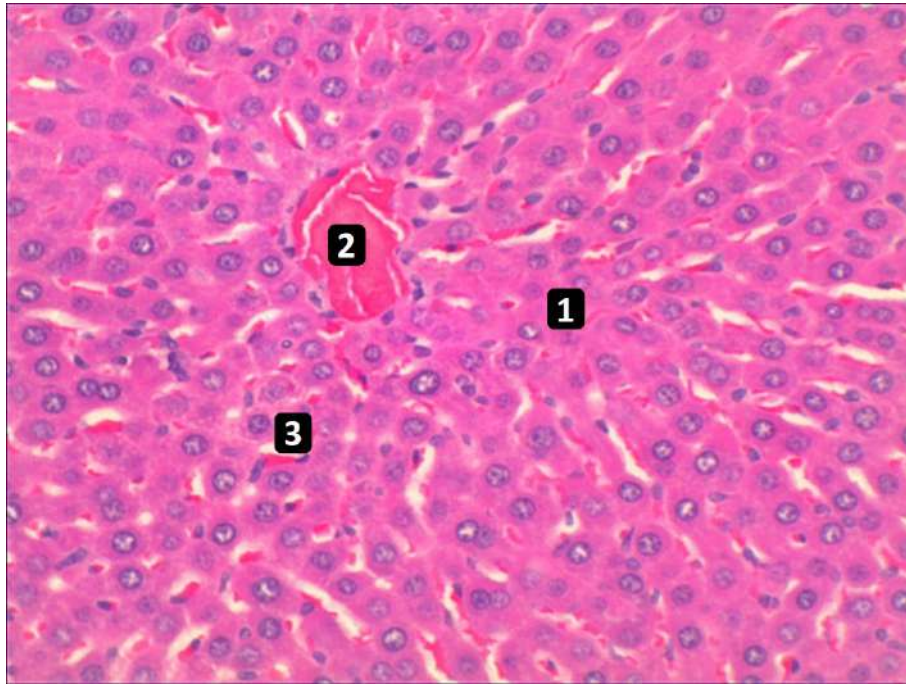


Рис. 4.7. Мікроскопічна будова печінки інтактної старої тварини. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Гепатоцити в складі часточки печінки (1), центральна вена (2), синусоїдні капіляри (3). $\times 200$.

і зрілими інтактними тваринами, визначається рівномірним вмістом в цитоплазмі гепатоцитів дрібних, інтенсивно забарвлених синіх грудок (рис. 4.8).

Гістохімічні дослідження глікогену в печінці інтактних старих тварин показали, що дана трофічна сполука виявляється в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді рожево-червоних грудок, однак його щільність була нижчою порівняно із молодими та зрілими інтактними тваринами (рис. 4.9).

4.4. Особливості гістологічних змін печінки молодих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії

Проведені мікроскопічні дослідження печінки молодих щурів при гіпергомоцистеїнемії виявили деструктивні зміни в органі, які розвивались на

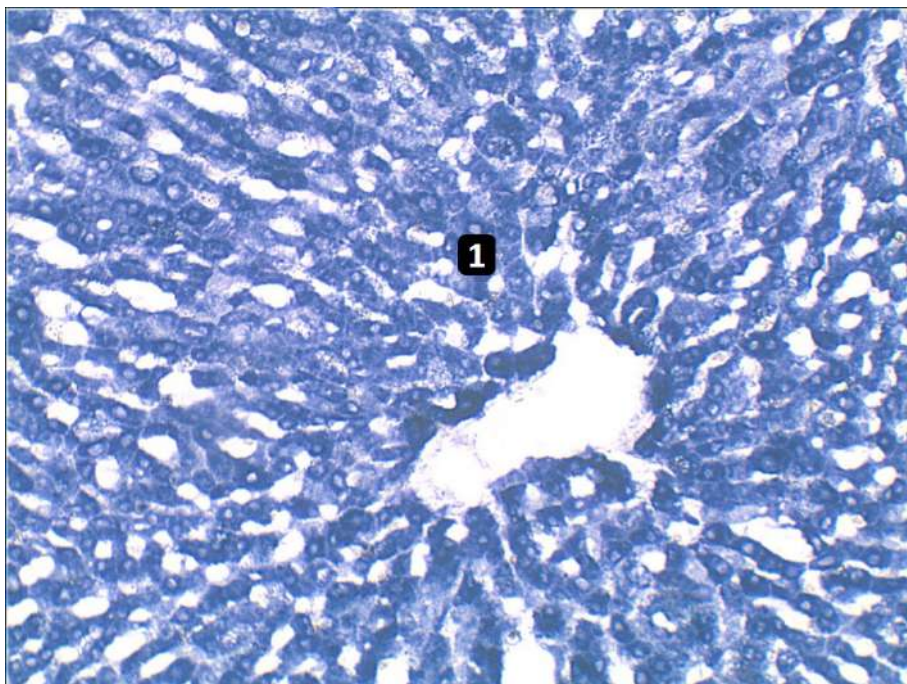


Рис. 4.8. Активність сукцинатдегідрогенази в печінці інтактної старої тварини. Наявність інтенсивно забарвлених грудок диформазану в цитоплазмі гепатоцитів (1). Метод Нахласа. $\times 200$.

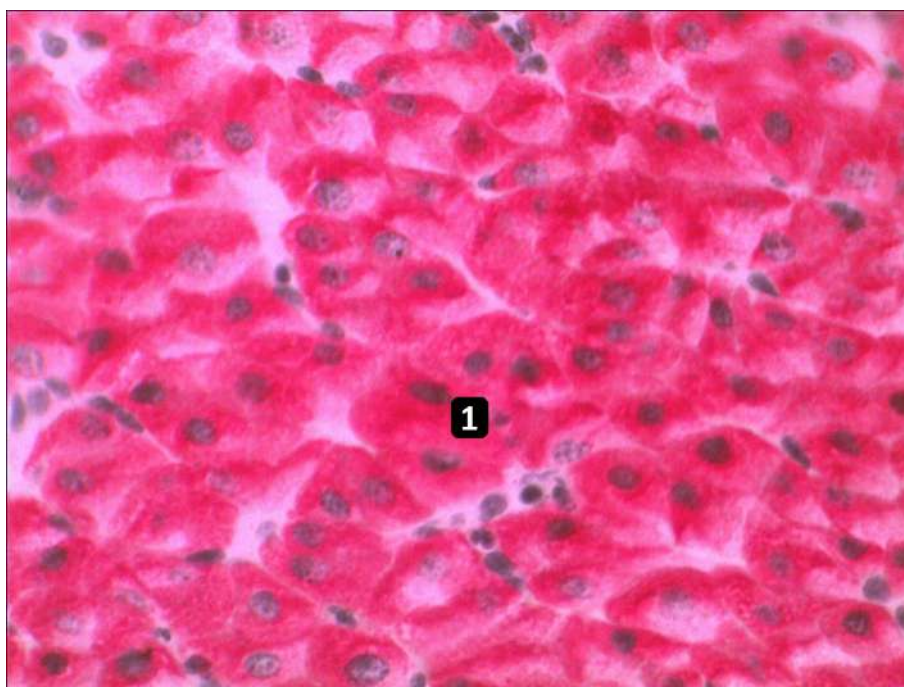


Рис. 4.9. Активність глікогену в печінці інтактних тварин. Локалізація трофічного включення в цитоплазмі гепатоцитів у вигляді чисельних червоних грудок (1). Метод Шабаша. $\times 400$.

тлі порушення кровопостачання. Встановлено незначне потовщення навколочасточкової сполучної тканини, дещо більший її розвиток спостерігався в складі портальних трактів. Деякі балки були не чітко організовані, а гепатоцити, які їх формували, були поліморфними з різним ступенем розвитку структурних змін у них. Серед гепатоцитів були клітини, які мали нормохромні ядра з чітко вираженими ядерцями, інші клітини містили гіперхромні ядра з невираженими ядерцями. Також рідко зустрічалися клітини з малюнками мітозу в цитоплазмі. Альтеративні зміни проявлялись і в цитоплазмі гепатоцитів, в більшості клітин спостерігалась вакуольно-гідропічна та жирова дистрофія.

Встановлено, що гіпергомоцистеїнемія провокує розвиток структурних змін у судинному руслі печінки. Виявлено повнокров'я та тромбози у центральних і підчасточкових венах, а також у міжчасточкових венах в складі триад. В той же час, у артерій триад спостерігалось потовщення їх стінки. Зміни також відображались і в синусоїдах. Просвіти більшості гемокапілярів були розширеними, заповнені еритроцитами, лейкоцитами та клітинами Купфера. Останні зустрічались також і в перисинусоїдальному просторі. Ендотеліальні клітини набрякли, простір Діссе розширений, подекуди інфільтрований лімфоцитами (рис. 4.10).

Проведене гістохімічне вивчення сукцинатдегідрогенази в гепатоцитах печінки молодих щурів при змодельованій гіпергомоцистеїнемії показало зниження активності в клітинах даного мітохондріального ферменту. Виявлено нерівномірну локалізацію сукцинатдегідрогенази в часточках печінки. Крупні, сині грудки диформагану забарвлюються інтенсивно переважно в гепатоцитах по периферії часточки. (рис. 4.11).

Вивчення вмісту глікогену в клітинах печінки молодих щурів при змодельованій гіпергомоцистеїнемії виявили зниження цієї трофічної сполуки. В більшості клітин всієї часточки щільність гранул глікогену зменшується, тільки в деяких клітинах периферійних ділянок часточки визначаються клітини які містять багато секреторних гранул (рис. 4.12).

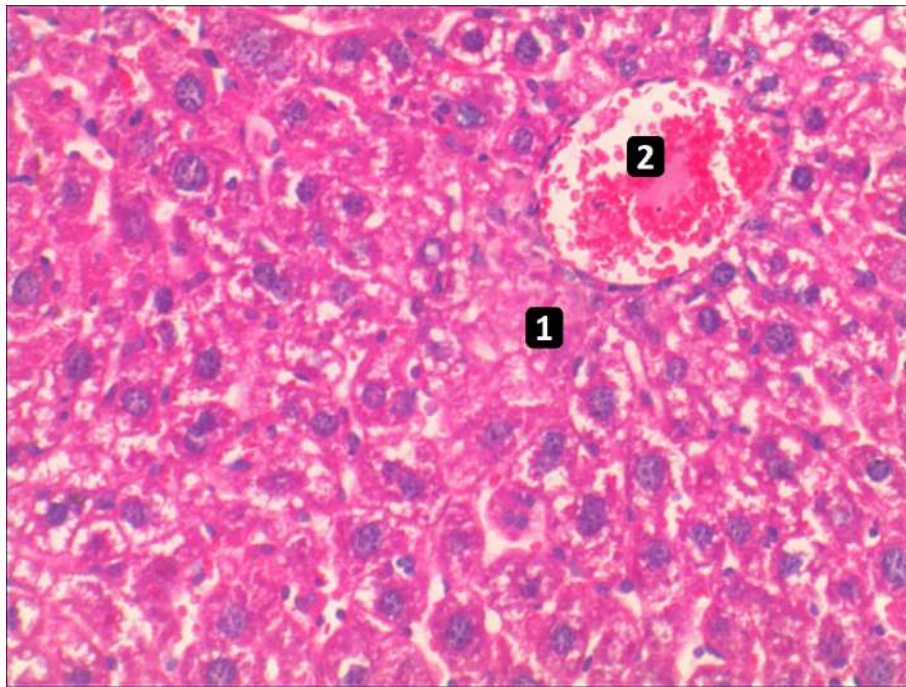


Рис.4.10. Гістологічні зміни печінки молодшої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Дистрофічно змінені гепатоцити (1), повнокровна розширена вена (2). Зabarвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

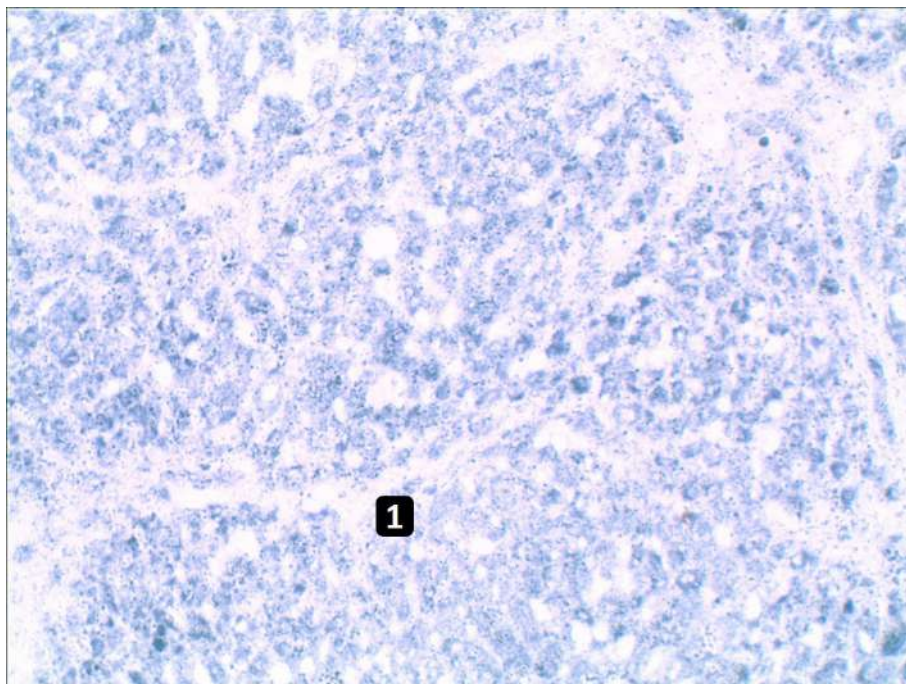


Рис. 4.11. Низька активність сукцинатдегідрогенази в печінці молодшої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Невисокий вміст грудок диформазиу в цитоплазмі гепатоцитів (1). Метод Нахласа. $\times 200$.

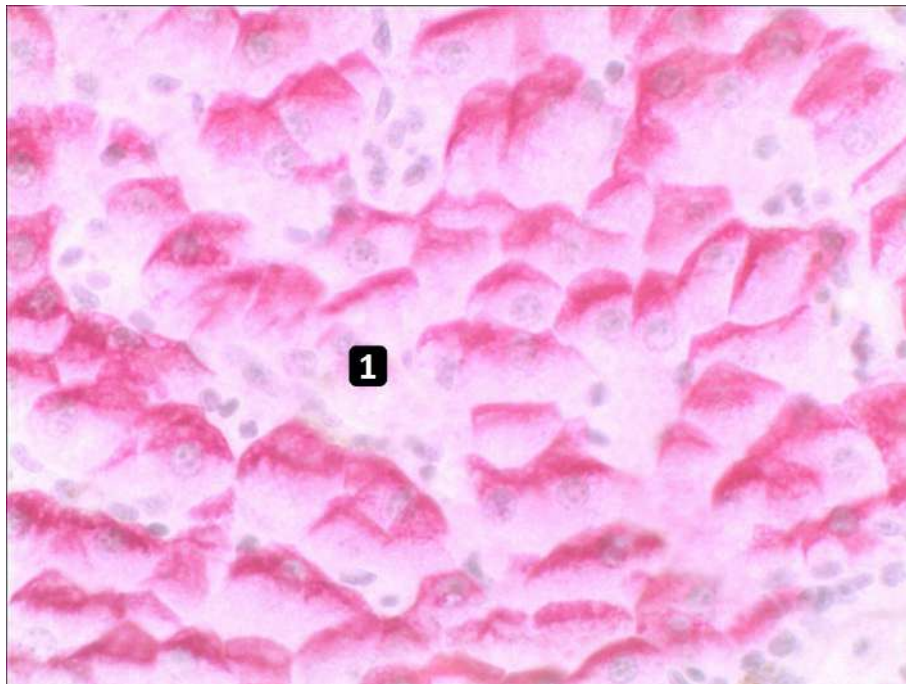


Рис. 4.12 Наявність глікогену в печінці молоді тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Невисокий вміст грудок глікогену у цитоплазмі більшості гепатоцитів (1). Метод Шабадаша. $\times 400$.

4.5. Особливості гістологічних змін печінки зрілих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії

Дослідження мікроскопічної організації печінки зрілих тварин при гіпергомоцистеїнемії виявили більш виражені структурні зміни в органі, порівняно з молодими тваринами. Встановлено помітне потовщення волокнистої сполучної тканини навколо часточок та в складі портальних трактів. Виявлялася дисконплектація печінкових балок. У гепатоцитах ядра були гіперхромними, пікнотично зміненими. У цитоплазмі гепатоцитів спостерігалися ознаки гідропічної та жирової дистрофії. Подекуди зустрічались осередки некрозу паренхіми печінки. Суттєві зміни наявні і в судинному руслі печінки зрілих тварин. У переважній більшості центральних,

підчасточкових та міжчасточкових вен виявлено повнокров'я, їх стінки були розширені та витончені (рис.4.13).

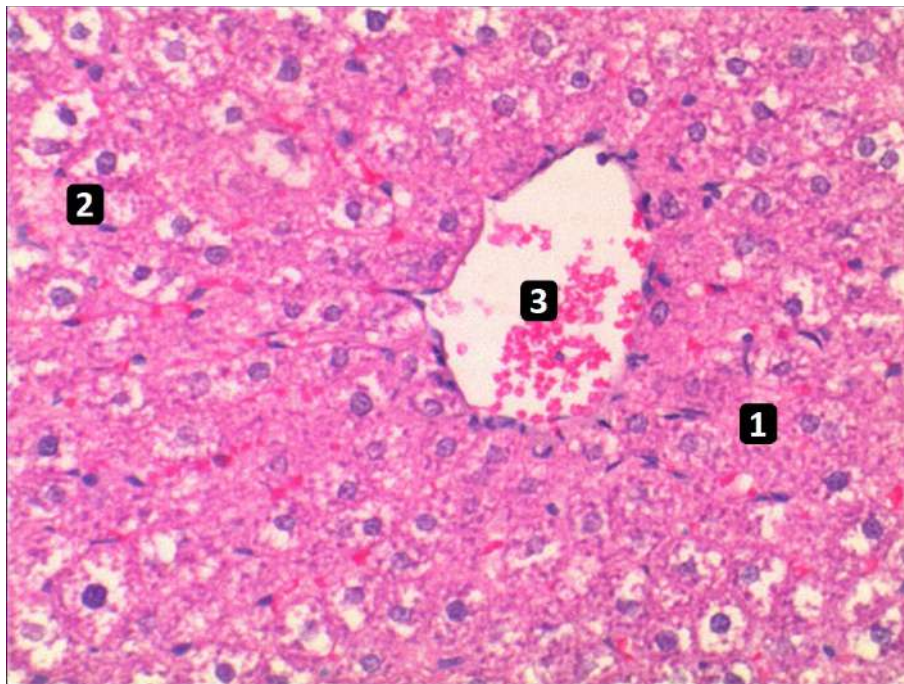


Рис. 4.13. Гістологічні зміни печінки зрілої тварини при змодельованій гіпергомоцистеїнемії. Порушення балкової організації органу (1), дистрофічно змінені гепатоцити (2), розширена центральна вена (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

Зросла товщина стінки міжчасточкових артерій за рахунок гіпертрофії та гіперплазії гладких міоцитів в середній оболонці та фіброзу зовнішньої оболонки. Наявна лейкоцитарна інфільтрація в портальних трактах. Значні зміни виявились в мікродиркуляторному руслі печінки. Просвіти синусоїдів були розширеними, часто заповненими форменими елементами крові. Ендотеліальні клітини частково ушкоджені, їх ядра були гіперхромними, пікнотично зміненними, а цитоплазма – набрякла, нерівномірна. Перисинусоїдальні простори розширені, інфільтровані лейкоцитами та макрофагами.

Гістохімічно встановлене значне зниження активності сукцинатдегідрогенази. Грудок диформазау в гепатоцитах було небагато вони були слабо базофільні (рис. 4.14).

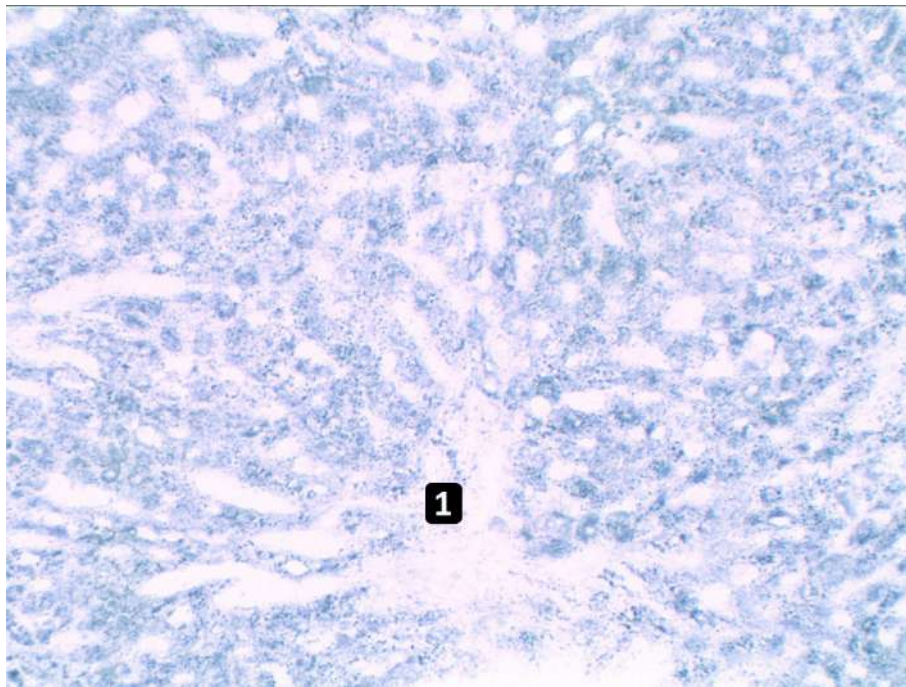


Рис. 4.14. Низька активність сукцинатдегідрогенази в печінці зрілої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. У цитоплазмі більшості гепатоцитів мало грудок диформазану (1). Метод Нахласа. $\times 200$.

Гістохімічне вивчення наявності глікогену в гепатоцитах печінки зрілих тварин за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії показало зменшення вмісту в цитоплазмі клітин вказаної трофічної сполуки, у частини клітин цитоплазма практично позбавлена цієї трофічної сполуки (рис. 4.15).

4.6. Особливості гістологічних змін печінки старих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії

Негативний вплив змодельованої гіпергомоцистеїнемії на морфологію печінки найбільш вираженим був у старих тварин. Виявлено фіброз органу, який проявлявся розростанням сполучної тканини навколо класичних печінкових часточок та в складі портальних трактів. Зріс вміст колагенових

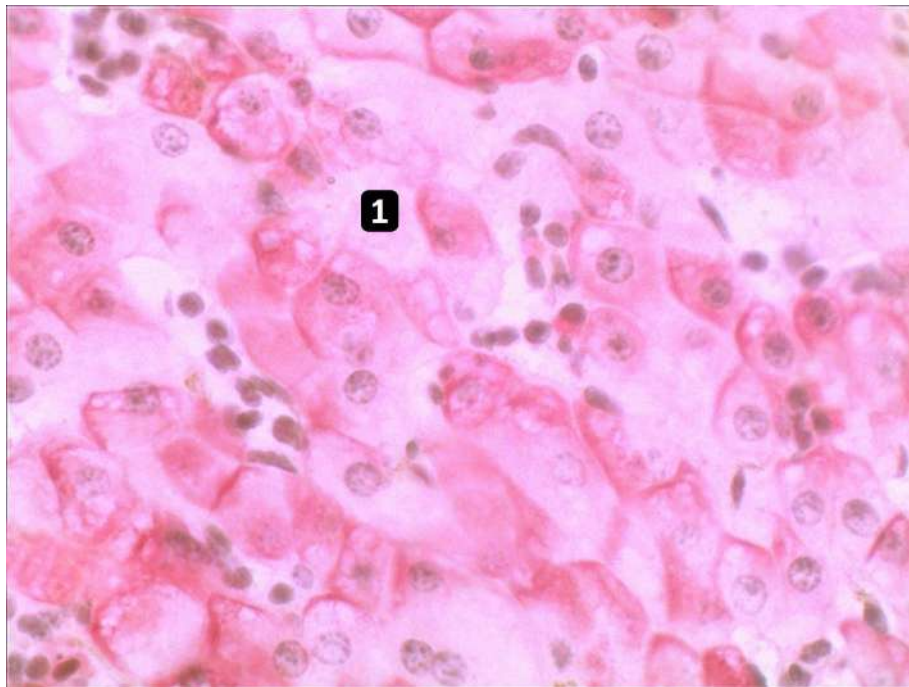


Рис. 4.15. Наявність глікогену в печінці зрілої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Невисокий вміст грудок глікогену у цитоплазмі гепатоцитів (1). Метод Шабадаша. $\times 400$.

волокон в перисинусоїдальних просторах, а також в просторах між гепатоцитами. У переважній більшості клітин паренхіми ядра були гіперхромними з маргінально розміщеним хроматином, часто пікнотично зміненими. У цитоплазмі клітин виявлено яскраво виражену жирову дистрофію. Також у цій групі тварин осередки некрозу гепатоцитів були більшими, ніж у тварин інших експериментальних груп.

Глибокі структурні зміни виявлялись в судинному руслі печінки старих тварин. Більшість центральних, підчасточкових та міжчасточкових вен залишались кровонаповненими. У міжчасточкових артерій ще більше зросла товщина стінки, порівняно із зрілими тваринами. У їх просвіті виявлялись тромби та десквамовані ендотеліоцити. У портальних трактах виявлялись скупчення лімфоцитів, нейтрофілів, макрофагів. Більш глибокі зміни виявились в мікроциркуляторному руслі печінки старих тварин, порівняно зі зрілими тваринами. Ендотеліальні клітини були більш ушкодженими. Ядра у

них гіперхромні, пікнотично змінені, з маргінальним розташуванням гетерохроматину. Цитоплазма набрякла, просвітлена. Перисинусоїдальні простори розширені, зі значним вмістом колагенових волокон та клітин фібробластичного ряду, нейтрофілів, лімфоцитів та макрофагів у них (рис. 4.16.).

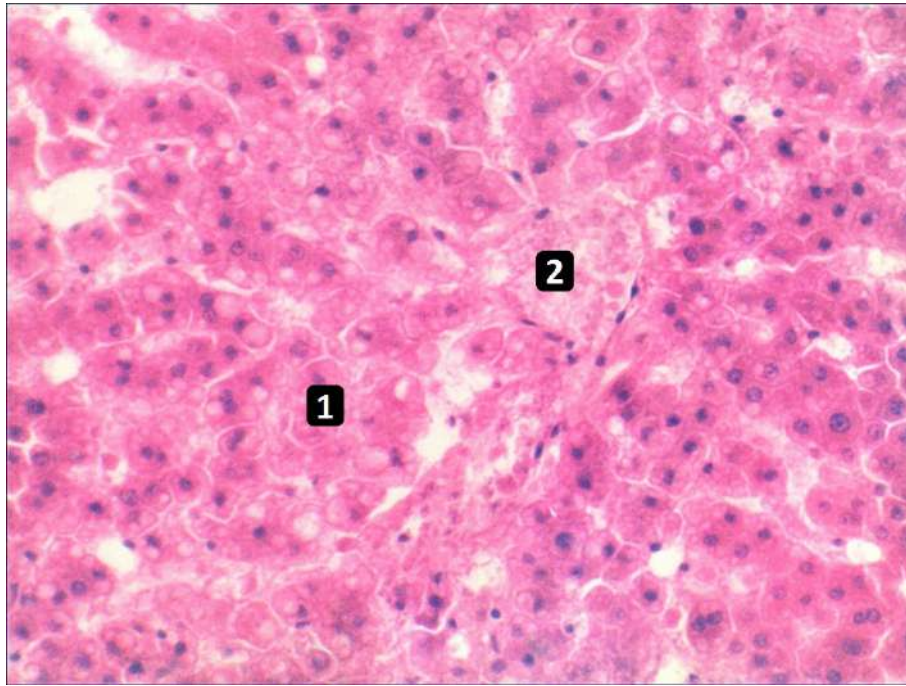


Рис. 4.16. Гістологічні зміни печінки старої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Гепатоцити із дрібнокрапельною жирковою дистрофією (1), повнокровна центральна вена (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. $\times 200$.

Гістохімічне дослідження активності сукцинатдегідрогенази в даній групі тварин показали значне зниження, тільки деякі гепатоцити містили в цитоплазмі грудки диформазау (рис. 4.17).

Гістохімічне вивчення вмісту глікогену в клітинах печінки старих тварин за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії показало низький вміст в цитоплазмі гепатоцитів цієї трофічної сполуки. Окремі клітини містили грудки глікогену, більшість клітин печінки практично не містили його (рис. 4.18).

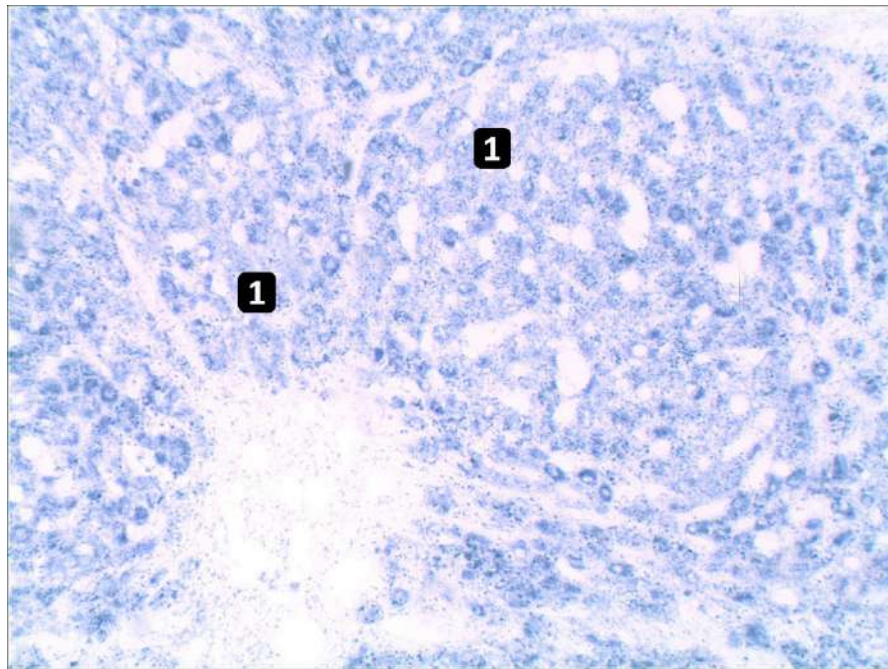


Рис. 4.17. Низька активність сукцинатдегідрогенази в печінці старої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Мало грудок диформазау в цитоплазмі більшості гепатоцитів (1). Метод Нахласа. $\times 200$.

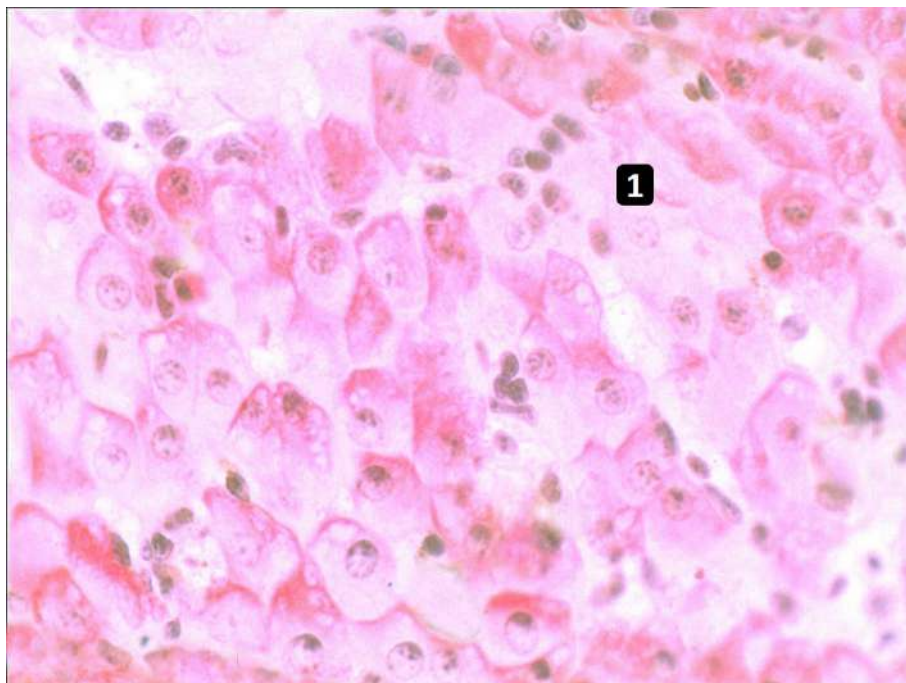


Рис. 4.18. Вміст глікогену в печінці старої тварини за умов змодельованої гіпергомоцистеїнемії. Небагато грудок глікогену в цитоплазмі окремих гепатоцитів (1). Метод Шабадаша. $\times 200$.

Таким чином, проведенні дослідження мікроскопічної організації печінки різних вікових груп показали, що печінка має типову будову, яка характерна для даного виду тварин. Встановлено, що в стромальних та паренхіматозних компонентах печінки старих тварин проявляються вікові зміни у вигляді порушення кровопостачання органу, незначним потовщенням сполучної тканини та зростанням кількості ліпідних включень у гепатоцитах. Дослідження мікроскопічної організації печінки різних вікових груп при змодельованій гіпергомоцистеїнемії показали, що даний чинник викликає значні пошкодження структурних компонентів органа, глибина яких посилюється з віком. Патологічний вплив гіпергомоцистеїнемії проявляється розвитком фіброзу печінки, значними порушеннями судинного русла, глибокими альтеративними та некротичними змінами з розвитком жирової дистрофії гепатоцитів в органі.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами в двох статтях у фахових наукових журналах України [113, 149] та трьох тезах науково-практичних конференцій [10, 12, 13].

РОЗДІЛ 5

ДИНАМІКА УЛЬТРАСТРУКТУРНИХ ЗМІН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ЗА УМОВ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

5.1. Ультроструктура печінки інтактних молодих щурів

Для порівняння впливу гіпергомоцистеїнемії на ультроструктурні зміни печінки молодих щурів ми дослідили її морфологію у інтактних молодих тварин. При електронно-мікроскопічному дослідженні печінка інтактних молодих щурів мала притаманну їй будову. Печінкові пластинки в класичних печінкових часточках утворені двома рядами гепатоцитів, об'єднаних за допомогою щільних сполучень, які обмежують вузькі (від 0,5 до 1мкм) просвіти жовчних каналців, в яких розташовані чисельні мікроворсинки гепатоцитів. Останні мали полідральну форму з діаметром від 20 до 25 мкм. В їх цитоплазмі диктіосоми комплексу Гольджі розташовані між ядром та біліарною поверхнею гепатоцитів у вигляді сплюснених мішечків та пухирців, поблизу яких розміщені лізосоми. Цистерни гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки добре структуровані та більше виражені в васкулярній частині клітини поблизу простору Діссе. Навколо гранулярної ендоплазматичної сітки локалізовані пероксисоми. Чисельні мітохондрії рівномірно розміщені в цитоплазмі гепатоцитів. Вони містили невелику кількість мітохондріальних крист та електронно-щільний матрикс, в якому розташовані гранули. Більша частина мітохондрій мали сферичну або овальну форму, розмір їх коливався в межах 0,8-2 мкм в діаметрі. В цитоплазмі гепатоцитів також виявляли включення глікогену та крапельки жиру. Гранули глікогену формували агрегати у вигляді розеток, тоді як не оточені мембранами жирові крапельки мали варіабельну електронну щільність. Більшість клітин печінки містили одне сферичне ядро, як правило,

розташоване в центрі. В ядрах гепатоцитів інтактних молодих щурів переважав еухроматин, в них виявляли 1-2 ядерця, які мали широко петлясту ретикулярну структуру (рис.5.1).

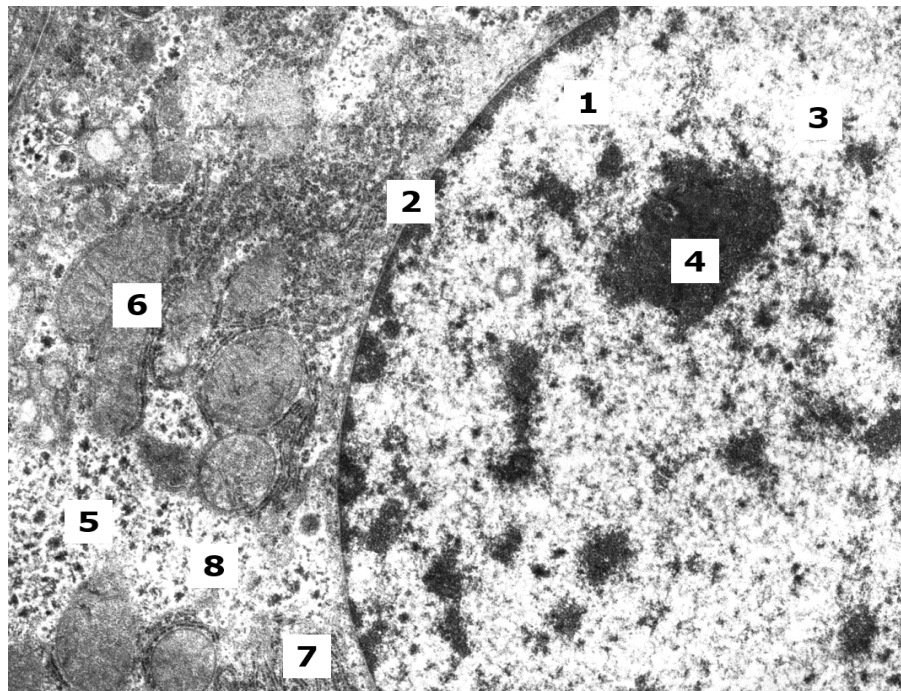


Рис. 5.1. Електроннограма гепатоцита печінки молодого щура: 1 – ядро гепатоцита; 2 – ядерна оболонка; 3 – еухроматин; 4 – гетерохроматин; 5 – цитоплазма гепатоцита; 6 – мітохондрії; 7 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки; 8 – гранули глікогену. Збільшення $\times 8000$.

У інтактних молодих щурів ширина перисинусоїдних просторів складала від 1 до 3 мкм. В них розташовані відростки зірчастих макрофагоцитів, жиронакопичувальних клітин, чисельні відростки васкулярної частини цитоплазми гепатоцитів, а також поодинокі колагенові та еластичні волокна. Подекуди між гепатоцитами виявляли поодинокі жиронакопичувальні клітини, які у інтактних молодих щурів мали округлу, видовжену або неправильну форму з великим ядром. Цитоплазма їх містила диктіосоми комплексу Гольджі у вигляді стовпчиків з 3-4 сплюснених цистерн з незначно розширеними кінцями, цистерни агранулярної та гранулярної ендоплазматичної сітки, рибосоми, поодинокі мітохондрії, а також чисельні краплини жиру, оточені осміофільним обідком. Вони однакові за розмірами і

локалізовані поблизу ядер, які розташовані на периферії клітини. Відростки перисинусоїдних жиронакопичувальних клітин у інтактних молодих щурів розміщені між біліарними поверхнями гепатоцитів (інтергепатоцелюлярні) та вздовж поверхні ендотеліоцитів синусоїдів (субендотеліальні) (рис. 5.2).

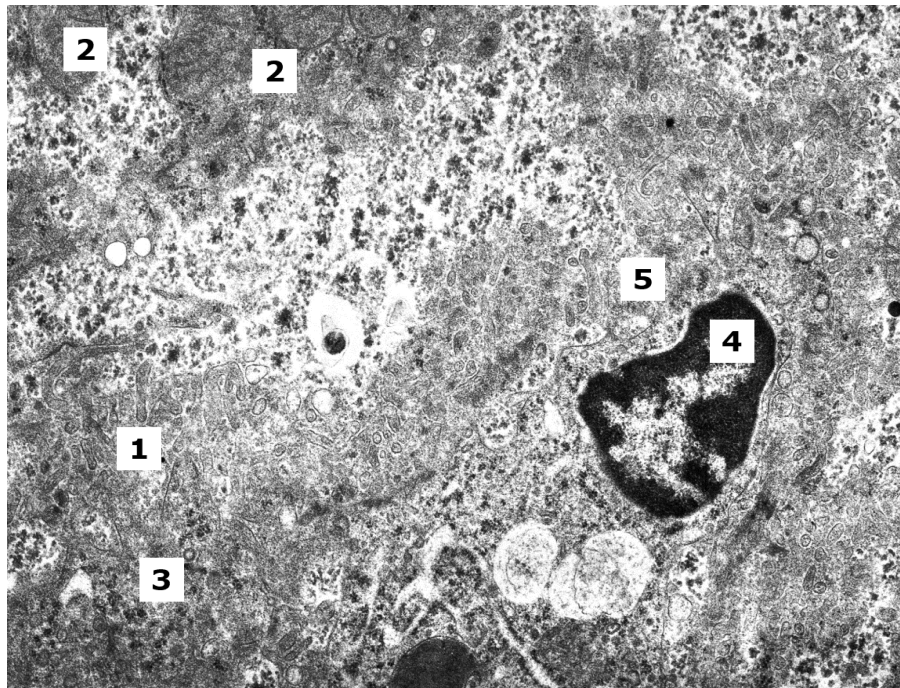


Рис. 5.2. Електронограма печінки молодого щура: 1 – цитоплазма гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – гранули глікогену; 4 – ядро перисинусоїдної клітини; 5 – цитоплазма перисинусоїдної клітини. Збільшення $\times 9600$.

Ендотеліоцити в стінках синусоїдів мали видовжену форму, ядра їх були розміщені в центрі. Навколо полюсів ядер розташована зона органел, яка містила диктіосоми комплексу Гольджі, цистерни агранулярної та гранулярної ендоплазматичної сітки та мітохондрії. В витонченій периферійній зоні ендотеліоцитів розташовані чисельні, зв'язані з базальною та адлюменальною поверхнею плазмолемми, а також вільні плазмолемальні везикули і фенестри без діафрагми, які формували пори. В контактній зоні цитоплазма ендотеліальних клітин синусоїдних капілярів утворювала тонкі відростки і формувала ситоподібні структури. Базальна мембрана в стінках синусоїдів не суцільна. Як правило, її фрагменти у вигляді пластівцеподібних структур виявляли навколо периферійних зон ендотеліоцитів (рис. 5.3).

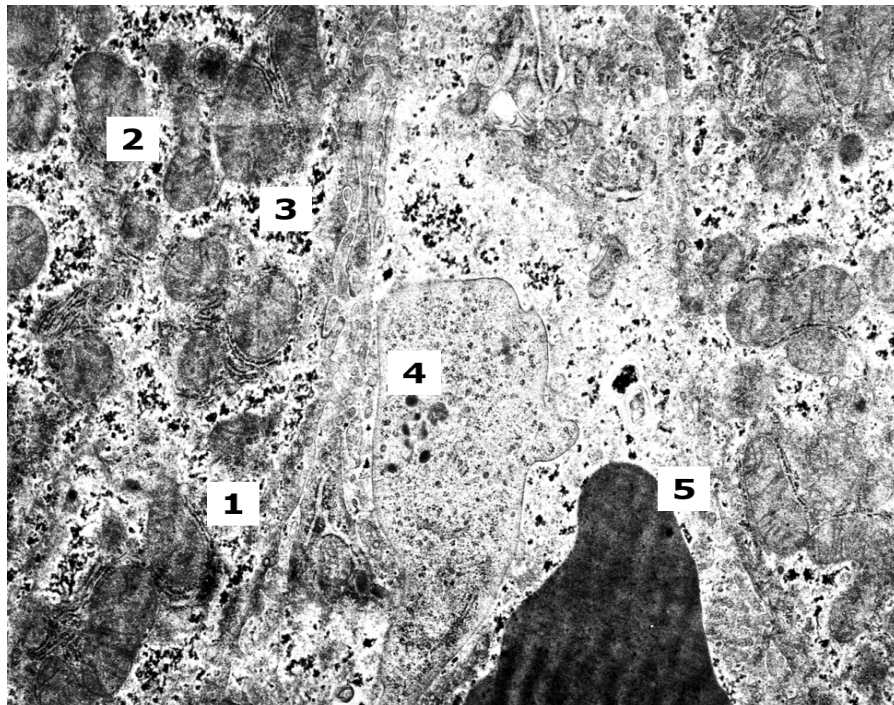


Рис. 5.3. Електронограма печінки молодого щура: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – гранули глікогену; 4 – периферійна зона цитоплазми ендотеліцита стінки синусоїда; 5 – просвіт синусоїда. Збільшення $\times 6400$.

В просвітах синусоїдів розташовані формені елементи крові, зірчасті макрофагоцити, а також печінкові клітини - вбивці. Зірчасті макрофагоцити мали ядра бобоподібної форми. Їх цитоплазма утворювала псевдоподії та складки мембрани. Поблизу ввігнутої поверхні ядра, в цитоплазмі розташовані диктіосоми комплексу Гольджі та чисельні лізосоми. Печінкові клітини - вбивці були сферичної форми, мали електронно-щільні ядра. Їх цитоплазма містила органели загального призначення, а також гранули з електронно-щільним центром, і піно- та фагоцитарні пухирці (рис. 5.4).

Слід відмітити, що у інтактних молодих щурів дистрофічно та деструктивно змінених органел в цитоплазмі гепатоцитів, ендотеліоцитів в стінках синусоїдів, жиронакопичувальних клітин та зірчастих макрофагоцитів не виявляли.

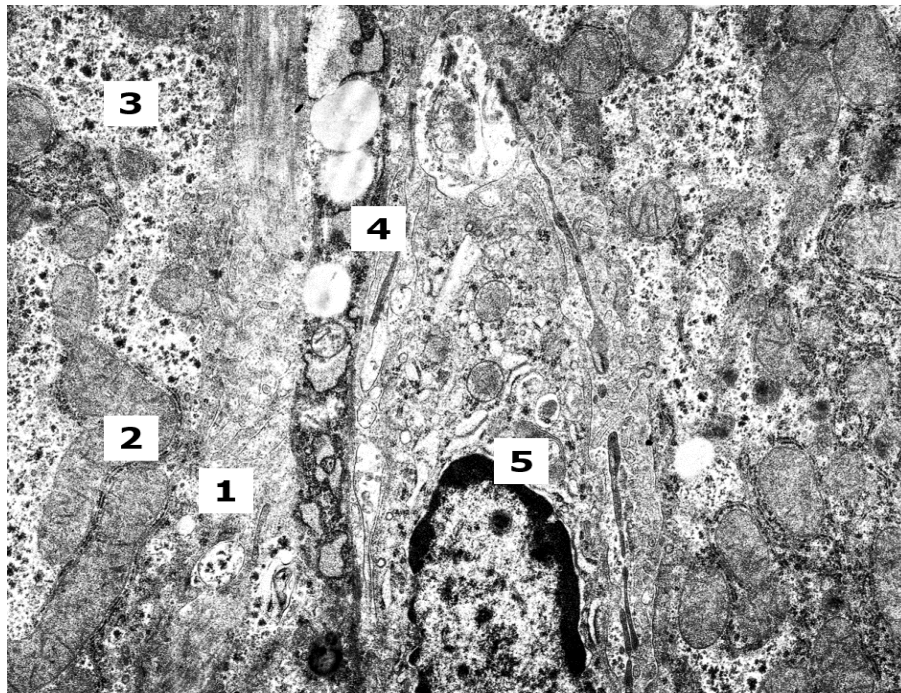


Рис. 5.4. Електронограма печінки молодого щура: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – чисельні мітохондрії; 3 – гранули глікогену; 4 – периферійна зона цитоплазми ендотеліцита стінки синусоїда; 5 – зірчастий макрофагоцит. Збільшення $\times 6400$.

5.2. Електронно-мікроскопічна будова печінки інтактних зрілих щурів

При ультраструктурному дослідженні печінка інтактних зрілих щурів за будовою була подібною до такої у інтактних молодих тварин. Ядерна оболонка гепатоцитів мала чіткі контури, перинуклеарні простори не розширені. Еухроматин рівномірно розподілений по всій площі зрізу ядер, а гетерохроматин у вигляді тонкої смужки розташований на периферії. До зовнішньої ядерної мембрани прикріплені рибосоми. В цитоплазмі гепатоцитів виявляли добре виражені цистерни гранулярної та агранулярної

ендоплазматичної сітки, диктіосоми комплексу Гольджі, лізосоми, пероксисоми (рис. 5.5). Мітохондрії рівномірно розміщені в цитоплазмі і за структурою та розмірами не відрізнялись від таких у молодих інтактних щурів. В цитоплазмі гепатоцитів зрілих інтактних щурів також виявляли включення глікогену та мілкі крапельки жиру. Однак чисельність останніх була більшою, ніж у молодих щурів Просвіти жовчних каналців містили численні короткі мікроворсинки гепатоцитів (рис. 5.6, 5.7). Ендотеліоцити в стінках синусоїдів по структурі також не відрізнялись від таких у інтактних молодих щурів. В їх ядрах переважав еухроматин, ядерна оболонка чітко контурована. Перинуклеарні простори рівномірні, не розширені.

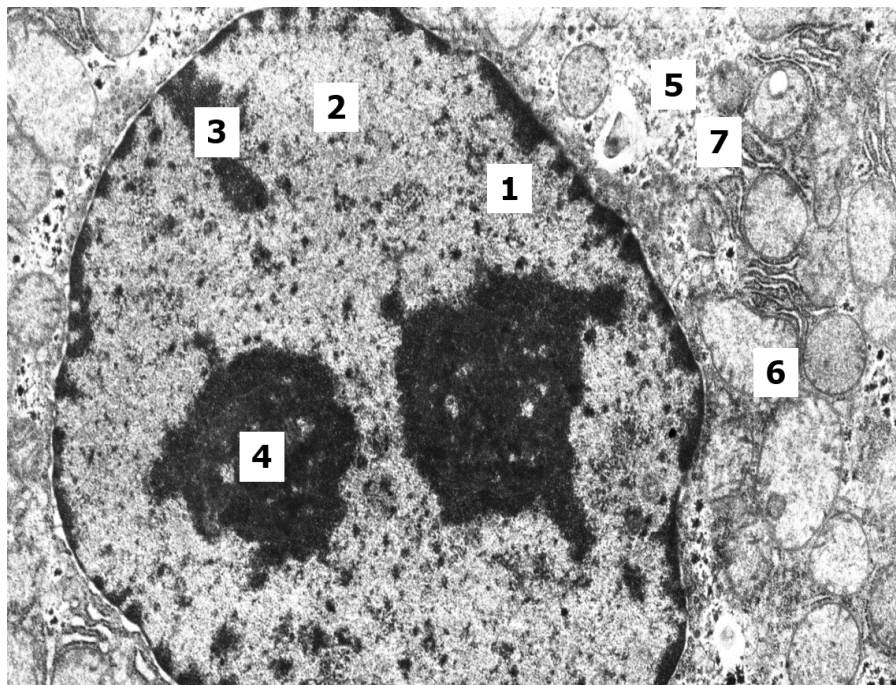


Рис. 5.5. Електронограма печінки зрілого щура: 1 – ядро гепатоцита; 2 – еухроматин; 3 – гетерохроматин; 4 – ядерце; 5 – цитоплазми гепатоцита; 6 – мітохондрії; 7 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки. Збільшення $\times 6400$.

Цитоплазма ендотеліоцитів синусоїдів в зоні органел містила мітохондрії, диктіосоми комплексу Гольджі, цистерни гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки та невелику кількість лізосом. Мітохондрії

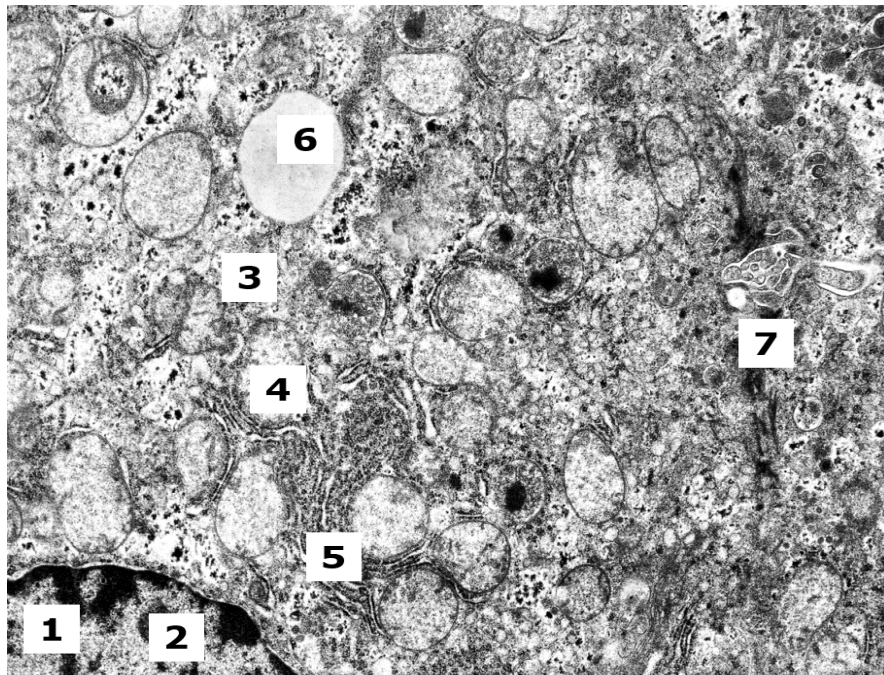


Рис. 5.6. Електронограма печінки зрілого щура: 1 – ядро гепатоцита; 2 – ядерце; 3 – цитоплазма гепатоцита; 4 – мітохондрії; 5 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки; 6 – крапельки жиру; 7 – просвіт жовчного каналця. Збільшення $\times 6400$.

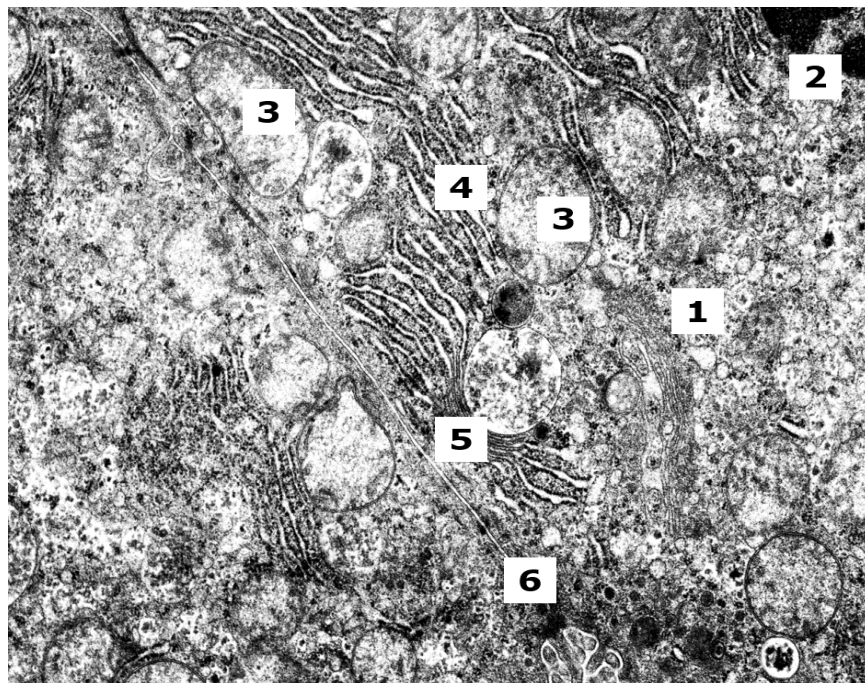


Рис. 5.7. Електронограма печінки зрілого щура: 1 – цитоплазма гепатоцита; 2 – ядро гепатоцита; 3 – мітохондрії; 4 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки; 5 – диктіосоми комплексу Гольджи; 6 – просвіт жовчного каналця. Збільшення $\times 9600$.

мали електронно-світлий матрикс та звичайну кількість крист. Комплекс Гольджі, гранулярна та агранулярна ендоплазматична сітка за структурою були подібні до таких у інтактних молодих щурів. Адлюменальна частина цитоплазми в ендотеліоцитах стінок синусоїдів утворювала чисельні мікроворсинки.

Зірчасті макрофагоцити були локалізовані у просвіті синусоїдів, мали ядра бобоподібної форми, в яких переважав еухроматин. Ядерна оболонка з чіткими контурами. В перинуклеарній ділянці цитоплазми зірчастих макрофагоцитів розташовані диктіосоми комплексу Гольджі, чисельні лізосоми, а також цистерни гранулярної та агранулярної ендоплазматичної сітки, мітохондрії (рис. 5.8, 5.9).

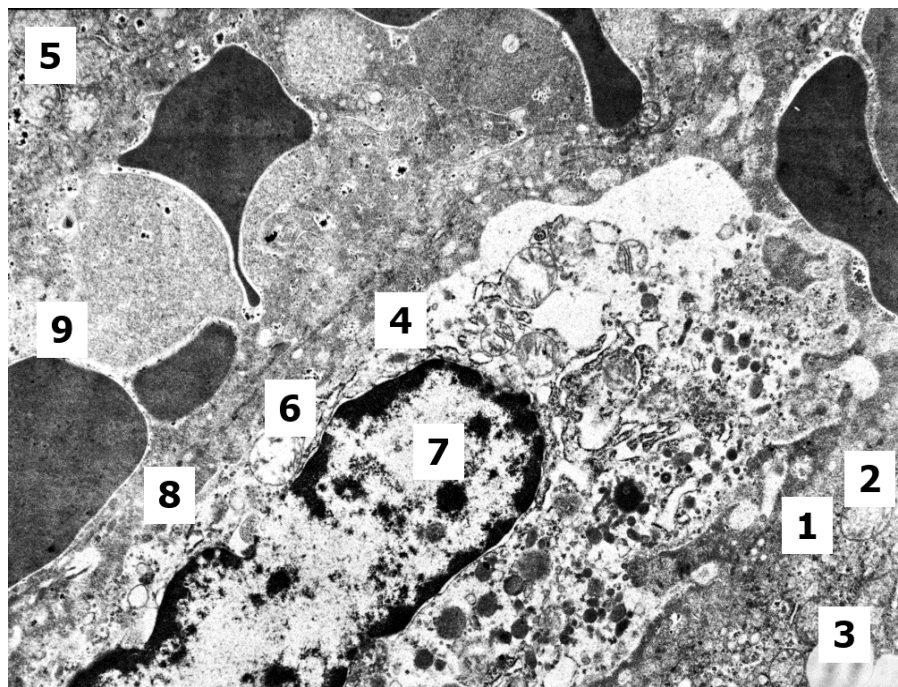


Рис. 5.8. Електроннограма печінки зрілого щура: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – крапельки жиру; 4 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита; 5 – мітохондрії; 6 – лізосоми; 7 – ядро зірчастого макрофагоцита; 8 – цитоплазма ендотеліоцита стінки синусоїда; 9 – просвіт синусоїда. Збільшення $\times 4800$.

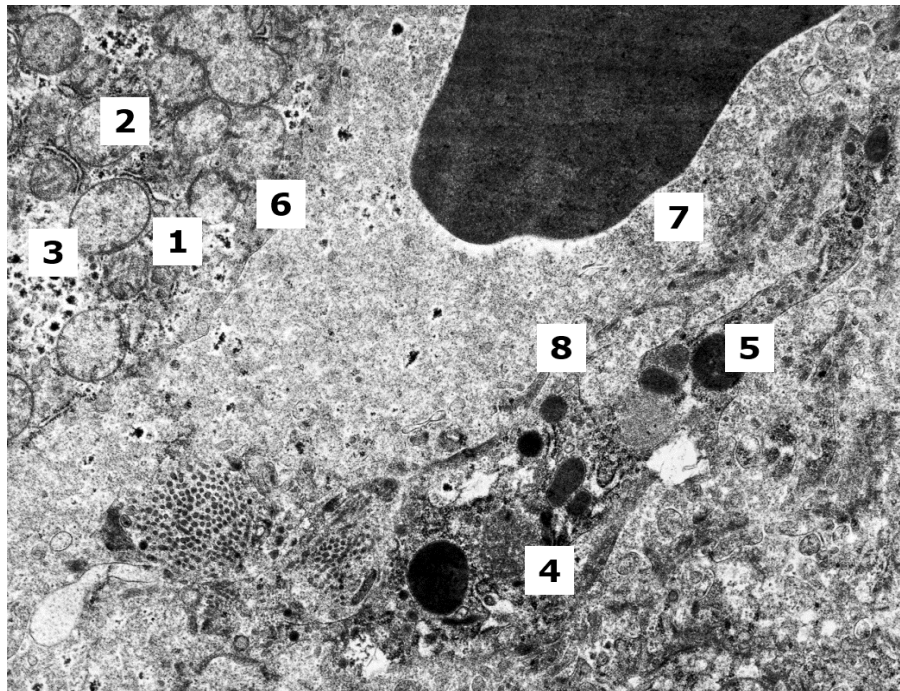


Рис. 5.9. Електронограма печінки зрілого щура: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – гранули глікогену; 4 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита; 5 – лізосоми; 6 – цитоплазма ендотеліоцита стінки синусоїда; 7 – просвіт синусоїда; 8 – колагенові волокна. Збільшення $\times 6400$.

Таким чином, у інтактних щурів зрілого віку дистрофічно та деструктивно змінених органел в цитоплазмі гепатоцитів, ендотеліоцитів в стінках синусоїдів та зірчастих макрофагоцитів не виявляли. Ядерні мембрани чітко контуровані, перинуклеарні простори не розширені. Мітохондрії мали велику кількість крист та дрібнозернистий матрикс. Зовнішні мембрани мітохондрій та їх кристи звичайної будови. На мембранах гранулярної ендоплазматичної сітки є численні рибосоми. Комплекс Гольджі побудований з паралельно розташованих ламел. Цитоплазма гепатоцитів містила полісоми та рибосоми, а також гранули глікогену і крапельки жиру. Плазматична мембрана по структурі подібна до такої у молодих інтактних щурів. Слід відмітити, що у інтактних тварин зрілого віку вміст колагенових волокон був значно вищим, ніж в попередній групі.

5.3. Електронно-мікроскопічна будова печінки інтактних старих щурів

У інтактних старих щурів віком 24-26 місяців виявляли гепатоцити, що містили одне ядро, а також ті, які мали два та більше ядер. Подекуди каріолема останніх утворювала складки. Такі ядра були фестончастої форми, гетерохроматин в них розташований не тільки маргінально, але і на периферії у вигляді грудочок. Ядерця в таких ядрах осміюфільні, добре структуровані та мають ретикулярну структуру (рис. 5.10).

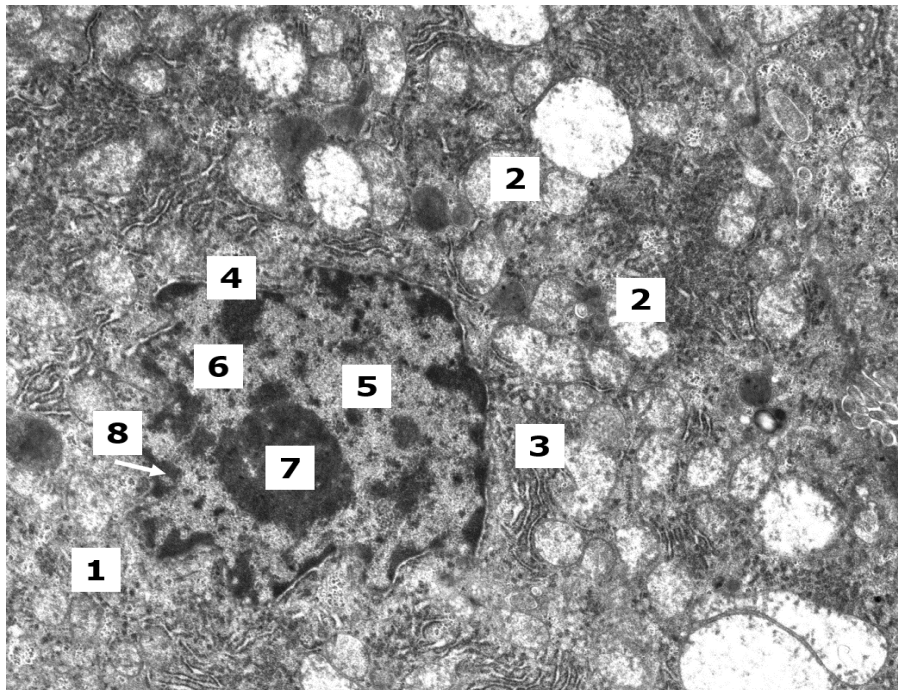


Рис. 5.10. Електроннограма печінки інтактного старого щура: 1 – цитоплазма гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки; 4 – фестончасте ядро гепатоцита; 5 – еухроматин; 6-гетерохроматин; 7 – ядерце; 8 – інвагінації каріолеми. Збільшення $\times 6400$.

Цитоплазма гепатоцитів містила велику кількість мітохондрій округлої форми з чисельними кристами. Добре розвинутими є агранулярна та гранулярна ендоплазматичні сітки, на мембранах останньої розташовані

численні рибосоми. Однак на відміну від молодих та зрілих інтактних щурів у старих тварин матрикс в деяких мітохондріях був просвітленим (рис. 5.11).

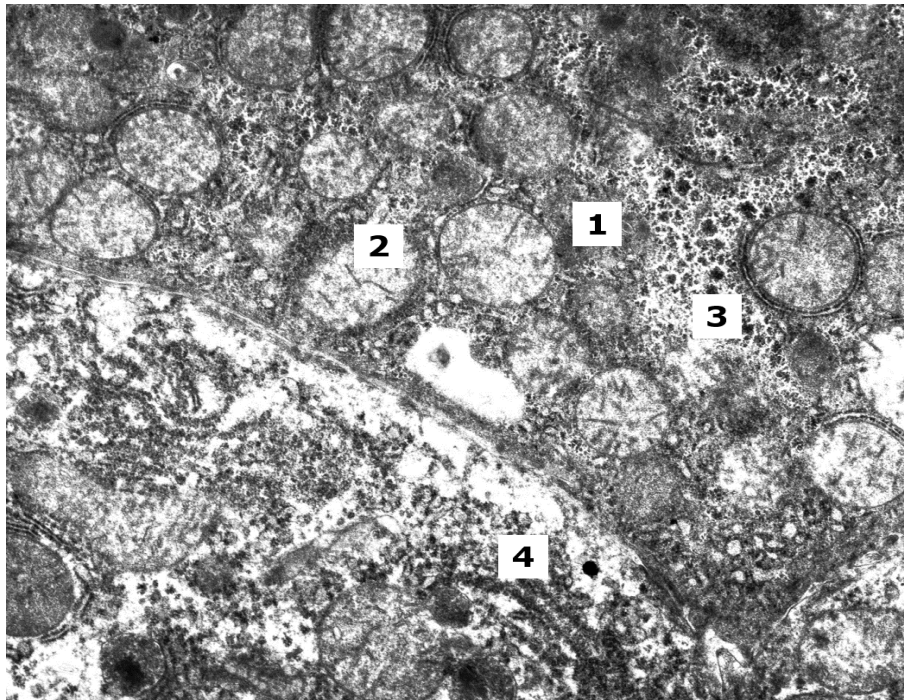


Рис. 5.11. Електронограма печінки старого щура: 1 – цитоплазма гепатоцита; 2 – мітохондрії з просвітленим матриксом; 3 – включення глікогену; 4 – цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки. Збільшення $\times 8000$.

Цитоплазма гепатоцитів містила велику кількість вільних рибосом, полісом та лізосом, а також гранули глікогену і дрібні крапельки жиру. Комплекс Гольджі представлений у вигляді стопок паралельних гладких мембран. В цитоплазмі окремих гепатоцитів виявляли аутофагосоми. Плазматична мембрана гепатоцитів мала типову будову. Між їх біліарними поверхнями розташовані жовчні канальці. Просвіти більшої частини канальців не розширені, в них розташовані чисельні мікроборсинки гепатоцитів. Однак, на відміну від молодих та зрілих інтактних щурів, у старих тварин в поодиноких полях зору виявляли розширені простори жовчних канальців. Ширина пересинусоїдних просторів між васкулярними поверхнями

гепатоцитів і стінками синусоїдних капілярів у старих інтактних щурів становила від 1 до 3 мкм. В них були розташовані відростки зірчастих макрофагоцитів, пересинусоїдних жиронакопичувальних клітин, а також чисельні відростки гепатоцитів та колагенові волокна. У інтактних старих щурів чисельність колагенових волокон в пересинусоїдних просторах переважала таку у молодих та зрілих тварин. Подекуди між гепатоцитами виявляли поодинокі жиронакопичувальні клітини, їх цитоплазма містила рибосоми та поодинокі мітохондрії, а також чисельні мілкі краплини жиру (рис. 5.12).

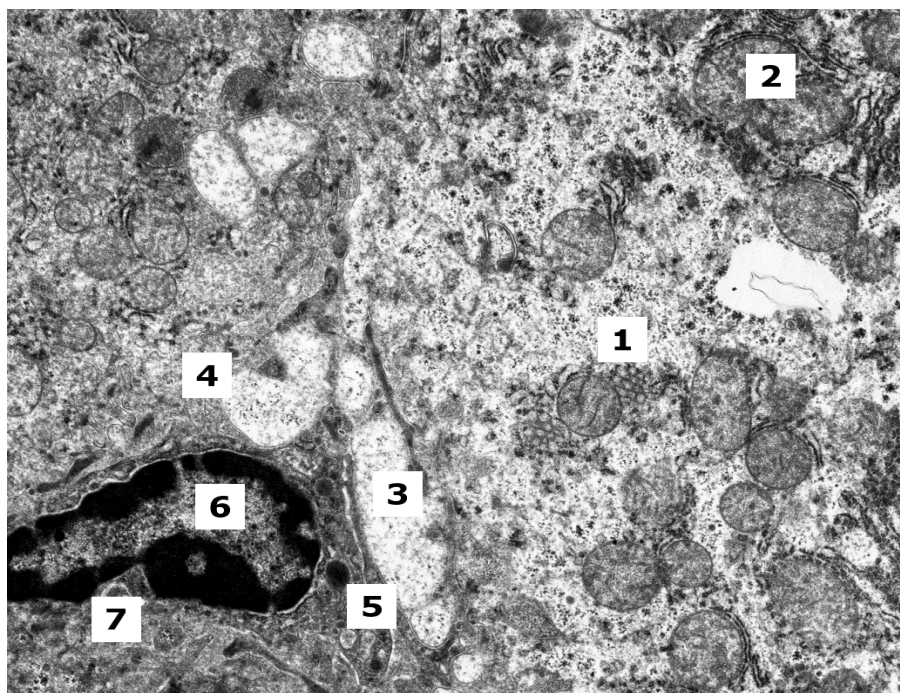


Рис. 5.12. Електроннограма печінки інтактного старого щура: 1 – цитоплазма гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – просвіт жовчного каналця; 4 – просвіт синусоїда; 5 – ендотеліоцит стінки синусоїда; 6 – ядро перисинусоїдної клітини; 7 – цитоплазма перисинусоїдної клітини. Збільшення $\times 6400$.

Ендотеліоцити в стінках синусоїдів мали будову подібну до такої у інтактних молодих та зрілих щурів. Зірчасті макрофагоцити та печінкові клітини - вбивці по структурі не відрізнялись від таких у зрілих інтактних щурів. Однак, в пересинусоїдному просторі чисельність колагенових волокон була більшою в порівнянні з зрілими інтактними щурами (рис. 5.13, 5.14).

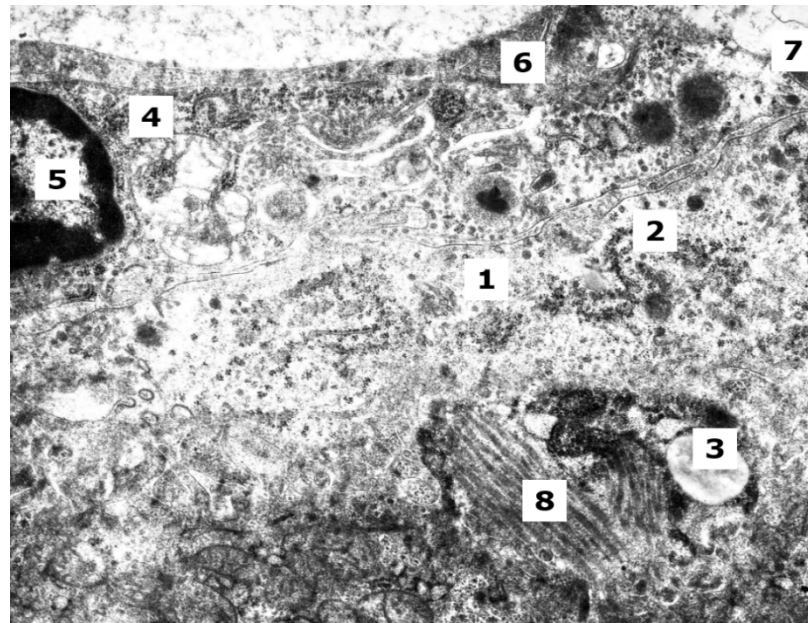


Рис. 5.13. Електронограма печінки інтактного старого щура: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки; 3 – жирові включення; 4 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита; 5 – ядро зірчастого макрофагоцита; 6 – цитоплазма ендотеліоцита стінки синусоїда; 7 – просвіт синусоїда; 8 – колагенові волокна. Збільшення $\times 8000$.

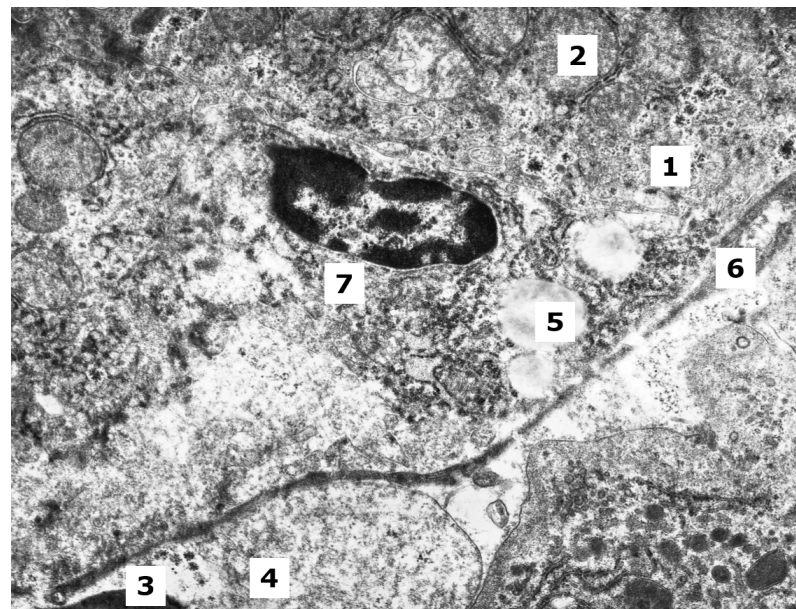


Рис. 5.14. Електронограма печінки старого щура: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – ядро перисинусоїдної клітини; 4 – цитоплазма перисинусоїдної клітини; 5 – краплі жиру; 6 – цитоплазма ендотеліоцита стінки синусоїда; 7 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита. Збільшення $\times 8000$.

Слід відмітити, що у інтактних щурів старого віку дистрофічно та некробіотично змінених органел в цитоплазмі гепатоцитів, ендотеліоцитів в стінках синусоїдів та зірчастих макрофагоцитів не виявляли. Зовнішні та внутрішні мембрани мітохондрій та їх кристи по структурі подібні до таких у інтактних молодих та зрілих щурів. Мітохондрії мали дрібнозернистий матрикс з великою кількістю щільних гранул. На мембранах гранулярної ендоплазматичної сітки розташовані численні рибосоми. Ядерна оболонка чітко оконтурована, перінуклеарні простори не розширені. Диктіосоми комплексу Гольджі мали вигляд паралельно розташованих плоских мішечків та пухирців. Цитоплазма гепатоцитів містила полісоми, рибосоми, а також гранули глікогену та краплі жиру. Однак, в клітинах інтактних старих щурів краплі жиру виявляли частіше, ніж у молодих та зрілих тварин. Плазматична мембрана по структурі подібна до такої у інтактних молодих та зрілих щурів (рис. 5.15).

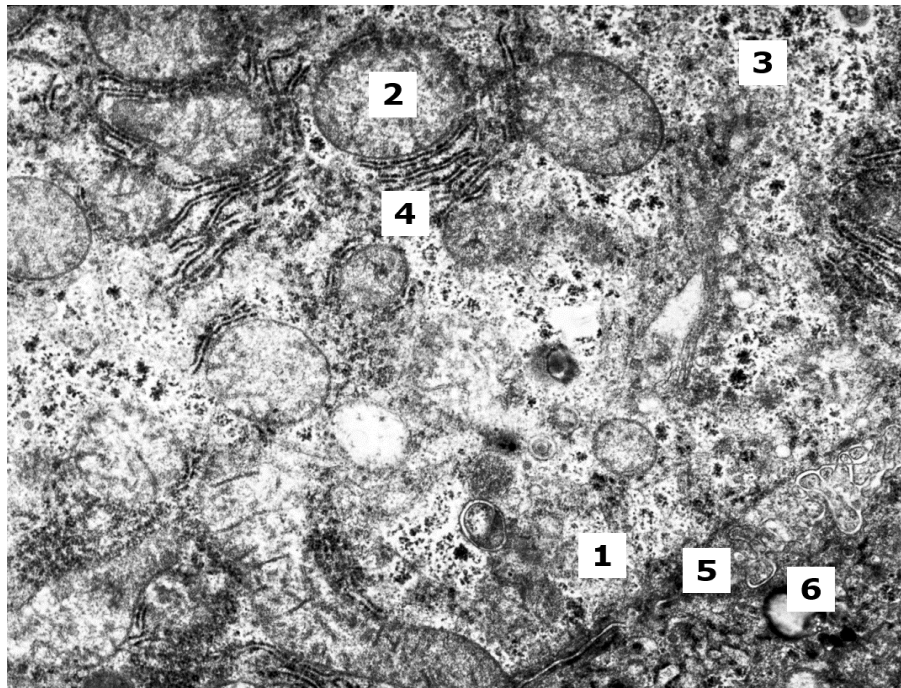


Рис. 5.15. Електронограма печінки старого щура: 1 – біліарна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – гранули глікогену; 4 – цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки; 5 – просвіт жовчного каналця; 6 – крапельки жиру. Збільшення $\times 8000$.

5.4. Електронно-мікроскопічна будова печінки молодих щурів при гіпергомоцистеїнемії

В умовах експериментальної гіпергомоцистеїнемії на субмікроскопічному рівні у молодих щурів визначено помірне ушкодження гепатоцитів у вигляді дистрофічних порушень. Так, їх ядра містили глибоки гетерохроматину не тільки маргінально, але і в центральній частині ядер, однак переважав еухроматин. Ядерна мембрана цілісна, на відміну від інтактних щурів, в ній наявні інвагінації. Перинуклеарні простори не розширені (рис. 5.16).

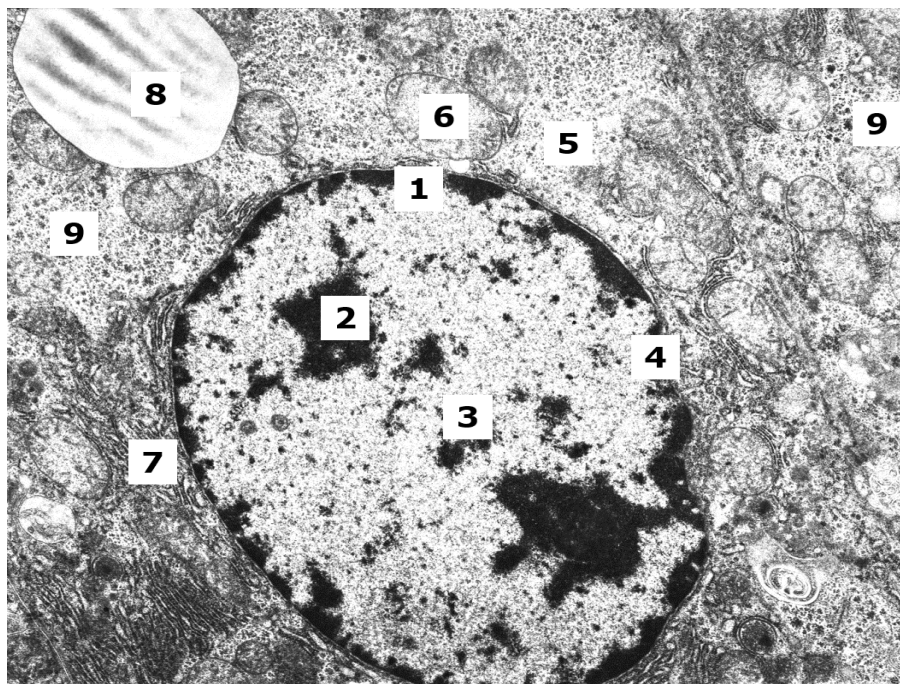


Рис. 5.16. Електроннограма печінки молодого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – ядро гепатоцита; 2 – ядерце; 3 – грудочки гетерохроматину; 4 – інвагінації каріолеми; 5 – цитоплазма гепатоцита; 6 – деструкція крист та набряк матриксу мітохондрії; 7 – цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки; 8 – крапельки жиру; 9 – гранули глікогену. Збільшення $\times 4800$.

В цитоплазмі гепатоцитів молодих щурів при гіпергомоцистеїнемії спостерігається більша чисельність мітохондрій в порівнянні з такою у інтактних молодих тварин. Їх розміри також переважають. Вони містять дрібнозернистий матрикс та численні кристи. Слід відмітити, що подекуди виявляли гепатоцити, в яких мітохондрії утворювали так звані мітохондріальні бруньки, або мали ознаки набряку, дезорганізовані та деструктуровані кристи. Цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки розширені, на мембранах її розташована велика кількість рибосом. В окремих гепатоцитах виявляли гіперплазію мембран ендоплазматичної сітки. Цитоплазма гепатоцитів в даній групі тварин містила численні рибосоми, полісоми та гранули глікогену (рис. 5.17).

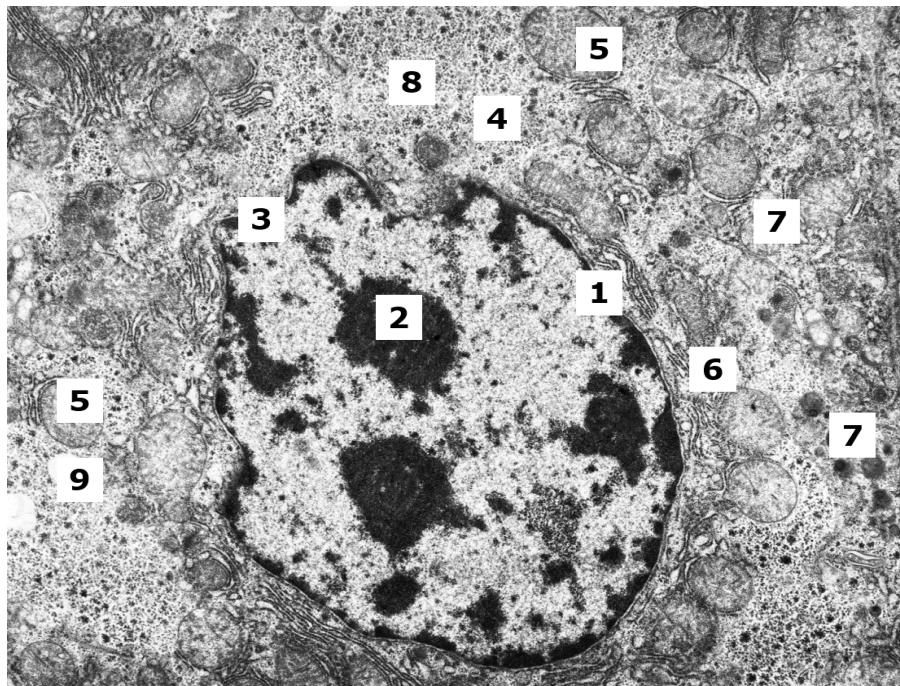


Рис. 5.17. Електроннограма печінки молодого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – ядро гепатоцита; 2 – ядерце; 3 – інвагінації каріолеми; 4 – цитоплазма гепатоцита; 5 – мітохондрії; 6 – цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки; 7 – лізосоми; 8 – включення глікогену; 9 – крапельки жиру. Збільшення $\times 4800$.

Також спостерігали гепатоцити з гіпертрофованим комплексом Гольджі та великим вмістом аутофагосом і крапельок жиру. Просвіти жовчних

канальців розширені, мікрворсинок в них мало. Однак деструкції мікрворсинок гепатоцитів в жовчних капілярах і перисинусоїдних просторах не виявлено (рис. 5.18).

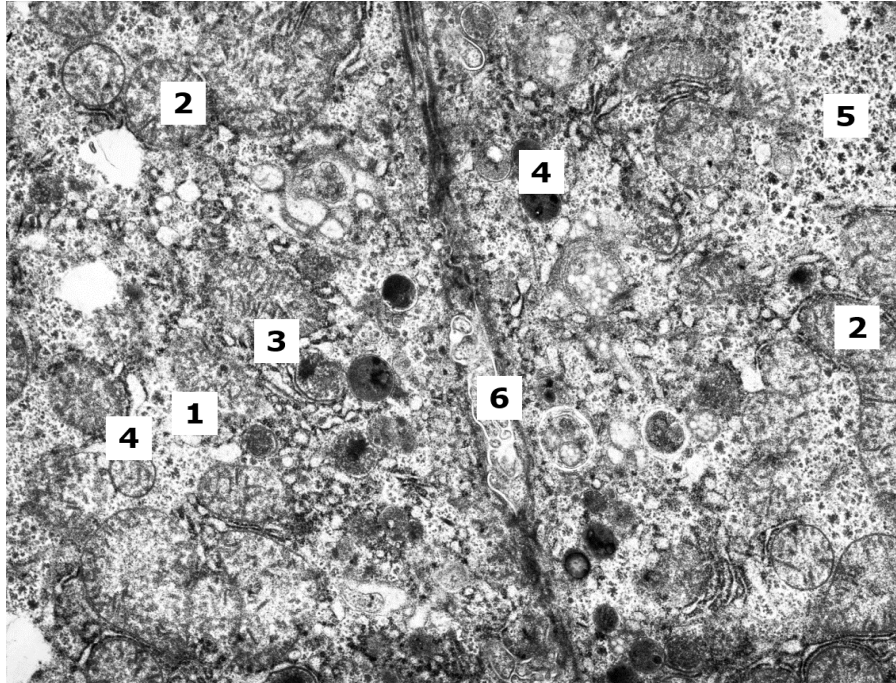


Рис. 5.18. Електронограма печінки молодого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки; 4 – лізосоми; 5 – грудочки глікогену; 6 – просвіт жовчного канальця. Збільшення $\times 6400$.

Ядерна оболонка ендотеліоцитів в стінках синусоїдів була помірно розпушеною, мала різні за глибиною інвагінації. Смужки гетерохроматину, прикріплені до внутрішньої ядерної мембрани, більш виражені, ніж в інтактних молодих щурів. В цитоплазмі ендотеліоцитів виявлені у невеликій кількості набряклі мітохондрії та електронно прозорі цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки. Слід відмітити збільшену кількість крист в мітохондріях, а також рибосом на мембранах гранулярної ендоплазматичної сітки, порівняно з такими у інтактних молодих щурів. Збільшена кількість вільно розташованих в цитоплазмі вторинних лізосом і крапель жиру.

Плазматична мембрана ендотеліоцитів утворювала чисельні вирости в просвіті синусоїдів.

В цитоплазмі зірчастих макрофагоцитів більша частка лізосом, гетерофагосом та аутофагосом, ніж в інтактних молодих щурів, що вказує на підвищену функціональну активність цих клітин (рис. 5.19).

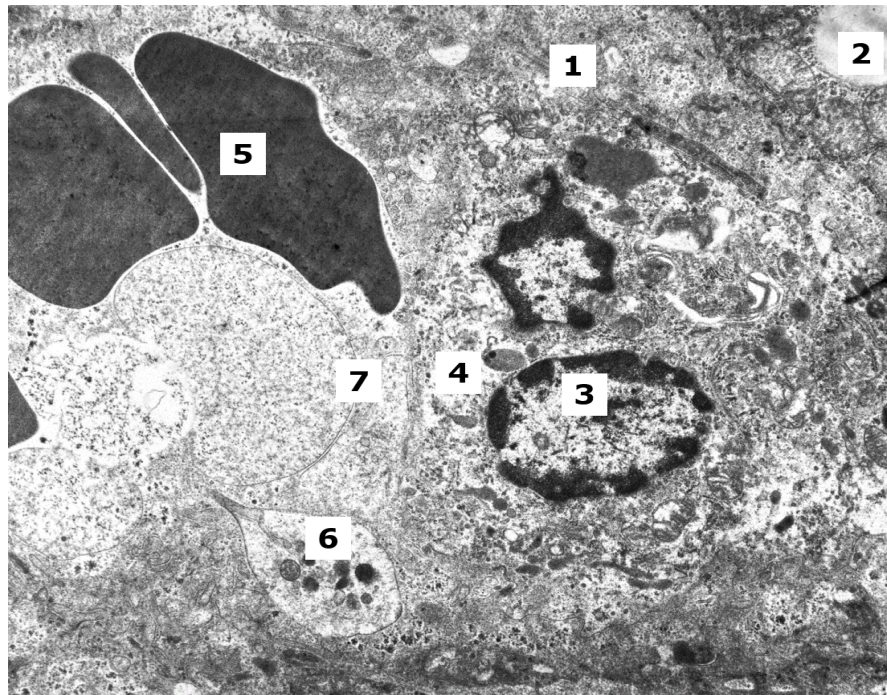


Рис. 5.19. Електронограма печінки молодого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – крапля жиру; 3 – ядро зірчастого макрофагоцита; 4 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита; 5 – складжі еритроцитів в просвіті синусоїда; 6 – тромбоцити в просвіті синусоїда; 7 – набряк цитоплазми ендотеліоцита в стінці синусоїда. Збільшення $\times 4800$.

Таким чином, при експериментальній гіпергомоцистеїнемії ми виявили зміни на субмікроскопічному рівні в усіх структурних компонентах печінки молодих щурів. Так, цитоплазма гепатоцитів була просвітлена, порівняно з такою у молодих тварин групи контролю. Канальці ендоплазматичної сітки та цистерни комплексу Гольджі були розширеними. Мітохондрії розташовані рівномірно, мали сферичну форму, однак в поодиноких випадках матрикс їх

був просвітлений, що є характерною ознакою набряку органел. Кристи подекуди деструктуровані, однак зовнішня мембрана не зруйнована. Включення глікогену виявляли не у всіх гепатоцитах, проте збільшувались кількість та розмір крапель жиру, які розташовані, як правило, на периферії цитоплазми гепатоцитів.

На відміну від інтактних молодих щурів форма ядер варіабельна. Поряд з гепатоцитами, які мають ядра сферичної форми, виявляли клітини з фестончастими ядрами. Хроматин в більшій частині їх ущільнений по краях. Ядерця мали більшу площу в порівнянні з такими у інтактних молодих щурів. Ми також виявляли пікнотично змінені ядра. Просвіти жовчних каналців та перисуносоїдні простори були розширені. В останніх локалізовані зірчасті макрофагоцити, жиронакопичувальні клітини, фібробласти та чисельні відростки гепатоцитів, а також колагенові і еластичні волокна. Ми відмітили проліферацію жиронакопичувальних клітин. Вони набували видовженої форми, кількість жирових крапель в цитоплазмі їх менша в порівнянні з такою у інтактних молодих щурів, нуклеолема містила менше інвагінацій. Об'єм цитоплазми жиронакопичувальних клітин більший, в ній розташовані чисельні цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки з зв'язаними рибосомами, а також вільні рибосоми та мітохондрії. Пластинчатий комплекс Гольджі представлений стопками з 3 – 8 сплосчених цистерн, що вказує на його гіперплазію. Також зростала чисельність первинних та вторинних лізосом.

Цитоплазма ендотеліоцитів в стінках синусоїдів набрякла. Їх люменальна поверхня утворює відростки в просвіт синусоїдів. В ядрах маргінація хроматину. Канальці ендоплазматичної сітки розширені, мітохондрії набрякли. В просвітах синусоїдів розташовані зірчасті макрофагоцити, лейкоцити, сладжі еритроцитів і тромбоцитів, які контактують з ендотеліоцитами (рис. 5.20, 5.21).

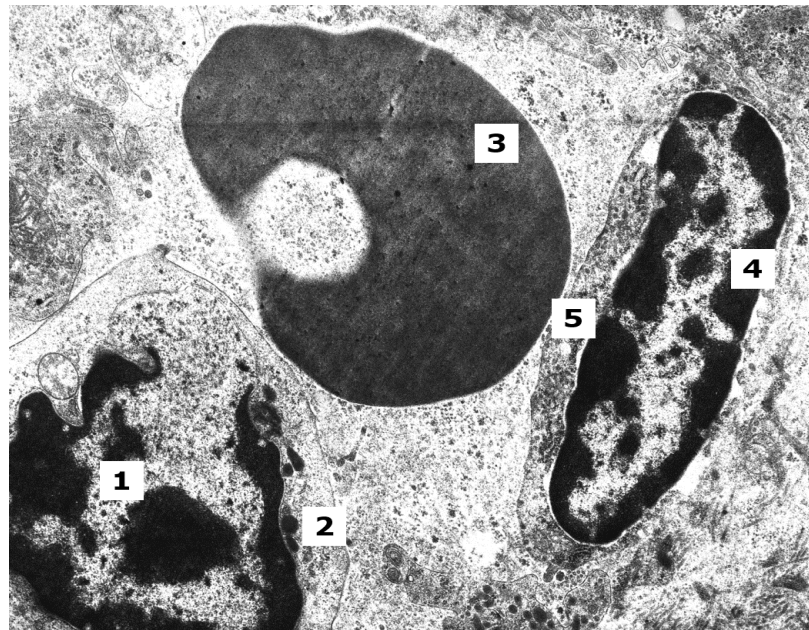


Рис. 5.20. Електронограма печінки молодого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – ядро зірчастого макрофагочита; 2 – цитоплазма зірчастого макрофагочита; 3 – еритроцит в просвіті синусоїда; 4 – маргінація хроматину в ядрі ендотеліюцита; 5 – набряк цитоплазми ендотеліюцита в стінці синусоїда. Збільшення $\times 6400$.

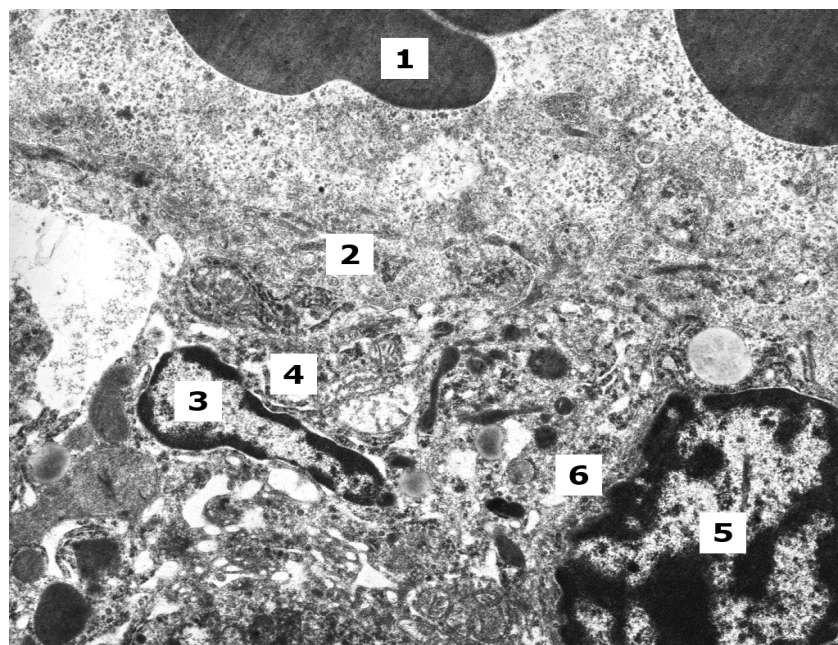


Рис. 5.21. Електронограма печінки молодого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – складжі еритроцитів в просвіті синусоїда; 2 – набряк цитоплазми ендотеліюцита в стінці синусоїда; 3 – ядро перисинусоїдної клітини; 4 – цитоплазма перисинусоїдної клітини; 5 – ядро зірчастого макрофагочита; 6 – цитоплазма зірчастого макрофагочита. Збільшення $\times 6400$.

5.5. Електронно-мікроскопічна будова печінки щурів зрілого віку при гіпергомоцистеїнемії

При експериментальній гіпергомоцистеїнемії в цитоплазмі гепатоцитів щурів зрілого віку каналці ендоплазматичної сітки та цистерни комплексів Гольджі були розширені. Мітохондрії набрякли, кристи в них деструктуровані, матрикс електронно прозорий. Мембрани деяких мітохондрій не суцільні. Зменшений вміст гранул глікогену і збільшена чисельність крапель жиру в цитоплазмі, останні значно більші за розміром, ніж у зрілих інтактних щурів. Плазмолема гепатоцитів не однорідні, подекуди з ознаками набряку. Просвіти жовчних каналців розширені. В цитоплазмі деяких гепатоцитів виявляли аутофагосоми. Ядра мали фестончасту форму. Хроматин в них конденсований, каріоплазма просвітлена, чисельність ядерців більша, ніж у інтактних щурів зрілого віку (рис. 5.22, 5.23).

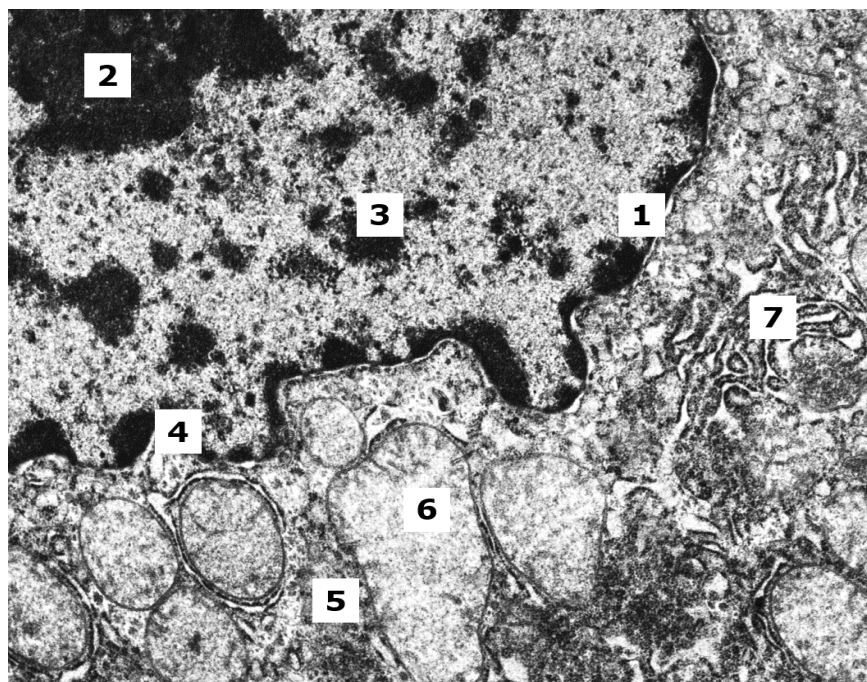


Рис. 5.22. Електроннограма печінки зрілого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – ядро гепатоцита; 2 – ядерце; 3 – конденсований хроматин в центральних ділянках ядер; 4 – інвагінації каріолеми; 5 – цитоплазма гепатоцита; 6 – набряк матриксу та деструкція крист в мітохондрії; 7 – розширені цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки. Збільшення $\times 9600$.

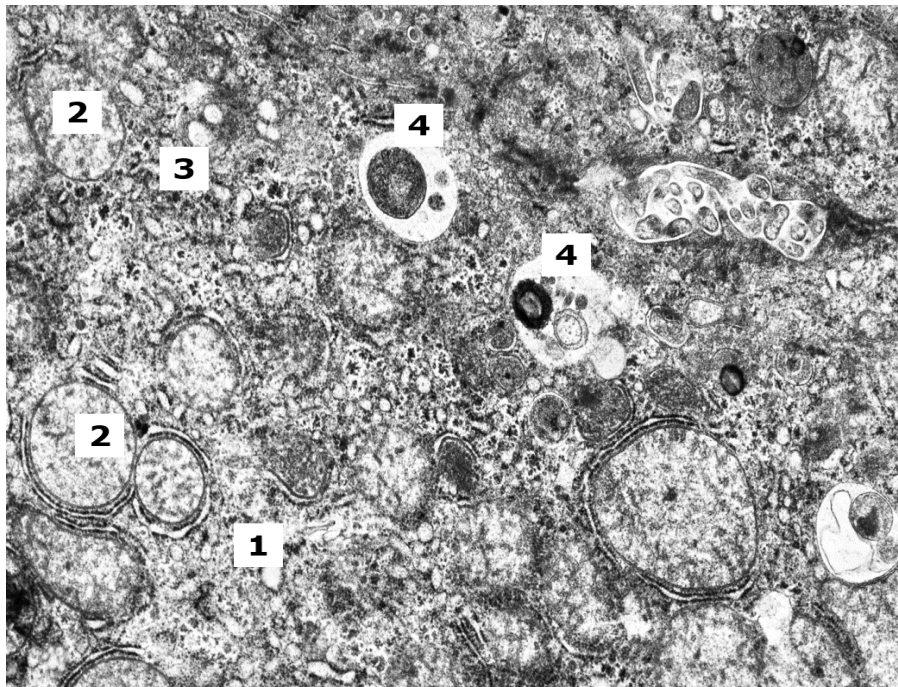


Рис. 5.23. Електронограма печінки зрілого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – цитоплазма гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – гранули глікогену; 4 – аутофагосоми. Збільшення $\times 9600$.

На відміну від молодих, у щурів зрілого віку при гіпергомоцистеїнемії в перисинусоїдних просторах виявляли жиронакопичувальні клітини видовженої форми, значну частку цитоплазми в яких займав комплекс Гольджі і цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, що вказувало на синтез білка на експорт. Чисельність інших органел менша в порівнянні з такою у інтактних зрілих щурів. Виявляли поодинокі вільні рибосоми та полісоми, мітохондрії і лізосоми. Цитоплазма жиронакопичувальних клітин просвітлена, в ній розташовані чисельні вакуолі, залишкові тільця, мітохондрії в них набрякли. В жиронакопичувальних клітинах менше крапель жиру – до 1 – 3, які розташовані на їх протилежних полюсах. Така морфологічна картина маніфестує трансформацію жиронакопичувальних клітин в фібробласти (рис. 5.24).

Пересинусоїдні простори розширені, в них розташовані відростки гепатоцитів, жиронакопичувальні клітини, зірчасті макрофагоцити, а також

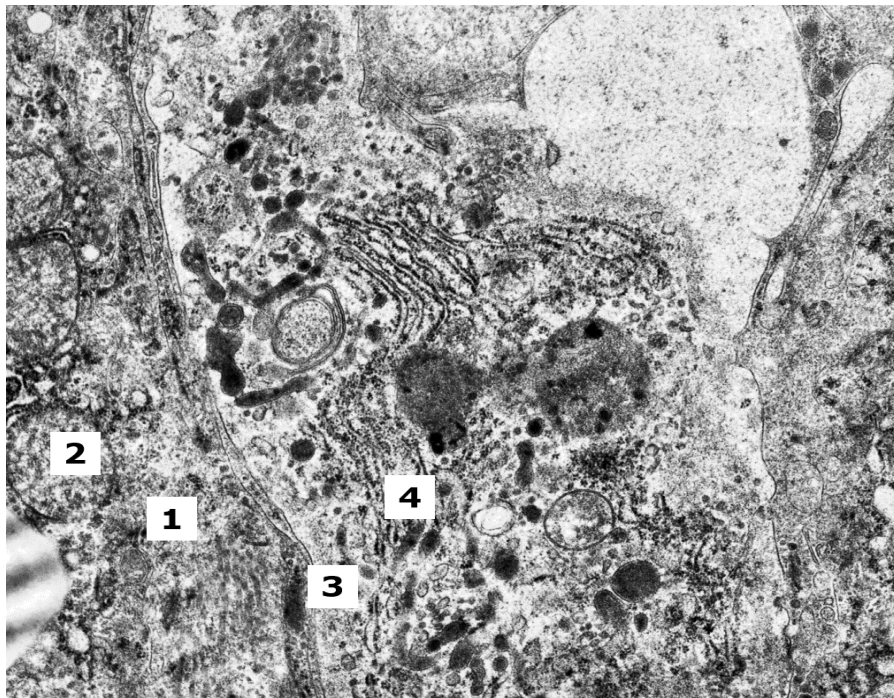


Рис. 5.24. Електронограма печінки зрілого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – цитоплазма ендотеліоцита стінки синусоїда; 4 – цитоплазма жиронакопичувальної кітини. Збільшення $\times 9600$.

фібробласти, колагенові та еластичні волокна. Форма зірчастих макрофагоцитів змінена, їх плазмолема утворювала чисельні відростки на відміну від таких у інтактних зрілих щурів. Ядра зірчастих макрофагоцитів ущільнені, хроматин фрагментований. Виявляли також клітини з просвітленою цитоплазмою і світлими ядрами (рис. 5.25).

Просвіти синусоїдів розширені, містять еритроцити, тромбоцити, лейкоцити. Ендотеліальне вистелення в них не суцільне. Часто виявляли ділянки адгезії тромбоцитів та лейкоцитів до плазмолеми ендотеліоцитів. Останні набрякли, їх ядра виступають в просвіт, а адлюменальна поверхня цитоплазми згладжена. Чисельність відростків в просвітах синусоїдів значно менша, ніж така у молодих щурів при гіпергомоцистеїнемії. Часто товщина ендотеліоцитів в стінках синусоїдів більша, ніж у інтактних щурів. В них мало органел, в цитоплазмі виявляли вакуолі, мітохондрії з ознаками набряку. Ядра

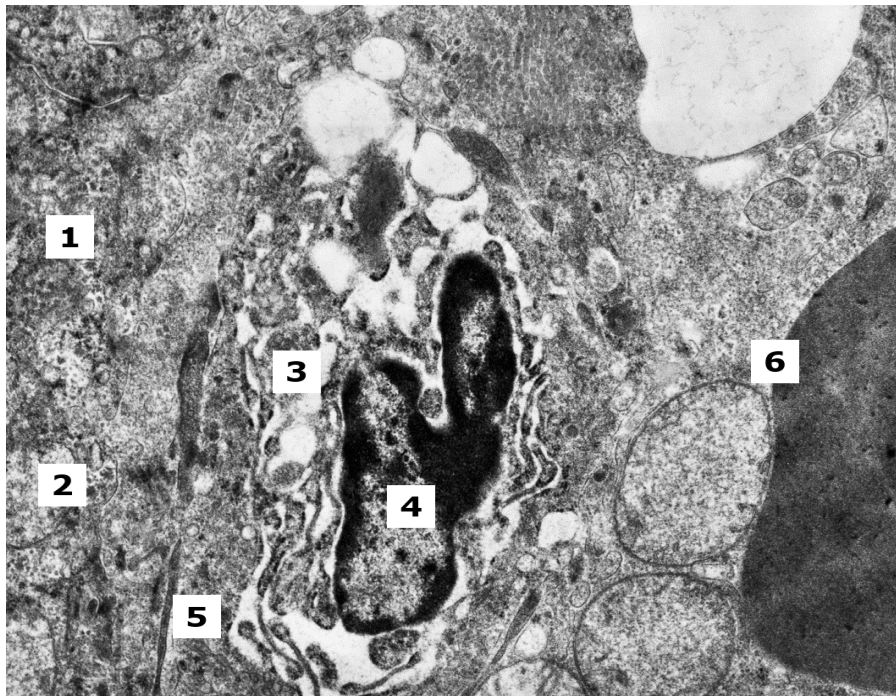


Рис. 5.25. Електронограма печінки зрілого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – васкулярна частина цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита; 4 – ядро зірчастого макрофагоцита; 5 – цитоплазма ендотеліоцита стінки синусоїда; 6 – просвіт синусоїда. Збільшення $\times 6400$.

їх осміюфільні, темні, хроматин маргінований. Навколо ендотеліоцитів спостерігали фрагменти базальної мембрани в ділянках периферійної та контактної зони клітин.

Таким чином, у щурів зрілого віку при експериментальній гіпегомоцистеїнемії ультраструктурні зміни в гепатоцитах, ендотеліоцитах стінок синусоїдів, зірчастих макрофагоцитах мали дистрофічний та деструктивний характер і були виражені більше, ніж у молодих тварин дослідної групи. Той факт, що в мітохондріях менше крист, просвітлений матрикс вказує на декомпенсацію (виснаження) функції органел. Характерною особливістю є трансформація жиронакопичувальних клітин в фібробласти.

5.6. Електронно-мікроскопічна будова печінки старих щурів при гіпергомоцистеїнемії

При експериментальній гіпергомоцистеїнемії в цитоплазмі гепатоцитів старих щурів виявлені дистрофічні зміни з деструкцією внутрішньоклітинних мембранних органел. Ультраструктурна організація гепатоцитів поліморфна. Ядра їх містили глибоки конденсованого хроматину, які локалізовані як на внутрішній мембрані, так і дифузно розподілені по каріоплазмі. Частка еухроматину була значно меншою, ніж така у інтактних старих щурів. Каріоплазма мала знижену електронну щільність. Ядерна оболонка гладка, помірно розпушена, подекуди з вогнищами лізису. Перинуклеарні простори значно розширені. В деяких гепатоцитах ядра були пікнотично змінені, тоді як в інших виявляли каріолізис. Електронна щільність цитоплазми гепатоцитів неоднорідна, наявні темні і світлі клітини. В гепатоцитах каналці ендоплазматичної сітки та цистерни комплексу Гольджі розширені, мітохондрії збільшені в розмірах, матрикс в них просвітлений, що вказує на набряк. Гранулярна ендоплазматична сітка мала цистерни у вигляді електронно прозорих пухирців. Значно менша кількість рибосом, що зв'язані з мембранами ендоплазматичної сітки, а також чисельність вільних рибосом та полісом в порівнянні з такими у інтактних старих щурів. Кристи в мітохондріях деструктуровані, їх значно менше, ніж у старих тварин контрольної групи. В деяких мітохондріях порушена зовнішня мембрана. Включення глікогену в цитоплазмі гепатоцитів виявляли рідко. Краплі жиру мали більші розміри, а їх чисельність значно зростала в порівнянні з такими у інтактних старих щурів. Плазмолема в деяких гепатоцитах не суцільна.

Патологічні зміни в структурі мітохондрій були більше виражені, ніж такі у молодих та зрілих щурів в умовах експериментальної гіпергомоцистеїнемії. Вони набухали, мали великі розміри, містили поодинокі

дезорганізовані кристи. В частині мітохондрій повністю зруйновані кристи та вогнищево зовнішні мембрани. Внутрішні мітохондріальні гранули практично відсутні (рис. 5.26, 5.27, 5.28, 5.29).

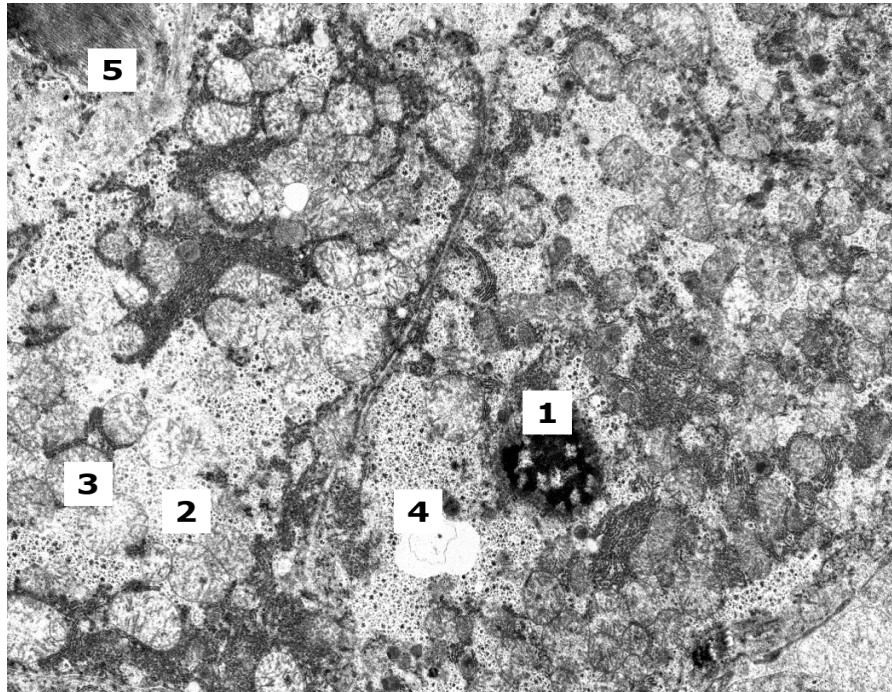


Рис. 5.26. Електронограма печінки старого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – каріопікноз; 2 – набряк цитоплазми гепатоцита; 3 – набряк матриксу мітохондрій; 4 – аутофагосоми; 5 – колагенові волокна в перисинусоїдному просторі. Збільшення $\times 3200$.

В деяких гепатоцитах каналці гранулярної ендоплазматичної сітки фрагментовані. У цитоплазмі їх виявлені лише поодинокі гранули глікогену. Комплекс Гольджі гіпертрофований, складається з дезорганізованих гладких мембран і великих електронно прозорих пухирців неправильної форми. Характерним є суттєві деструктивні зміни мембран ендоплазматичної сітки, а також низька електронна щільність гіалоплазми, що вказує на набряк та зрив процесів компенсації.

Плазматичні мембрани значно розпушені, вогнищево лізовані. Просвіти жовчних каналців розширені практично не містять мікрворсинок. Перисинусоїдні простори розширені, заповнені вкороченими, набряклими мікрворсинками та залишками зруйнованих органел.

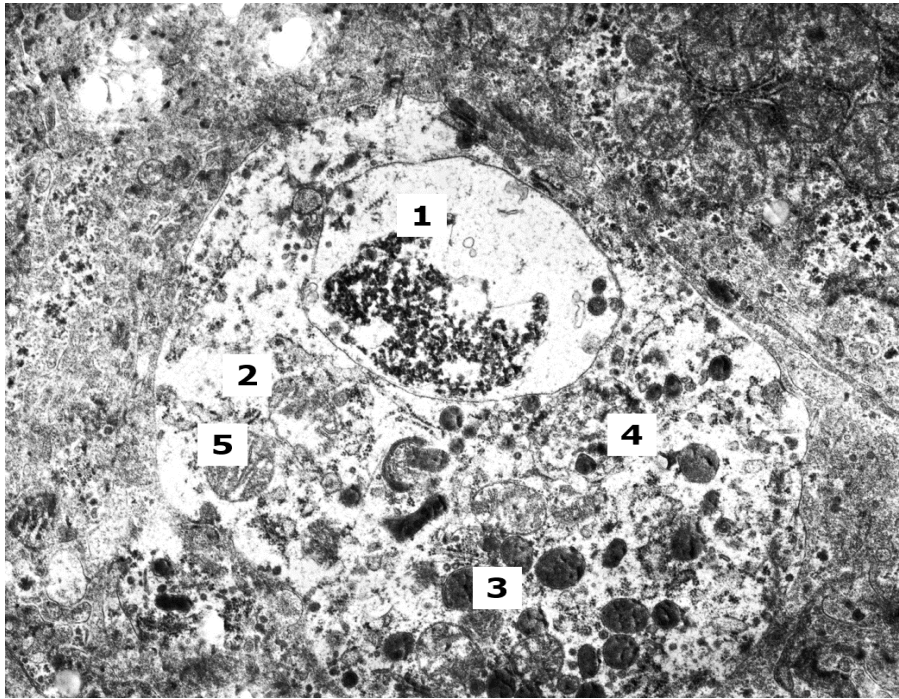


Рис. 5.27. Електронограма печінки старого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – каріолізис; 2 – набряк цитоплазми гепатоцита; 3 – чисельні лізосоми; 4 – аутофагосоми; 5 – мітохондрії із зруйнованими кристами та набряком матриксу. Збільшення $\times 8000$.

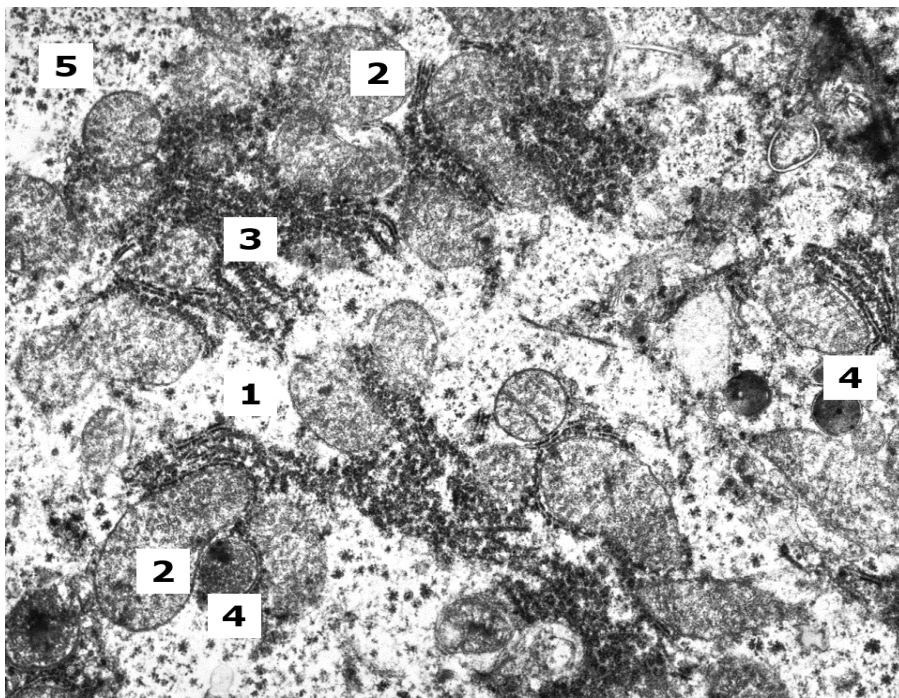


Рис. 5.28. Електронограма печінки старого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – набряк цитоплазми гепатоцита; 2 – набряк матриксу мітохондрій; 3 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки; 4 – аутофагосоми; 5 – грудочки глікогену. Збільшення $\times 8000$.

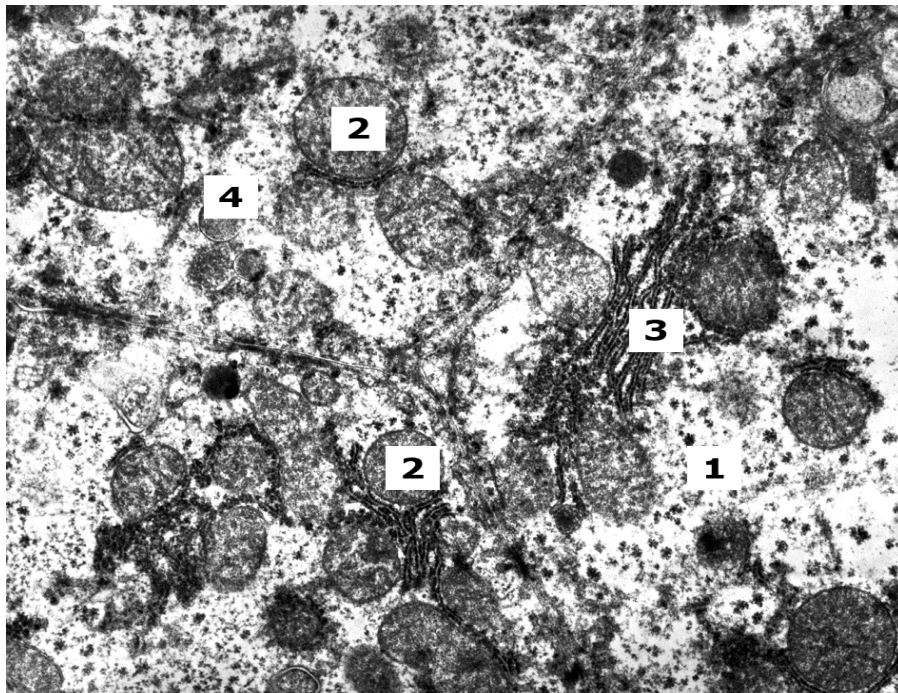


Рис. 5.29. Електронограма печінки старого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – набряк цитоплазми гепатоцита; 2 – мітохондрії; 3 – розширені цистерни ендоплазматичної сітки; 4 – лізосоми. Збільшення $\times 8000$.

Цитоплазма ендотеліоцитів в стінках синусоїдів електронно світла, містила невелику кількість органел, що маніфестує її набряк. Зменшена кількість вільно розташованих в цитоплазмі рибосом і полісом, наявні аутофагосоми. Ядра ендотеліоцитів містили переважно конденсований хроматин, гранули якого розташовані не тільки під нуклеоплазмою, а і в центральних ділянках ядер. Ядерна мембрана значно розпушена, перинуклеарні простори нерівномірно розширені. В цитоплазмі ендотеліоцитів старих щурів при гіпергомоцистеїнемії виявляли мітохондрії з ознаками набряку, які містили поодинокі кристи, в деяких мітохондріях зовнішні мембрани та кристи були зруйновані. Гранулярна ендоплазматична сітка розвинута слабо і представлена окремо розташованими в цитоплазмі вакуолями. Кількість зв'язаних з її мембранами рибосом менша, порівняно з такими у старих інтактних щурів. Комплекс Гольджі редукований. В ендотеліоцитах стінок синусоїдів адлюоменальна плазматична мембрана

вогнищево лізована, розпушена, слабо контурована. В просвітах синусоїдів виявляли детрит, осміюфільні, дегенеративно змінені фрагменти мембран і органел.

Ультраструктура зірчастих макрофагоцитів поліморфна. Деякі з них містили добре розвинені органели, в той час як інші були дистрофічно і деструктивно змінені. В їх цитоплазмі мітохондрії набрякли, мали грубоволокнистий матрикс, кристи та зовнішні мембрани в них лізовані. Мембрани гранулярної ендоплазматичної сітки розпушені і місцями зруйновані. У цитоплазмі зірчастих макрофагоцитів старих щурів при гіпергомоцистеїнемії більша чисельність аутофагосом та гетерофагосом в порівнянні з такою у інтактних старих щурів (рис. 5.30).

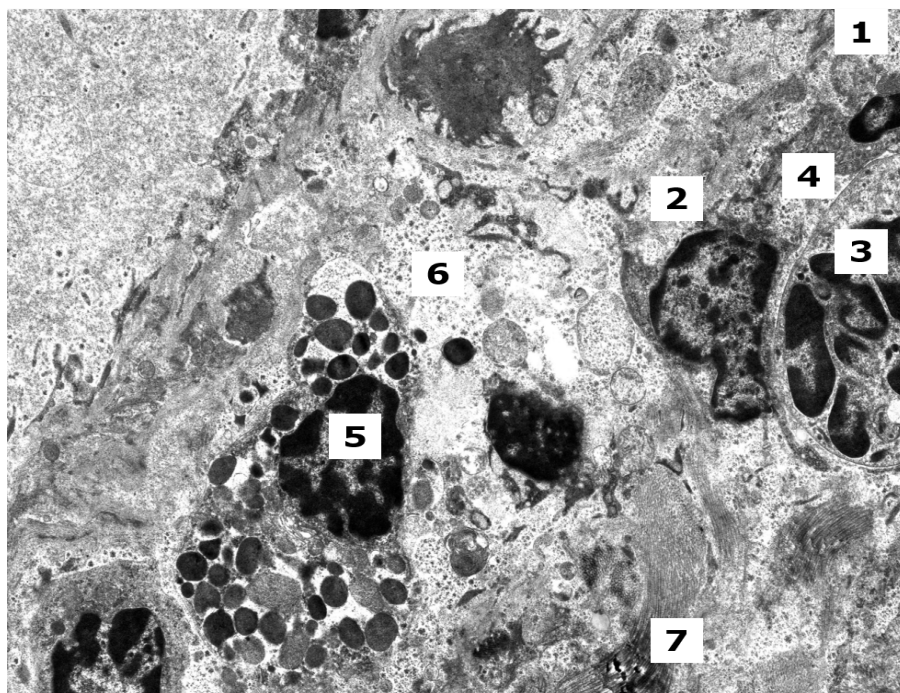


Рис. 5.30. Електроннограма печінки старого щура при гіпергомоцистеїнемії: 1 – просвіт синусоїда; 2 – цитоплазма ендотеліоцита; 3 – ядро зірчастого макрофагоцита; 4 – цитоплазма зірчастого макрофагоцита; 5 – пікнотичне яро гепатоцита; 6 – лізис цитоплазми гепатоцита; 7 – колагенові волокна. Збільшення $\times 3200$.

Пересинусоїдні простори розширені, заповнені колагеновими волокнами, серед яких розташовані фібробласти. В цитоплазмі останніх добре

розвинута гранулярна ендоплазматична сітка та комплекс Гольджі і чисельні мітохондрії з щільно розташованими кристами, що вказувало на підвищену функціональну активність даних клітин.

Таким чином, поряд із змінами в ультраструктурній будові гепатоцитів, подібним до змін зрілих щурів з гіпергомоцистеїнемією, ми відмітили більшу чисельність великих крапель жиру в цитоплазмі гепатоцитів, меншу кількість включень глікогену, зростання мітохондрій з несучільною зовнішньою мембраною, гетерогенність в структурі ядер. Так, частина ядер зі сферичною формою, структурою хроматина і ядерце є подібною до інтактних тварин. Однак більшою є чисельність гіперхромних ядер з конденсованим по краях хроматином. Перинуклеарні простори значно розширені. Наявні гепатоцити з пікнотичними ядрами, які мають химерну форму. Міжклітинні простори гепатоцитів видозмінені і розширені, в них виявляли колагенові фібрили і фібробласти. Пересинусоїдні простори також розширені, заповнені колагеновими волокнами, фібробластами, зірчастими макрофагоцитами. Подекуди зустрічались жиронакопичувальні клітини, в цитоплазмі яких були розташовані гігантські мітохондрії видовженої хробакоподібної форми з чисельними, щільно упакованими кристами.

В просвітах синусоїдів часто наявні складжі еритроцитів, а також чисельні зірчасті макрофагоцити і тромбоцити, які контактували з плазмолемою ендотеліоцитів. Ендотеліоцити в периферійній зоні потовщені. Їх цитоплазма мала неоднакову електронну щільність, виявляли темні і світлі клітини. В цитоплазмі часто наявні вакуолі, каналці ендоплазматичної сітки та комплекси Гольджі, поліморфні мітохондрії. Плазмолемальних везикул в таких клітинах було мало в порівнянні з такими у інтактних старих щурів. Ядра в ендотеліоцитах часто були набряклі, осміофільні. Навколо ендотеліоцитів виявляли фрагменти базальної мембрани.

Поряд зі змінами, які спостерігали у зрілих щурів при гіпергомоцистеїнемії, ми відмітили збільшення кількості деструктурованих мітохондрій в гепатоцитах, зірчастих макрофагоцитів, пікнотичних і лізованих

ядер; збільшення чисельності і розмірів жирових включень, зменшення жиронакопичувальних клітин, вмісту глікогену, розширення міжклітинних просторів гепатоцитів, жовчних каналців, пересинусоїдних просторів, гіпертрофію та гіперплазію фібробластів.

Отже, ультраструктурний аналіз показав, що при експериментальній гіпергомоцистеїнемії в печінці старих щурів відбуваються зміни в усіх структурних компонентах. В ендотелії судин спостерігаються альтеративні зміни, які проявляються деструкцією мітохондрій. Мітохондрії у стані набряку, їх матрикс просвітлений, гранули відсутні, зменшена кількість крист, вони короткі. Поряд з деструктованими, виявляли гіпертрофовані органели. Однак кількість морфологічно змінених мітохондрій в ендотеліоцитах більша, що вказує на зрив адаптаційних механізмів. Порушення структури ендотеліоцитів призводило до посилення адгезії тромбоцитів, еритроцитів і лейкоцитів. Виникали складжі еритроцитів в просвітах синусоїдів. Зростала також чисельність зірчастих макрофагоцитів і посилювалась їх міграція в пересинусоїдні простори. Менша кількість жиронакопичувальних клітин вказувала на їх трансформацію в фібробласти, що призводило до розростання колагенових волокон, розширення пересинусоїдних просторів та потовщення бар'єру між кров'ю і гепатоцитами, порушення транспорту речовин, гіпоксії, та створювало умови для розвитку гідропічної і жирової дистрофії гепатоцитів.

Результати досліджень даного розділу дисертації відображені нами у статті в фаховому науковому журналі України [112], двох статтях у закордонному фаховому виданні (Польща) [114, 115] та тезах науково-практичної конференції [11].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На даний час підтверджена наявність тісного взаємозв'язку між рівнем гомоцистеїну плазми крові, який індукує розвиток фіброзу тканини печінки, та патологією даного органу. На тлі гіпергомоцистеїнемії виникає накопичення колагену в тканині печінки внаслідок стимуляції експресії тканинного інгібітора металопротеїнази-1 (TIMP-1) та, як результат, акумуляція проколагену I в гепатоцитах [147].

Наразі активно досліджується роль гіпергомоцистеїнемії в розвитку стеатозу печінки. Окрім відомих шляхів накопичення ліпідів в органі, шляхом експериментів на щурах, показано, що до регуляції ліпогенезу залучений цілий комплекс нуклеарних факторів транскрипції та ензимів. Так, активність фактора транскрипції SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein1) значно зростала при гіпергомоцистеїнемії. Експресія залежних від зазначеного фактору генів, що кодують ферменти, відповідальні за синтез тригліцеридів та холестеролу в печінці, а саме ACC1 α (acetyl-CoA carboxylase1), HMG-CoAr (β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA reductase) підвищувалась в гепатоцитах піддослідних тварин після введення їм гомоцистеїну. Одним із можливих шляхів розвитку жирового гепатозу за даних умов є стрес гладкої ендоплазматичної сітки, оскільки дана органела є місцем утворення стеринів та ліпідів в клітині. При гіпергомоцистеїнемії в ендоплазматичній сітці значно пригнічуються процеси синтезу білків та пострасляційної їх модифікації внаслідок інгібування шаперонної активності та посилюється експресія генів, що регулюють ліпогенез [68].

D, L-Гц тіолактон при введенні його щурам сприяє розвитку окисного стресу в гепатоцитах та зниження резервів антиоксидантного захисту. Відзначалось пригнічення активності каталази в тканині печінки лабораторних тварин. В результаті цього спостерігали значне зростання рівня H₂O₂. Гіпергомоцистеїнемія асоціювалась також з посиленням в органі

процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та накопиченням такого продукту пероксидації, як тіобарбітурової кислоти. ПОЛ супроводжувалось безпосереднім ураженням клітин печінки, їх апоптозом, запуском запальних процесів [190].

Проведені нами гістологічні дослідження печінки молодих щурів за умов гіпергомоцистеїнемії виявили порушення кровопостачання, деструктивні зміни та розростання сполучної тканини в органі. Зареєстровано помірні зміни балкової організації, зниження мітотичної активності гепатоцитів, розвиток в них жирової та вакуольно-гідропічної дистрофії. Гістохімічні дослідження печінки тварин дослідної групи встановили зниження активності в гепатоцитах ферменту сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену.

Суміжні дослідження, проведені на експериментальних тваринах, що супроводжувались моделюванням хронічної гіпергомоцистеїнемії, показали негативний вплив даної амінокислоти на структурно-функціональні показники різних систем організму.

Встановлено, що у дорослих щурів при стійкій гіпергомоцистеїнемії змін зазнавали органи дихальної системи у вигляді розвитку дисциркуляторних розладів, ремоделювання стінок бронхіол та запальних процесів. Просвіти бронхів були звуженими, спазмованими, заповнені серозно-слизовим вмістом. Подекуди виявляли десквамацію епітеліального вистилення в їх просвіт. Стінки бронхів були набряклими, інфільтровані гістіоцитарними клітинами, нейтрофілами, лімфоцитами. Характерною знахідкою були зони дисателектазів та ателектазів в респіраторному відділі. Також виявляли зони емфізематозно-змінених ділянок легеневої тканини. Гіпергомоцистеїнемія за даних умов асоціювалась зі зростанням активності фібробластів та потовщенням стінок альвеол, що призводило до порушення нормального газообміну. Даний процес ускладнювався ураженням стінок судин, а, отже, компонентів аеро-гематичного бар'єру [187].

За даними нашого дослідження у дорослих щурів моделювання стану гіпергомоцистеїнемії призводило до збільшення об'єму елементів сполучної тканини навколо часточок та в портальних трактах печінки. Характерними були дисконплектація печінкових пластинок, зміни ядерного апарату гепатоцитів, розвиток їх гідропічної та жирової дистрофії, ділянки некрозів тканини органу, зміни структури судин, порушення процесів мікроциркуляції.

Гістохімічні дослідження за даних умов, як і у тварин молодого віку, встановили зниження активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій та вмісту глікогену в цитоплазмі гепатоцитів.

Отримані нами дані підтверджуються і іншими дослідниками. Так, при моделюванні на лабораторних щурах неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП) та гіпергомоцистеїнемії, виявлено цілий ряд морфологічних перебудов тканини органу. При зазначеному стані в щурів спостерігали наявність жирової та гідропічної дистрофії клітин печінки. Окремі гепатоцити перебували в стані некротичних змін. Відмічали гістіолімфоцитарну інфільтрацію тканини органу переважно по ходу синусоїдів. Характерним було розширення портальних трактів. Компоненти сполучної тканини останніх інфільтровані макрофагами, лімфоцитами, плазмоцитами. Змін зазнавали також синусоїдні гемокапіляри. Просвіти їх були розширеними, повнокрівними, містили значну кількість лімфоцитів. Автори зазначають, що у тварин з НАЖХП без гіпергомоцистеїнемії гістоструктура органу зазнавала менш виражених перебудов, в той час, як зростання рівнів гомоцистеїна плазми крові асоціювалось з поглибленням патоморфологічних змін печінки [164].

За умов експериментальної гіпергомоцистеїнемії в печінці щурів характерними є вакуольна та жирова дистрофія гепатоцитів. При гістологічному дослідженні тканини органу ними виявлено також інфільтрацію гістіоцитами портальних трактів та центральних вен. Визначальною знахідкою науковців були аутофагосоми, що зустрічались в

значній кількості в цитоплазмі клітин печінки. Всередині вони містили деградовані органели, зокрема, мітохондрії, ендоплазматичну сітку, лізосоми були оточені подвійною мембраною. Внаслідок аутофагії та гибелі значної кількості гепатоцитів реєстрували зростання в плазмі крові дослідних тварин активності АЛТ та АСТ [210].

В наукових джерелах наявні дослідження щодо особливостей впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот у печінці щурів з порушеннями функції щитовидної залози. Дані їх показали, що за умов тривалої експозиції тіолактону гомоцистеїну в піддослідних тварин виявляли пригнічення активності ферментів обміну даної речовини у печінці, а саме ВНМТ, S-аденозилгомоцистеїнгідролази (SAHase), а також ферментів деградації цистеїну – цистеїндіоксигенази (CDO), γ -глутамілцистеїнлігази (GCL), що призводило до вираженого зростання гомоцистеїну в плазмі крові. При моделюванні у щурів гіпертиреозу підвищувалась активність ензимів реметилування, десульфування гомоцистеїну, а, отже, зниження його концентрації. Протилежні зміни фіксували при експериментальному гіпотиреозі. Підвищення вмісту гомоцистеїну супроводжувалось зменшенням рівнів H_2S , що, ймовірно, може бути фактором ризику розвитку супутніх патологій, таких як атеросклероз, ОС, ендотеліальної дисфункції, порушення процесів коагуляції [163].

На сьогоднішній день доведено, що гіпергомоцистеїнемія асоціюється зі зниженням в печінці H_2S та інсуліноподібного фактор росту-1 (IGF-1). Останній на 75 % синтезується в гепатоцитах, а високі рівні гомоцистеїну в плазмі крові зумовлюють пригнічення його продукції. Дослідниками встановлено взаємозв'язок між зниженням рівня IGF-1 та індукцією розвитку жирового гепатозу і гіпергомоцистеїнемії. За нормальних умов IGF-1 підвищує активність MS в клітинах печінки, що бере участь в ресинтезі метіоніну з гомоцистеїну, а зниження даного ростового фактору зумовлює зростання вмісту даної речовини. На фоні гіпергомоцистеїнемії та зменшення H_2S розвивається оксидативний стрес, оскільки H_2S за нормальних умов

взаємодіє з АФК, реакційно здатними продуктами ліпідної пероксидації, тіоловими групами, утилізуючи їх. Також доведена його роль в попередженні розвитку фіброзу внаслідок зниження вмісту колагену, гідроксипроліну, тому при порушенні синтезу H_2S в печінці при гіпергомоцистеїнемії виникають передумови фіброзних змін органу [165].

У старих щурів моделювання нами стану гіпергомоцистеїнемії призводило до розвитку фіброзу печінки, жирової дистрофії гепатоцитів, їх некрозу. Характерними були зміни ядерного апарату клітин органу у вигляді пікнозу. Виявлено потовщення стінок кровоносних судин печінки, ураження їх ендотеліального вистилення, формування в просвітах тромбів, скупчення лейкоцитів, нейтрофілів, макрофагів та еритроцитів. Гістохімічні дослідження за даних умов встановили значне зниження активності сукцинатдегідрогенази мітохондрій та низький вміст глікогену в цитоплазмі гепатоцитів.

Отримані в ході нашого дослідження результати електронно-мікроскопічного вивчення структури печінки за умов гіпергомоцистеїнемії узгоджуються з іншими наявними науковими даними. Встановлено, що гіпергомоцистеїнемія спричиняє посилення біосинтетичних процесів в гепатоцитах та характеризується розвитком в них дистрофічних змін. Останні охоплюють в більшості випадків ядерний апарат і мітохондрії. Гіпергомоцистеїнемія також зумовлює появу так званих мітохондріальних сфероїдів та концентричної орієнтації цистерн гранулярної ендоплазматичної сітки. Крім того, спостерігається пошкодження мікроциркуляторного русла печінки та розвиток фіброгенезу [43].

Висока концентрація гомоцистеїну в плазмі крові асоціюється з гістіолейкоцитарною інфільтрацією портальних зон, гіперплазією зірчастих клітин, некрозом гепатоцитів, фіброзом в портальних зонах та навколо центральних вен [40].

Гіпергомоцистеїнемія призводить до посилення енергетичного обміну в мітохондріях гепатоцитів, що проявляється посиленням активності

лактатдегідрогенази, сукцинатдегідрогенази та H^+ – АТФази. Характерним для даного стану є порушення депонування кальцію, посилення карбонілування білків мітохондрій, значне зниження резервно-адаптаційного потенціалу та підвищення активності супероксиддисмутази [28].

Вивчаючи структуру серця лабораторних тварин за умов гіпергомоцистеїнемії на субмікроскопічному рівні, дослідники виявили ураження органу у вигляді його дистрофічних та деструктивних змін. В патологічний процес залучались ендокард та міокард. Перший характеризувався потовщенням колагенових волокон та значним набряком компонентів основної речовини. В міокарді виражених змін зазнавали кардіоміоцити. Вони втрачали міофібрили, саркомери були дезорганізованими. Мітохондрії клітин набрякали, матрикс їх був просвітлений, кристи з проявами деструкції. Значно розширювались каналці гладенької ендоплазматичної сітки. Компоненти сполучної тканини також активно збільшували свій об'єм в міокарді, зокрема, фіксували потовщення колагенових волокон. Спостерігали порушення структурної організації судин мікроциркуляторного русла міокарда [130].

Ультрамiкроскопiчні дослідження тканини печінки за умов гіпергомоцистеїнемії на тлі гіпо- та гіпертиреозу продемонстрували наявність значних порушень мікроциркуляції і транскапілярного обміну в органі. Гепатоцити при цьому характеризувались пошкодженням структури ядер і цитоплазми. Аналогічні перебудови спостерігали і в ендотеліоцитах судинних стінок кровоносних судин печінки. Автори зазначають, що в органі розвивались компенсаторно-приспосувальні, деструктивні і некротичні зміни. Компоненти ядер та органели гепатоцитів зазнавали незворотних перебудов, що в кінцевому рахунку зумовлювало порушення синтетичної та дезінтоксикаційної функцій печінки [141].

При експериментальній гіпергомоцистеїнемії ми виявили зміни на ультраструктурному рівні в усіх структурних компонентах печінки молодих щурів. Гепатоцити проявляли ознаки помірних дистрофічних змін. Ядра

характеризувались наявністю ущільненого хроматину, а нуклеолема мала численні інвагінації. Подекуди виявлялись ознаки пікнозу. Мітохондрії клітин печінки містять численні кристи з ознаками деструкції, матрикс їх просвітлений. Характерним є розширення каналців гранулярної ендоплазматичної сітки та цистерн комплексу Гольджі. Виявлено накопичення жиру та глікогену в гепатоцитах. Просвіти жовчних каналців та перисинусоїдні простори були розширеними. Останні містили зірчасті макрофаги, жиронакопичувальні клітини, фібробласти, колагенові та еластичні волокна. Отримані нами дані електронно-мікроскопічного дослідження структури печінки мають компенсаторно-адаптаційний характер та є зворотніми.

За даними окремих авторів встановлено, що гіпергомоцистеїнемія призводить до пригнічення мітотичної активності гепатоцитів внаслідок зниження індукції цикліну D1 і підвищення експресії p53 та p21Cip1. При електронно-мікроскопічному дослідженні спостерігали зміни у вигляді звуження просвіту Діссе, вкорочення і редукції мікроворсинок зі сторони васкулярної частини гепатоцитів, набухання і дезорганізації відростків ендотеліоцитів. Характерним було зростання фагоцитарної активності клітин Купфера, що містили численні електронно-щільні поліморфні мілкі гранули і лізосоми. Крім того, наявна помірна активація фіброгенезу, що проявляється формуванням пучків колагенових волокон в перисинусоїдному просторі, а також присутністю клітин Іто зі зменшеним числом ліпідних включень витягнутої форми. Останнє вказує на їх трансформацію в міофібробластоподібні клітини [40].

Гомоцистеїн активує процеси аутофігії та посилює ураження тканини печінки шляхом пригнічення експресії трансмембранного регулятора кістозного фіброзу (CFTR). За нормальних умов останній інгібує формування аутофагосом та асоційованих з ними протеїнів – BECN1, LC3-II/I та Atg12. Експресія CFTR регулюється взаємодією ДНК метилтрансферази та гістонлізин N-метилтрансферази, що кодується геном EZH2. Зазначені ферменти

забезпечують процеси метилування ДНК та гістонів, однак за умов ГГЦ порушується їх взаємодія, а, отже, запускається механізм гибелі гепатоцитів шляхом аутофагії [186].

При введенні щурам гомоцистеїну в дозі 100 мг/кг спостерігається повнокрів'я міжчасточкових і центральних вен у портальних зонах, а також синусоїдних капілярів. Процес супроводжується помірною лейкоцитарною інфільтрацією портальних трактів, а в центральних зонах класичної печінкової часточки виявлено некрози гепатоцитів. У 23 % печінкових клітин наявні ознаки мікрокрапельної жирової дистрофії. Біохімічним підґрунтям стеатогенної дії гіпергомоцистеїнемії на думку авторів є гіпометилування та активація оксидативного стресу. Останній проявлявся у вигляді підвищення активності NADPH-оксидази, супероксиддисмутази та карбонільних груп білків в гомогенатах печінки [32].

Встановлено взаємозв'язок між неалкогольною жировою хворобою печінки та змінами в метаболізмі метіоніну, що проявляється зниженням вмісту останнього в гепатоцитах при одночасному зростанні рівня гомоцистеїну внаслідок порушення реметилування. Процес реметилування протікає за умов нормальної активності метіонінсинтази та бетаїн-гомоцистеїн метилтрансферази. Експресія зазначених ферментів при гіпергомоцистеїнемії не змінюється, однак зменшується вміст серину, що погіршує перенесення метильних груп з метилтетрагідрофолату. На світлооптичному рівні це проявляється у вигляді панацінарного макро- і мікроевезикулярного стеатозу, запальних змін та фіброзу тканини печінки [139, 167].

Дефіцит фолієвої кислоти в гепатоцитах призводить до порушення регуляції метаболізму гомоцистеїну, підвищення рівня якого супроводжується зниженням концентрації S-аденозилметіоніну (SAM). Останнє змінює клітинний метаболізм ліпідів, активує фактори транскрипції в печінці та посилює синтез холестерину. Вплив гіпергомоцистеїнемії обумовлений також активацією окисного стресу, порушенням синтезу NO,

зміною гомеостазу і активацією медіаторів запалення. Високі концентрації гомоцистеїну стимулюють продукцію колагену в стінці судин, мають вазоконстрикторну дію. Гіпергомоцистеїнемія активує TNF- α , цитокіни IL-6, IL-8, підвищує внутрішньоклітинний рівень супероксиданіону. Зазначені фактори в кінцевому рахунку запускають процес апоптозу гепатоцитів. Крім того, даний процес супроводжується дисфункцією мітохондрій і, як результат, порушенням β -окислення жирних кислот, посиленням продукції вільних радикалів та некрозом [25].

В ході нашого дослідження встановлено, що у щурів зрілого віку при експериментальній гіпергомоцистеїнемії ультраструктурні зміни в гепатоцитах, ендотеліоцитах в стінках синусоїдів, зірчастих макрофагоцитах мали дистрофічний і деструктивний характер та були виражені більше, ніж у молодих щурів. Той факт що в мітохондріях менше крист та просвітлений матрикс вказує на їх декомпенсацію (виснаження). Характерною особливістю є трансформація жиронакопичувальних клітин в фібробласти.

За гострої метіонінової гіпергомоцистеїнемії в печінці щурів реєструються порушення процесів метилування та транссульфування, внаслідок зростання активності метіонінаденозилтрансферази, цистатіонін- β -синтази, цистатіонін- γ -ліази та зниження активності бетаїнгомоцистеїнметилтрансферази і S-аденозилгомоцистеїнгідролази. Крім того, зростає рівень НАДФН-оксидази – головного продуцента супероксид-аніону та зменшення тіоредоксинредуктази – ключового ензиму системи тіоредоксину. Остання бере участь в регуляції активності редокс-чутливих протеїнів та утворенні дезоксирибонуклеотидів. Ймовірно, що індуковане гіпергомоцистеїнемією зниження активності тіоредоксинредуктази буде негативно відобразатись на функціональному стані редокс-чутливих протеїнів та процесі реплікації [25].

Тривале введення тіолактону ініціює печінковий фіброгенез у щурів, який проявляється гепатомегалією, зростанням вмісту гіалуронової кислоти в сироватці крові, збільшенням вмісту гідроксипроліну в печінці. Одним із

механізмів фіброгенної дії гомоцистеїну на думку дослідників є активація оксидативного стресу, що проявляється симптомами окисної модифікації білків, зниженням активності аконітази і тіоредоксинредуктази, активацією прооксидантних ферментів NADPH-оксидази та ксантинооксидази в печінці [43, 53].

Хронічна гіпергомоцистеїнемія стає причиною розвитку фіброзу печінки. При гістологічному дослідженні виявляли розширення міжклітинних просторів гепатоцитів і перисинусоїдні простори, які були заповнені колагеновими волокнами, зірчастими макрофагами, лімфоцитами та чисельними фібробластами. Найбільш інтенсивне накопичення сполучної тканини виявляли навколо порталних трактів. Спостерігали наявність жирової дистрофії, а подекуди і некрозу гепатоцитів. Більшість із них були поліморфними, навколо осередків некрозу є гепатоцити видовженої форми. Макрофаги мали сферичну форму, просвітлену цитоплазму, гіперхромні ядра з маргінованим хроматином. Просвіти синусоїдних капілярів були розширеними, гіперемованими, виявляли крайове стояння еритроцитів і діapedез лейкоцитів через стінку капіляра. Цитоплазма ендотеліоцитів була неоднорідною, спостерігались як гіпохромні клітини з ознаками набряку, так і гіперхромні з пікнотичними ядрами. Ендотеліальний шар містив ділянки десквамації ендотеліоцитів і вогнища проліферації. Стінки артеріол були потовщеними за рахунок гіперплазії та гіпетрофії гладких м'язів у середній оболонці, а також за рахунок склерозу і фіброзу зовнішньої оболонки. Стінки міжчасточкових жовчних протоків також були потовщеними, склерозованими [67].

Ультраструктурний аналіз в ході нашого дослідження показав, що при експериментальній гіпергомоцистеїнемії в печінці старих щурів відбуваються зміни в усіх структурних компонентах. В ендотелії судин спостерігається деструкція та набряк мітохондрій. Органели мають просвітлений матрикс, зменшену кількість крист. Значна кількість деструктивно змінених мітохондрій в ендотеліоцитах вказує на зрив

адаптаційних механізмів. Зміна структури ендотеліальних клітин призводить до посилення адгезії тромбоцитів, еритроцитів і лейкоцитів. Виникають складжі еритроцитів в просвітах синусоїдів. В останніх більша в порівнянні з такою у інтактних щурів чисельність зірчастих макрофагоцитів і посилена їх міграція в пересинусоїдні простори. Менша кількість жиронакопичувальних клітин вказує на їх трансформацію в фібробласти, що призводить до розростання колагенових волокон, розширення пересинусоїдних просторів, розвитку фіброзу стромы, а також ущільнення базальної мембрани навколо ендотеліоцитів синусоїдів та потовщення бар'єру між кров'ю та гепатоцитами, а отже, порушення транспорту речовин, кисню. Останнє зумовлювало розвиток гіпоксії та оксидативного стресу.

Нещодавні дослідження показали наявність взаємозв'язку між біохімічними змінами тканини щитовидної залози та рівнем гомоцистеїну плазми крові дослідних щурів. Гіпергомоцистеїнемія в тварин супроводжувалась розвитком катаболічних процесів, що характеризувались накопиченням в крові та гомогенатах щитовидної залози низькомолекулярних сполук. Біохімічні дослідження виявили також активацію протеолітичних процесів в органі, про що свідчило зростання рівнів матриксних металопротеїназ (ММР-2). Також протеоліз в тканині щитовидної залози підтверджувався значним зсувом білкового профілю. Реєстрували накопичення білків, що мали молекулярну масу < 30 кДа та зниження високомолекулярних білків. Активація запальних процесів була характерною при гіпергомоцистеїнемії і підтверджувалась зростанням відповідних цитокінів [178].

Отримані результати нашого дослідження дають додаткове розуміння механізмів, залучених до патогенезу гіпергомоцистеїнемії та показують, що порушення протеолізу може бути важливою детермінантою розвитку захворювань печінки. Той факт, що в цій роботі досліджувалися лише металозалежні та серинові ферменти, і не приділялося уваги аспарагіновим або цистеїновим протеазам, може бути обмеженням у комплексній оцінці

загального протеолітичного гомеостазу в печінці. Потрібні подальші дослідження для з'ясування молекулярних механізмів, що лежать в основі протеолітичного дисбалансу в печінці при гіпергомоцистеїнемії та залучення інших протеолітичних систем.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подано теоретичне узагальнення та нове вирішення науково-практичного завдання щодо встановлення змін структури печінки щурів різного віку, що поглиблюються на тлі хронічної гіпергомоцистеїнемії.

1. При гістологічному та електронно-мікроскопічному дослідженні печінки щурів різного віку контрольної групи встановлено, що у *молодих тварин* зустрічаються поодинокі двоядерні гепатоцити, між гепатоцитами виявляються поодинокі жиронакопичувальні клітини, вміст сукцинатдегідрогенази та глікогену не змінений. У *зрілих щурів* в цитоплазмі гепатоцитів збільшується чисельність включень глікогену, мілких крапель жиру, а також вміст колагенових волокон, синусоїдні капіляри мають помірно розширений просвіт, більша активність сукцинатдегідрогенази спостерігається в центролобулярній зоні печінкових часточок. У *тварин старого віку* в складі портальних трактів наявне розростання пухкої волокнистої сполучної тканини, зростає кількість двоядерних гепатоцитів, спостерігається наявність включень ліпідів та ліпофусцину, а також збільшення кількості клітин Купфера при зниженні активності сукцинатдегідрогенази та щільності глікогену в гепатоцитах.

2. При гістологічному дослідженні на тлі гіпергомоцистеїнемії в печінці *молодих щурів* спостерігається незначне потовщення навколочасточкової сполучної тканини, в більшості клітин відмічається вакуольно-гідропічна та жирова дистрофія, зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену в гепатоцитах. У *дорослих тварин* виявлено потовщення волокнистої сполучної тканини навколо часточок та у складі портальних трактів, дисконплектація печінкових балок, осередки некрозу паренхіми печінки, гіпертрофія та гіперплазія гладких міоцитів середньої оболонки та фіброз зовнішньої оболонки стінки міжчасточкових артерій, лейкоцитарна

інфільтрація порталних трактів, значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену. У щурів старого віку відмічається фіброз печінки, зростання вмісту колагенових волокон в перисинусоїдальних просторах, виражена жирова дистрофія, збільшення осередків некрозу та значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену у гепатоцитах.

3. При електронно-мікроскопічному дослідженні структури печінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії у молодих тварин виявляється збільшення кількості та розміру крапель жиру в гепатоцитах, розширення просвітів жовчних каналців та перисуносоїдних просторів, проліферація клітин Іто, набряклість цитоплазми ендотеліоцитів та складжі формених елементів крові, що контактують з ними. У дорослих щурів ультраструктурні зміни в гепатоцитах, ендотеліоцитах стінок синусоїдів, зірчастих макрофагоцитах має дистрофічний та деструктивний характер, спостерігається трансформація клітин Іто в фіброласти. У старих тварин спостерігається гідропічна та жирова дистрофія гепатоцитів, деструкція та гіпертрофія органел ендотелію судин, зростання чисельності зірчастих макрофагоцитів і посилення їх міграції в розширені пересинусоїдні простори, зменшення кількості клітин Іто і, відповідно, розростання колагенових волокон.

4. При біохімічному дослідженні печінки щурів встановлено, що патогенез гіпергомоцистеїнемії супроводжується протеолітичним дисбалансом у даному органі, який виявляється у підвищенні загальної протеолітичної активності, незначній активності серинових протеаз ($0,291 \pm 0,014$; $0,135 \pm 0,006$ і $0,111 \pm 0,003$ мг/1 г загальної маси печінки у контрольної групи та $0,462 \pm 0,023$; $0,520 \pm 0,026$ і $0,541 \pm 0,027$ мг/1 г загальної маси печінки щурів за умов гіпергомоцистеїнемії молодого, зрілого та старого віку відповідно) і особливо активності метало-залежних ферментів (на 42% у молодих, на 17% у зрілих та на 31% більше у старих тварин, в порівнянні відповідно до тварин контрольної групи). Зростання рівня матриксних металопротеїназ вказує на участь цих ферментів в посиленні протеолізу,

опосередкованого метало-залежними ферментами. Незважаючи на значне збільшення вмісту серинових протеаз, їх активність істотно не зростала. Це може бути пов'язано з протеолітичною деградацією серинових протеаз, що підтверджується змінами якісного складу цих ферментів, зокрема виявлено накопичення низькомолекулярних білків і зниження частки білків з молекулярною масою понад 50 кДа у фракції серинових протеаз.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аббасова, М. Р. (2016). Влияние различных вариантов фармакотерапии на сосудодвигательную и продуктивную функции эндотелия сосудов, обмен липидов, гомоцистеина и клинические проявления ИБС у больных сахарным диабетом 2-го типа. *Ліки України*, 4 (29), 16-21.
2. Акопян, Г. Р., Назарько, І. М. & Андреев, Є. В. (2014). Показники обміну гомоцистеїну як один із критеріїв серцево-судинного ризику у хворих на ішемічну хворобу серця. *Серце і судини*, 3, 53-58.
3. Андрушко, І. І. (2007). Вміст цистеїну у практично здорових осіб та пацієнтів з ішемічною хворобою серця. *Український кардіологічний журнал*, 3, 43-47.
4. Андрушко, І. І. (2008). Рівень гомоцистеїну, цистеїну та аргініну у практично здорових осіб: вікові та статеві детермінанти. *Український кардіологічний журнал*, 5, 89-95.
5. Артемчук, М. А. (2006). Профілактично-лікувальна дія вітамінних та вітамінно-мікроелементних препаратів за гострої та хронічної метіонінової гіпергомоцистеїнемії. *Biomedical and biosocial anthropology*, 7, 17-20.
6. Бабак, О. Я., Лапшина, Е. А., Бабак, М. О. & Черняк, А. Н. (2015). Стратегия лечения болезней печени. Роль и место адеметионина с позиции доказательной медицины. *Сучасна гастроентерологія*, 1 (81), 30-34.
7. Безсмертний, Ю. О., Заїчко, Н. В. & Мельник, А. В. (2011). Вплив гомоцистеїну та гідроген сульфїду на тонус стегнових артерій щурів та його зміни за умов модулювання обміну сірковмісних амінокислот. *Буковинський медичний вісник*, 4 (60), 82-86.
8. Беловол, А. Н., & Бобронникова, Л. Р. (2017). Предикторы ранней диагностики фиброза при сочетанном течении хронического гепатита С и неалкогольной жировой болезни печени. *Сучасна гастроентерологія*, 3 (95), 6-11.

9. Власенко, А. В. (2013). Влияние гипергомоцистеинемии на развитие неалкогольной жировой болезни печени при сахарном диабете. *Международный эндокринологический журнал*, 1 (49), 10-14.
10. Галаган, Ю. В. (2023). *Features of histological changes in liver tissue of old rats with simulated hyperhomocysteinemia*. Тези опубліковані в матеріалах науково-практичної конференції «Формування науки: стан і перспективи розвитку в умовах сьогодення», Київ (стор. 76).
11. Галаган, Ю. В. (2023). *Електронно-мікроскопічні зміни в печінці щурів віком 1-2 місяці за умов гіпергомоцистеїнемії*. Тези опубліковані в матеріалах Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (III Жутаєвські читання), Полтава (стор. 18).
12. Галаган, Ю. В. (2023). *Особливості гістологічних змін тканини печінки старих щурів при змодельованій гіпергомоцистеїнемії*. Тези опубліковані в матеріалах 92-а науково-практичної конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації», Івано-Франківськ (стор. 198).
13. Галаган, Ю. В. (2023). *Порівняння особливостей структурних змін печінки молодих та зрілих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії*. Тези опубліковані в матеріалах XX Наукової конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку — 2023», Вінниця (стор. 591).
14. Галаган, Ю. В. (2023). *Порушення протеолітичного гомеостазу у печінці щурів з моделлю гіпергомоцистеїнемії*. Тези опубліковані в матеріалах XIX Наукової конференції “Львівські хімічні читання – 2023”, Львів (стор. 198).
15. Горальський, Л. П., Хомич, В. Т., & Кононський, О. І. (2011). *Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології*. Житомир: Полісся.

16. Гречанина, О. Я. (2013). Метионин – незаменимая аминокислота. *Клінічна генетика і перинатальна діагностика*, 1 (2), 19-35.
17. Добреля, Н. В., Бойцова, Л. В. & Данова, І. В. (2015). Правова база для проведення етичної експертизи доклінічних досліджень лікарських засобів з використанням лабораторних тварин. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, 2, 95-100.
18. Жаркова, А. В. (2013). Шляхи корекції гіпергомоцистеїнемії та дисліпідемії на фоні тривалого прийому інгібіторів протонної помпи. *Запорозький медичний журнал*, 1 (76), 15-18.
19. Заїчко, Н. В. (2003). Окислювальна модифікація білків сироватки крові як маркер активності ревматоїдного артриту та її зміни під впливом фармакотерапії амізоном, індометацином, німесулідом. *Вісник Вінницького національного медичного університету*, 7 (2), 664 – 666.
20. Заїчко, Н. В. (2010). Вплив навантаження тіолактоном гомоцистеїну на обмін аденозину у щурів: зв'язок з гіперреактивністю тромбоцитів, корекція порушень його обміну вітамінно-мікроелементним комплексом. *Український біохімічний журнал*, 2, 59-66.
21. Заїчко, Н. В. (2010). Вплив хронічного навантаження тіолактоном гомоцистеїну та його комбінації з L-NAME на ензими метаболізму сірковмісних амінокислот в печінці щурів. Корекція вітамінно-мікроелементним комплексом. *Вісник наукових досліджень*, 2, 61-65.
22. Заїчко, Н. В. (2010). Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідроген сульфід у плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*, 4, 35-41.
23. Заїчко, Н. В., & Артемчук, М. А. (2010). Вплив вітамінно-мікроелементного комплексу та бетаїну на стан системи гемостазу в щурів з гіповітамінозно-метіоніновою гіпергомоцистеїнемією. *Медична хімія*, 4, 72-78.

24. Заїчко, Н. В., Андрушко, І. І. & Мельник, А. В. (2009). Вплив гострої метіонінової гіпергомоцистеїнемії на утворення гідроген сульфід у органах щурів та його корекція комплексом вітамінів В6, В9, В12. *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія*, 4, 29-35.
25. Заїчко, Н. В., Луцюк, М. Б. & Григор'єва, Г. О. (2012). Гіпергомоцистеїнемія: медико-соціальні та фармакологічні аспекти. *Фармацевтичний кур'єр*, 9, 30-35.
26. Заїчко, Н. В., Пентюк, О. О. & Карбовський, В. Л. (2007). Вплив гомоцистеїну, цистеїну та їхніх похідних на тромбоцитарну ланку системи гемостазу. *Український біохімічний журнал*, 5, 122-132.
27. Звягинцева, Т. Д., & Глущенко, С. В. (2015). Современные принципы диагностики и лечения неалкогольного стеатогепатита. *Гепатология*, 4 (38), 42-43.
28. Звягинцева, Т. Д., Чернобай А. И. & Глущенко, С. В. (2014). Роль адеметионина в развитии и прогрессировании хронических заболеваний печени. *Український медичний часопис*, 3 (101), 56-59.
29. Звягинцева, Т. Д., Чернобай А. И. & Глущенко, С. В. (2014). Хронические заболевания печени и нарушение синтеза S-аденозил-L-метионина. *Сучасна гастроентерологія*, 3 (77), 80-88.
30. Копильчук, Г. П., Бучковська, І. М. & Островська, Ю. К. (2015). Особливості транссульфування гомоцистеїну в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності. *Biological systems*, 2, 156-162.
31. Корчинська, О. О., Росток, Л. М., Лях, О. І., Сіткар, А. Д., Лях, В. І., Галдунова, Г., ...Шлоссерова, А. (2016). Гіпергомоцистеїнемія як основа різних патологічних станів (огляд літератури). *Проблеми клінічної педіатрії*, 3-4 (33-34), 26-33.
32. Луцюк, М. Б., Заїчко, Н. В., Григор'єва, Г. С., Конахович, М. А., Артемчук, М. А., Пентюк, Н. О.,... Постовітенко, К. П. (2013). Синдром гіпергомоцистеїнемії: причини виникнення, способи профілактики та лікування. *Рациональная фармакотерапия*, 29 (4), 55-60.

33. Мельник, А. В. (2010). Активність ензимів транссульфування та метилування в нирках за умов тривалого навантаження щурів тіолактоном гомоцистеїну, його комбінації з L-NAME та корекції їх порушень вітамінно-мікроелементним комплексом. *Biomedical and biosocial anthropology*, 14, 58-62.
34. Мельник, А. В., & Заїчко, Н. В. (2017). Гендерні особливості впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот та гідроген сульфід у печінці. *Медична та клінічна хімія*, 1 (19), 95-101.
35. Михайленко, О. Ю., & Зубкова, С. Т. (2013). Гомоцистеїн як чинник кардіоваскулярного ризику у хворих на гіпотиреоз. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*, 1 (42), 34-38.
36. Михалойко, О. Я. (2016). Концентраційні зміни плазмового гомоцистеїну при гострому ішемічному інсульті. *Буковинський медичний вісник*, 1 (77), 84-86.
37. Михнева, А. Г., Димитренко, Е. В. & Чабан, Н. Б. (2016). *Возрастная морфология: учебно-методическое пособие*. Тирасполь: ГОУ ПГУ.
38. Некрут, Д. О., & Заїчко, Н. В. (2017). Вплив поєднання високожирової дієти та тіолактонової гіпергомоцистеїнемії на масо-ростові параметри та біохімічні маркери стану печінки у щурів. *Буковинський медичний вісник*, 2 (82), 36-41.
39. Некрут, Д. О., Заїчко, Н. В. & Струтинська, О. Б. (2017). Рівень інсуліноподібного фактора росту-1 та гідроген сульфід у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією. *Медична та клінічна хімія*, 1 (19), 40-46.
40. Некрут, Д. О., Заїчко, Н. В., & Король, А. П. (2017). Вплив гіполіпідемічних засобів на морфологічні зміни в печінці щурів за неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією. *Biomedical and biosocial anthropology*, 28, 66-71.

41. Нечипорук, В. М., Заїчко, Н. В., Мельник, А. В. & Корда, М. М. (2014). Роль тиреоїдних гормонів в обміні гомоцистеїну. *Медична хімія*, 1 (16), 81-88.
42. Ольховський О.С., Мельник А.В. & Заїчко Н.В. (2012). Вікові відмінності продукції гідроген сульфїду в серці та аорті щурів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*, 11, 4(36), 133-137.
43. Орловський, В. Ф., & Кучма, Н. Г. (2015). Вплив корекції гіпергомоцистеїнемії на функціональні печінкові проби та ліпідний профіль у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки в поєднанні з цукровим діабетом. *Міжнародний ендокринологічний журнал*, 5 (69), 31-34.
44. Орловський, В. Ф., & Кучма, Н. Г. (2015). Вплив С677Т поліморфізму гену метилентетрагідрофолатредуктази на вміст гомоцистеїну плазми крові у пацієнтів із неалкогольною жировою хворобою печінки та шлях його корекції. *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*, 3 (3), 461-467.
45. Пасієшвілі, Л. М., Железнякова, Н. М. & Пасієшвілі, Т. М. (2014). Неалкогольна жирова хвороба печінки та артеріальна гіпертензія: патогенетичні чинники формування та прогресування. *Гастроентерологія*, 2 (52), 46-49.
46. Пентюк, Н. О. (2009). Вплив гіпергомоцистеїнемії на формування ССЛ4-індукованого фіброзу печінки у щурів. *Сучасна гастроентерологія*, 5 (49), 33-37.
47. Пентюк, Н. О., & Харченко, Н. В. (2010). Гіперпродукція вазоактивних медіаторів як патогенетичний чинник розвитку ускладнень цирозу печінки у щурів. *Сучасна гастроентерологія*, 2 (52), 33-43.
48. Пентюк, О. О. (2011). Метаболічні предиктори фіброзу печінки у хворих на хронічні гепатити. *Експериментальна і клінічна медицина*, 1, 134-138.
49. Пентюк, О. О., Луцюк, М. Б. & Андрушко, І. І. (2007). Вітаміни В9, В12 та В6, поліморфізм ферментів їх обміну, зв'язок з метаболізмом

гомоцистеїну, роль в патології. Ренесанс клінічної вітамінології. *Медична хімія*, 1 (9), 126-131.

50. Пентюк, О. О., Луцюк, М. Б. & Артемчук, М. А. (2007). *Доклінічні дослідження гіпергомоцистеїнемічної дії потенційних лікарських засобів*. К.: ДФЦ МОЗ України.

51. Пентюк, О. О., Луцюк, М. Б. & Заїчко, Н. В. (2008). Патогенетичні аспекти гіпергомоцистеїнемії та перспективи створення лікарських засобів для лікування патології, асоційованої з порушеннями обміну гомоцистеїну. *Biomedical and biosocial anthropology*, 10, 297-303.

52. Пентюк, О. О., Луцюк, М. Б. & Постовітенко, К. П. (2004). Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті. *Досягнення біології та медицини*, 1 (3), 35-38.

53. Пентюк, О. О., Луцюк, М. Б., & Артемчук, М. А. (2007). *Доклінічні дослідження гіпергомоцистеїнемічної дії потенційних лікарських засобів*. К.: ДФЦ МОЗ України.

54. Пентюк, О. О., Луцюк, М. Б., Андрушко, І. І. & Постовітенко, К. П. (2003). Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології. *Український біохімічний журнал*, 1, 5-17.

55. Петрух, А. А. (2014). Вплив гомоцистеїну як незалежного фактора ризику серцево-судинних захворювань у практиці кардіолога. *Мистецтво лікування*, 5 (6), 49-51.

56. Присяжнюк, В. П. (2014). Вікові особливості вмісту окремих про- та протизапальних цитокінів у крові хворих на цироз печінки невірусної етіології. *Гастроентерологія*, 1 (51), 37-43.

57. Присяжнюк, В. П., & Сидорчук, Л. П. (2015). Зв'язок делеційного поліморфізму генів GSTT1 та GSTM1 з біохімічними показниками крові та параметрами про- та антиоксидантної систем у хворих на неалкогольну жирову хворобу печінки. *Сучасна гастроентерологія*, 5 (85), 40-47.

58. Просоленко, К. О. (2016). Динаміка вмісту адипонектину, прозапальних цитокінів та деяких метаболічних показників у пацієнтів з

неалкогольною жировою хворобою печінки та гіпертонічною хворобою при використанні комбінованої терапії. *Сучасна гастроентерологія*, 2 (88), 21-28.

59. Харченко, Н. В., Анохіна, Г. А. & Харченко, В. В. (2011). Корекція порушень функціонального стану печінки, вмісту ліпідів, гомоцистеїну крові, ендотеліальної функції та енергетичного обміну у хворих на неалкогольний стеатогепатит у поєднанні з гіпертонічною хворобою. *Сучасна гастроентерологія*, 1 (57), 28-32.

60. Хворостинка, В. Н., & Власенко, А. В. (2008). Патогенетические аспекты жировой дистрофии печени при сахарном диабете. *Сучасна гастроентерологія*, 5 (43), 50-53.

61. Швед М.І., Бойко Т.В., Лихацька Г.В. Бойко В.І. & Лихацька В.О. (2013). Динаміка клініко-біохімічних показників у хворих на цироз печінки під впливом комплексної терапії із застосуванням урсодексихолевої кислоти. *Гастроентерологія*, 4 (50), 57-60.

62. Шевчук, С. В., & Кувікова, І. П. (2014). Гіпергомоцистеїнемія у пацієнтів із антифосфоліпідним синдромом. Зв'язок із перебігом захворювання та станом серцево-судинної системи. *Український ревматологічний журнал*, 3 (57), 80-86.

63. Юрченко, П. О. (2015). Вплив ізольованої гіпергомоцистеїнемії на систему гідроген сульфїду в головному мозку щурів. *Вісник проблем біології і медицини*, 2 (3), 252-256.

64. Юрченко, П. О., Мельник, А. В., Заїчко, Н. В. & Йолтухівський, М. М. (2014). Особливості обміну гомоцистеїну та гідроген сульфїду в центральній нервовій системі. *Медична та клінічна хімія*, 3 (16), 90-96.

65. Яковлєва, В. Г. (2015). Особливості порушень коагуляційної ланки гемостазу у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень. *Клінічна медицина*, 3 (20), 56-61.

66. Яковлєва, О. О., & Кириченко, О. В. (2013). Ефективність метаболічної корекції гіпергомоцистеїнемії при гіпертонічній хворобі. *Артеріальна гіпертензія*, 4 (30), 23-26.

67. Ahn, C. W., Jun, D. S., Na, J. D., Choi, Y. J., Kim, Y. C. (2016). Alleviation of hepatic fat accumulation by betaine involves reduction of homocysteine methyltransferase (BHMT). *Biochem Biophys Res Commun*, 477 (3), 440-447.
68. Ai, Y., Sun, Z., Peng, C., Liu, L., Xiao, X., Li, J. (2017). Homocysteine Induces Hepatic Steatosis Involving ER Stress Response in High Methionine Diet-Fed Mice. *Nutrients*, 9 (4): E346. doi: 10.3390/nu9040346
69. Aleksandra Baszczuk & Zygmunt Kopczyński (2014). [Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 68, 579-89. doi: 10.5604/17322693.1102340.
70. Alicja Gospodarczyk, Kamil Marczewski, Natalia Gospodarczyk, Michał Widuch, Michał Tkocz & Jolanta Zalejska-Fiolka (2022). Homocysteine and cardiovascular disease - a current review. *Wiad Lek*, 75(11 pt 2), 2862-2866. doi: 10.36740/WLek202211224.
71. Andreichin, S., & Holomsha, T. (2012). Modern presentations of metabolic endogenous intoxication. *Infectious diseases*, 1, 84-87.
72. Azad, M. A. K., Huang, P., Liu, G., Ren, W., Tekebrh, T., Yan, W.,...Yin, Y. (2018). Hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease in animal model. *Amino Acids*, 50 (1), 3-9.
73. Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. (2017). *Liver Int.* 37 Suppl 1:81–84.
74. Berge, R. K., Bjorndal, L., Strand, E., Bohov, P., Lindquist, C., Nordrehaug, J. E.,...Nygard, O. (2016). Tetradecylthiopropionic acid induces hepatic mitochondrial dysfunction and steatosis, accompanied by increased plasma homocysteine in mice. *Lipids Health Dis*, 15, 24.
75. Bhanji, R. A., Ma, M., Bain, V. G., Montano-Loza, A. J. (2016). Hyperhomocysteinemia is associated with severity of cirrhosis and negative impact after liver transplantation. *Liver Int*, 36 (5), 696-704.

76. *Bio-Radlaboratoriesinc.* (2015). A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection. [online] Available at: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf.
77. Blom, H. J., & Smulders, Y. (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defect. *J Inherit Metab Dis*, 34 (1), 75-81.
78. Boyacioglu, M., Sekkin, A., Kum, C., Korkmaz, D., Kiral, F., Yalinkilinc, H. S.,...Akar, F. (2014). The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol*, 66 (9-10), 407-413.
79. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
80. Chang, S. C., Goldstein, B. Y., Mu, L., Cai, L., You, N. C., He, N.,...Lu, Q. Y. (2015). Plasma folate, vitamin B12, and homocysteine and cancers of the esophagus, stomach, and liver in a Chinese population. *Nutr Cancer*, 67 (2), 212-223.
81. Chen, Y., Liu, H., Wang, X., Zhang, H., Liu, E., Su, X. (2017). Homocysteine up-regulates endothelin type A receptor in vascular smooth muscle cells through Sirt1/ERK1/2 signaling pathway. *Microvasc Res*, 114, 34-40.
82. Chen, Y., Zhang, H., Liu, E., Xu, C., Zhang, Y. (2016). Homocysteine regulates endothelin type B receptors in vascular smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol*, 87, 100-109.
83. Cheng, S. B., Lin, P. T., Liu, H. T., Peng, Y. S., Huang, S. C., Huang Y. C. (2016). Vitamin B6 Supplementation Could Mediate Antioxidant Capacity by Reducing Plasma Homocysteine Concentration in Patients with Hepatocellular Carcinoma after Tumor Resection. *Biomed Res Int*, 2, doi: 10.1155/2016/7658981.
84. Cheng, Z., Jiang, X., Fang, P., Kishore, R., Kevil, C. (2015). Hyperhomocysteinemia Potentiated the Impairment of Hydrogen Sulfide-Induced

Endothelium-Derived Hyperpolarization-Mediated Vascular Relaxation in Diabetic Db/db Mice. *Circ Res*, 117 (1), 272-276.

85. Cho, K. H., Jeong, Y. I., Sim, D. S., Hong, Y. J., Kim, Ju H., Ahn, Y.,...Kang, J. C. (2013). Pulmonary thromboembolism due to severe hyperhomocysteinemia associated with a methyltetrahydrofolate reductase mutation. *Korean J Intern Med*, 28 (1), 112-115.

86. Chornenka, N., Domylivska, L., Kravchenko, O., Koval, T., Torgalo, L., Kostiuk, A.,... Ostapchenko, L. (2020). The effect of melanin on the proteolytic potential of blood under alkali esophageal burn. *J. Biol. Res.*, 93(8577), 63-7.

87. Choudhury, S., & Borah, A. (2015). Activation of NMDA receptor by elevated homocysteine in chronic liver disease contributes to encephalopathy. *Med Hypotheses*, 85 (1), 64-67.

88. Crowther, J.R. (2000). The ELISA guidebook. *Methods in Molecular Biology*, 149:III-IV, pp.1-413.

89. Cueto, R., Zhang, L., Shan, H. M., Huang, X., Li, X., Lopez, J.,...Wang, H. (2018). Identification of homocysteine-suppressive mitochondrial ETC complex genes and tissue expression profile – Novel hypothesis establishment. *Redox Biol*, 17, 70-88.

90. Dai, H., Wang, W., Tang, X., Chen, R., Chen, Z., Lu, Y.,...Yuan, H. (2016). Association between homocysteine and non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults: a cross-sectional study. *Nutr J*, 15 (1), 102.

91. Dai, Y., Zhu, J., Meng, D., Yu, C., & Li, Y. (2016). Association of homocysteine level with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *J Clin Biochem Nutr*, 58 (1), 76-83.

92. Daniela Anghel, Carmen Adella Sîrbu, Elena-Mădălina Hoinoiu, Oana-Georgiana Petrache, Cristina-Florentina Pleșa, Maria Magdalena Negru,...Florentina Ioniță-Radu (2021). Influence of anti-TNF therapy and homocysteine level on carotid intima-media thickness in rheumatoid arthritis patients. *Exp Ther Med*, 23(1), 59. doi: 10.3892/etm.2021.10981.

93. Davut Azboy & Zeki Temiztürk (2020). Clinical Outcomes after Biologic Graft Use for the Creation of Blalock-Taussig Shunt in Critically Ill Patients with Thrombophilia. *Heart Surg Forum*, 23(6), E718-E724. doi: 10.1532/hsf.2749.
94. Deminice, R., Padilha, Cde S., Borges, F., da Silva, L. E., Rosa, F. T., ...Frajacomo, F. T. (2016). Resistance exercise prevents impaired homocysteine metabolism and hepatic redox capacity in Walker-256 tumor-bearing male Wistar rats. *Nutrition*, 32 (10), 1153-1158.
95. Deng, J., Lu, S., Liu, H., Liu, B., Jiang, C., Xu, Q.,... Wang, X. (2018). Homocysteine Activates B Cells via Regulating PKM2-Dependent Metabolic Reprogramming. *J Immunol*, 198(1), 170-183.
96. Dong, Y., Sun, Q., Liu, T., Wang, H., Jiao, K., Xu, J.,... Wang, W. (2016). Nitrate stress participates in endothelial progenitor cell injury in hyperhomocysteinemia. *PLoS ONE*, 11(7), 1-10.
97. Elijah Trefts, Maureen Gannon & David H Wasserman (2017). The liver *Curr Biol*, 27(21), R1147-R1151. doi: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
98. Esrefoglu, M., Taslidere, E. & Cetin, A. (2017). Development of Liver and Pancreas. *Bezmialem Science*, 4, 30-35.
99. Familitseva, A., Chaturvedi, P., Kalani, A., Jeremic, N., Metreveli, N., Kunkel, G. H.,... Tyagi, S. C. (2016). Toll-like receptor 4 mutation suppresses hyperhomocysteinemia-induced hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*, 311(4), 596-606.
100. Familitseva, A., Jeremic, N., Kunkel, G. H. & Tyagi, S. C. (2017). Toll-like receptor 4 mediates vascular remodeling in hyperhomocysteinemia. *Mol Cell Biochem*, 433 (1-2), 177-194.
101. Fang, K., Chen, Z., Liu, M., Peng, J. & Wu, P. (2015). Apoptosis and calcification of vascular endothelial cell under hyperhomocysteinemia. *Med Oncol*, 32(1), 403-405.
102. Faversani, J. L., Hammerschmidt, T. G., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M. & Vargas, C. R. (2017). Oxidative Stress in Homocysteinuria Due to Cystathione

β -synthase Deficiency: Findings in Patients and in Animal Model. *Cell Mol Neurobiol*, 37(8), 1477-1485.

103. Fernandez-Rodriguez, C., Gonzales-Reimers, E., Quintero-Platt, G., de la Vega-Prieto, M. j., Perez-Hernandez, O., Martin-Gonzalez, C.,...Santolaria-Fernandez, F. (2016). Homocysteine, Liver Function Derangement and Brain Atrophy in Alcoholics. *Alcohol Alcohol*, 51 (6), 691-697.

104. Francois Blachier, Mireille Andriamihaja & Anne Blais (2020). Sulfur-Containing Amino Acids and Lipid Metabolism. *J Nutr*, 150(Suppl 1), 2524S-2531S. doi: 10.1093/jn/nxaa243.

105. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E & Sagi I. (2015). Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol*, 44–46, 191–9.

106. Ganguli, P., & Alam, S. F. (2015). Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*, 14, 6.

107. Ghaffari, A., Rafraf, M., Mavekar, R., Sepehri, B., Asghari-Jafarabadi, M., Ghavami, S. M.,...Manafi, N. (2017). Effect of Turmeric on Homocysteine and Fetuin-A in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Iran Red Crescent Med S*, 19 (4): e43193.

108. Gormus, Z., Cicek, M. C. & Kutlu, S. (2015). Acute occlusion of iliac artery and pulmonary thromboembolism due to hyperhomocysteinemia. *Cardiovascular Surgery*, 4(1), 1-3.

109. Gu, P., De Fina, L. F., Leonard, D., John, S., Weiner, M. F. & Brown, E. S. (2012). Relationship between serum homocysteine levels and depressive symptoms: the Cooper Center Longitudinal Study. *J Clin Psychiatry*, 73 (5), 691-695.

110. Guistarini, D., Fanti, P., Sparatore, A., Matteucci, E. & Rossi, R. (2014). Anethole dithiolethione lowers the homocysteine and raises the glutathione levels in solid tissues and plasma of rats: a novel non-vitamin homocysteine-lowering agent. *Biochem Pharmacol*, 89(2), 246-254.

111. Guo, T., Chen, H., Liu, B., Ji, W. & Yanc, C. (2012). Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and risk of autism in the Chinese Han population. *Genet Test Mol Biomark*, 16 (8), 968-973.
112. Halahan, Y. (2020). Submicroscopic changes in the liver of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 26(1), 19-23. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26\(1\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26(1)-03).
113. Halahan, Y. V. (2023). Histological and histochemical changes in liver tissue of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 27(1), 6-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-01](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-01)
114. Halahan, Y. V., Maievskyi, O. Y., Guminskyi, Y. Y., & Korol, A. P. (2019). The effect of hyperhomocysteinemia on the patterns of electron microscopic changes in the liver of adult rats. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (36), 16-21. <https://doi.org/10.31393/bba36-2019-03>.
115. Halahan, Y. V., Maievskyi, O. Y., Guminskyi, Y. Y., Korol, A. P., & Prokopenko, S. V. (2019). Features of electron microscopic changes in the liver of rats aged 24-26 months under conditions of hyperhomocysteinemia. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (37), 60-65. <https://doi.org/10.31393/bba37-2019-10>.
116. Hirase, T., & Node, K. (2012). Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302 (3), 499-505.
117. Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. P. (2012). Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 35(20), 2923–2950.
118. Hsu, C. C., Cheng, C. H., Hsu, C. L., Lee, W. J., Huang, S. C. & Huang, Y. C. (2015). Role of vitamin B6 status on antioxidant defenses, glutathione and related enzyme activities in mice with homocysteine-induced oxidative stress. *Food Nutr Res*, 59: 25702.
119. Huo, Y., Wu, X., Ding, J., Geng, Y., Qiao, W., Ge, A.,...Fan, W. (2018). Vascular Remodeling, Oxidative Stress and Disrupted PPAR γ Exspression

in Rats of Long-Term Hyperhomocysteinemia with Metabolic Disturbance. *PPAR Res*, doi: 10.1155/2018/6738703.

120. Jacobs, R. L., Jiang, H., Kennelly, J. P., Orlicky, D. J., Allen, R. H., Stabler, S. P.,...Maclean, K. N. (2017). Cystathione beta-synthase deficiency alters hepatic phospholipid and choline metabolism: post-translation repression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase is a consequence rather than a cause of liver injury in homocysteinuria. *Mol Genet Metab*, 120 (4), 325-336.

121. Jeon, J. S., Oh, J. J., Kwak, H. C., Yun, H. Y., Kim, H. C., Kim, Y. M.,...Kim, S. K. (2018). Age-Related Changes in Sulfur Amino Acid Metabolism in Male C57BL/6 Mice. *Biomol Ther (Seoul)*, 26 (2), 167-174.

122. Jeremic, J., Turnic, T. N., Zivkovic, V., Jeremic, N., Milosavljevic, I., Srejovic, I.,...Jakovlevic, V. (2018). Vitamin B complex mitigates cardiac dysfunction in high-methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Clin Exp Ppharmacol Physiol*, 45 (7), 683-693.

123. Jérôme Piquereau, Maryline Moulin, Giada Zurlo, Philippe Mateo, Mélanie Gressette, Jean-Louis Paul,...Anne Garnier (2017). Cobalamin and folate protect mitochondrial and contractile functions in a murine model of cardiac pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*, 102:34-44. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.11.010.

124. Jin, B., Gong, Z., Yang, N., Huang, Z., Zeng, S., Chen, H.,...Pan, G. (2016). Down regulation of betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis. *Tumour Biol*, 37 (5), 5911-5917.

125. Joseph E Baggott & Tsunenobu Tamura (2015). Homocysteine, iron and cardiovascular disease: a hypothesis. *Nutrients*, 7(2), 1108-18. doi: 10.3390/nu7021108.

126. Jun Zhang (2022). Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Rev Cardiovasc Med*, 23(2), 73. doi: 10.31083/j.rcm2302073.

127. Jurkowska, H., Niewiadomski, J., Hirschberger, L. L., Roman, H. B., Mazor, K. M., Liu, X.,...Stinanuk, M. H. (2016). Downregulation of hepatic betaine: homocysteine methyltransferase (BHMT) expression in taurine-deficient mice is reversed by taurine supplementation in vivo. *Amino Acids*, 48 (3), 665-676.
128. Kamat, P. K., Mallonee, C. J., George, A. K., Tyagi, S. C. & Tyagi, N. (2016). Homocysteine, Alcoholism, and Its Potential Epigenetic Mechanism. *Alcohol Clin Exp Res*, 40 (12), 2474-2481.
129. Kamil Karolczak, Bartłomiej Soltysik, Tomasz Kostka, Piotr J Witas & Cezary Watala (2019). Platelet and Red Blood Cell Counts, as well as the Concentrations of Uric Acid, but Not Homocysteinaemia or Oxidative Stress, Contribute Mostly to Platelet Reactivity in Older Adults. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 9467562. doi: 10.1155/2019/9467562.
130. Kaminsky, R. F., Dzevulska, I. V., Yanchyshyn, A. Ya., Matkivska, R. M., & Samborska, I. A. (2022). Submicroscopic changes in the heart of adult rats under conditions of persistent hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 3 (28), 21-25. doi: 10.31393/morphology-journal-2022-28(3)-03.
131. Kang, S., & Rosenson, R. S. (2018). Analytic Approaches for the Treatment of Hyperhomocysteinemia and Its Impact on Vascular Disease. *Cardiovasc Drugs Ther*, 32 (2), 233-240.
132. Karyn L Sheaffer & Klaus H Kaestner (2012). Transcriptional networks in liver and intestinal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9), a008284. doi: 10.1101/cshperspect.a008284.
133. Kaur, R., & Sekhon, B. S. (2013). Hyperhomocysteinemia: an overviews. *International journal of comprehensive pharmacy*, 5(1), 1-4.
134. Kim, J. T., Youn, C. H., Ko, H. J., Kim A. S., Kim, H. M., Kim, H. S.,...Kim, M. S. (2017). Association of the Serum Homocysteine Levels and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J Fam Pract*, 7 (3), 424-430.
135. Kondakci, G., Aydin, A. F., Dogru-Abbasoglu, S. & Uysal, M. (2017). The effect of N-acetylcysteine supplementation on serum homocysteine levels and

hepatic and renal oxidative stress in homocysteine thiolactone-treated rats. *Arch Physiol Biochem*, 123 (2), 128-133.

136. Konstantin A Lusta, Anastasia V Poznyak, Vasily N Sukhorukov, Ilya I Eremin, Irina I Nadelyaeva & Alexander N Orekhov (2023). Hypotheses on Atherogenesis Triggering: Does the Infectious Nature of Atherosclerosis Development Have a Substruction? *Cells*, 12(5), 707. <https://doi.org/10.3390/cells12050707>.

137. Koyama, Y., & Brenner, D. A. (2017). Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest*, 127 (1), 55-64.

138. Lai, C. H., Lee, C. N., Bai, K. J, Yang, Y. L., Chuang, K. J., Wu, S. M., ... Chuang, H. C. (2016). Protein oxidation and degradation caused by particulate matter. *Sci Rep*, 6: 33727.

139. Lai, W. K., & Kan, M. Y. (2015). Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab*, 67 (1), 1-12.

140. Lara Campana & John P Iredale (2017). Regression of Liver Fibrosis. *Semin Liver Dis*, 37(1), 1-10. doi: 10.1055/s-0036-1597816.

141. Leach, N. V., Dronca, E., Vesa, S. C., Sampelean, D. P., Craciun, E. C., Lupsor, M.,...Grigorescu, M. (2014). Serum homocysteine levels, oxidative stress and cardiovascular risk in non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Intern Med*, 25 (8), 762-767. doi: 10.1016/j.ejim.2014.09.007

142. Lei, Z., Zheng, G., Jun-Song, Y., Yan-Feng, Y., Jean-François S., & Natalia de Isla (2017). Research progress in liver tissue engineering. *Biomed Mater Eng*, 28(s1), S113-S119. doi: 10.3233/BME-171632.

143. Lin, G., Bangaruaju, K., Geetha, N., Yingzhong, Z., Min, Z., Lili, A.,...Richard, P. (2016). Hyperhomocysteinemia-induced upper extremity deep vein thrombosis and pulmonary embolism in a patient with methyltetrahydrofolate reductase mutation: a case report and literature review. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 27 (6), 720-723.

144. Liwan Fu, Yuquan Wang & Yue-Qing Hu (2023). Association between homocysteine and nonalcoholic fatty liver disease: Mendelian randomisation study. *Eur J Clin Invest*, 53(3), e13895. doi: 10.1111/eci.13895.
145. Luo, X., Luo, Z., Zhang, Z., Yang, H., Lai, B., Yao, Q.,...Wang, N. (2016). Homocysteine upregulates hepcidin expression through BMPG / SMAD signaling pathway in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 471 (2), 303-308.
146. Luo, X., Xiao, L., Yang, H., Zhang, R., Jiang, M., Ni, S.,...Wang, N. (2014). Homocysteine downregulates gene expression of heme oxygenase-1 in hepatocytes. *Nutr Metab*, 11 (1), 55.
147. Lv, D., Wang, Z., Ji, S., Wang, X., & Hou, H. (2021). Plasma Levels of Homocysteine is Associated with Liver Fibrosis in Health Check-Up Population. *Int J Gen Med*, 14, 5175-5181. doi: 10.2147/IJGM.S329863.
148. Ma, H., Ning, J., Jin, X., Mao, C., Bu, X., Wang, M.,...Hu, Z. (2014). Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT) as a specific and sensitive blood marker for acute liver injury. *Biomarkers*, 19 (7), 578-584.
149. Maievskiy, O. Y., & Halahan, Y. V. (2023). Microscopic and histochemical changes in the liver of adult rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 29(1), 4-8. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(1\)-01](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(1)-01).
150. Malhi, H., & Kaufman, R. S. (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*, 54 (4), 795-809.
151. Mandaviya, P. R., Joenhanes, R., Aissi, D., Kuhnel, B., Marioni, R. E., Truong, V.,...Meurs, J. B. (2017). Genetically defined elevated homocysteine levels do not result in widespread changes of DNA methylation in leukocytes. *PLoS One*, 12(10): e0182472.
152. Mendes, R. H., Mostarda, C., Candido, G. O., Moraes-Silva, I. C., D'Almeida, V., Bello-Klein, A.,...Rigatto, K. (2014). Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. *Auton Neurosci*, 180, 43-47.

153. Michalopoulos, G. K. (2017). Hepatoblast: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*, 65 (4), 1384-1392.
154. Micol Alkabes, Stela Vujosevic, Andrea Muraca & Stefano De Cilla (2022). Paracentral acute middle maculopathy (PAMM) associated with ulcerative colitis and coexisting hyperhomocysteinemia: A case report. *Eur J Ophthalmol*, 32(1), NP139-NP143. doi: 10.1177/1120672120962042.
155. Miller, C. G., & Schmidt, E. E. (2019). Disulfide reductase systems in liver. *Br J Pharmacol*, 176 (4), 532-543.
156. Minami, S., Miura, K., Ishioka, M., Morimoto, N., Isoda, N., Yamamoto, H.,... Lijima, K. (2019). Homocysteine supplementation ameliorates steatohepatitis induced by a choline-deficient diet in mice. *Hepatol Res*, 49 (2), 189-200.
157. Miriam Gordillo, Todd Evans & Valerie Gouon-Evan (2015). Orchestrating liver development. *Development*, 142(12), 2094-108. Doi: 10.1242/dev.114215.
158. Miyajima, A., Tanaka, M. & Itoh, T. (2014). Stem / progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14 (5), 561-574.
159. Mohammadian, Z., Eidi, A., Mortazavi, P., Tavangar, M. M. & Asghari, A. (2015). Effects of folic acid on Dyslipidemia and serum homocysteine in a rat model of cholestasis and hepatic fibrosis. *Pol J Pathol*, 66 (1), 49-56.
160. Mudra, U. O., & Andreychyn, S. M. (2019). Endogenous intoxication, lipid peroxidation and the body's antioxidant system in gout patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Medical and Clinical Chemistry*, (3), 64–70.
161. Murray, T. V., Dong, X., Sawyer, G. J., Caldwell, A., Halket, J., Sherwood, R.,...Brewer, A. C. (2015). NADPH oxidase4 regulates homocysteine metabolism and protects against acetaminophen-induced liver damage in mice. *Free Radic Biol Med*, 89, 918-930.

162. Naime Çelik, Ayhan Vurmaz & Ahmet Kahraman (2017). Protective effect of quercetin on homocysteine-induced oxidative stress. *Nutrition*, 33, 291-296. doi: 10.1016/j.nut.2016.07.014.

163. Nechiporuk, V. M., Zaichko, N. V., Melnik, A. V., Strutynska, O. B. & Korda M. M. (2019). Особливості впливу гіпергомоцистеїнемії на метаболізм сірковмісних амінокислот у печінці щурів з різною функцією щитоподібної залози [Features of influence of hyperhomocysteinemia on the metabolism of sulfur-containing amino acids in the liver of rats with various functions of thyroid gland]. *Медична та клінічна хімія – Medical and clinical chemistry*, 21 (1), 103-112.

164. Nekrut, D. A., Zaichko, N. V., & Korol, A. P. (2017). Вплив гіполіпідемічних засобів на морфологічні зміни в печінці щурів за неалкогольної жирової хвороби печінки, асоційованої з гіпергомоцистеїнемією [Influence of hypolipidemic agents on morphological changes in the liver of the rats with nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperhomocysteinemia]. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, 28, 66-71.

165. Nekrut, D. O., Zaichko, N. V., & Strutynska, O. B. (2017). Рівень інсуліноподібного фактора росту-1 та гідроген сульфід у щурів з неалкогольною жировою хворобою печінки, асоційованою з гіпергомоцистеїнемією [Levels of insulin-like growth factor-1 and hydrogen sulfide in rats with nonalcoholic fatty liver disease associated with hyperhomocysteinemia]. *Медична та клінічна хімія – Medical and clinical chemistry*, 19 (1), 40-46.

166. Nicholas J Hunt, Sun Woo, Sophie Kang, Glen P Lockwood, David G Le Couteur & Victoria C Cogger (2019). Hallmarks of Aging in the Liver. *Comput Struct Biotechnol J*, 7;17, 1151-1161. doi: 10.1016/j.csbj.2019.07.021.

167. Pasana, T., Cazanave, S., Verdianelli, A., Patel, V., Min, H. K., Mirshahi, F.,...Sanyal, A. S. (2015). Dysregulated Hepatic Methionine Metabolism Drives Homocysteine Elevation in Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*, 10 (8): e0136822.

168. Park, J. W., Ro, M. J., Pyun, J. A., Nam, M., Bang, H., Yang, J. W.,...Kwack, K. (2014). MTHFR 1298A>C is a risk factor for autism spectrum disorder in the Korean population. *Psychiatry Res*, 215 (1), 258-259.
169. Pastore, A., Alisi, A., di Giovamberrardino, G., Crudele, A., Ceccarelli, S., Panera, N.,...Nobili, V. (2014). Plasma levels of homocysteine and cysteine increases in pediatric NAFLD and strongly correlated with severity of liver damage. *Int J Mol Sci*, 15 (11), 21202-21214.
170. Pengcheng Chen, Ze Yang, Lingyun Guo, Yingfei Huang, Jingjia Li & Xin Chen (2022). Effects of homocysteine on nonalcoholic fatty liver related disease: A mendelian randomization study. *Front Mol Biosci*, 9, 1083855. doi: 10.3389/fmolb.2022.1083855.
171. Perez-Miguelsauz, J., Vallecillo, N., Carrido, F., Reytor, E., Perez-Sala D. & Pajares, M. A. (2017). Betaine homocysteine S-methyltransferase emerges as a new player of the nuclear methionine cycle. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864 (7), 1165-1182.
172. Phillip Son & Lindsay Lewis (2023). Hyperhomocysteinemia. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL) (142)
173. Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D.,... Rautou, P. E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver disease. *J Hepatol*, 66 (1), 212-227.
174. Po-Ju Chen, Yueh-Chien Lu, Pei-Ming Wang, Chih-Fang Huang & Song-Seng Loke (2021). Factors associated with hyperhomocysteinemia in relatively healthy Taiwanese adults: A retrospective medical record study. *Medicine (Baltimore)*, 100(3), e23829. doi: 10.1097/MD.00000000000023829.
175. Qunhua, H., Hui, L., Mengyuan, J., Lin, W., Yulan, Z., Mangli, Z., ..., Lijun, Z. (2021). Age-related changes in metabolites in young donor livers and old recipient sera after liver transplantation from young to old rats. *Aging Cell*. 20(7). doi: 10.1111/acel.13425

176. Rajib Paul & Anupom Borah (2015). The potential physiological crosstalk and interrelationship between two sovereign endogenous amines, melatonin and homocysteine. *Life Sci*, 139, 97-107. doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.031.

177. Raksha, N., Halahan; Y., Guminsky; Y., & Maievskyi, O (2021). Disorders of proteolytic homeostasis in the liver of rats with hyperhomocysteinemia. *Biomedical Research and Therapy*, 8 (9), 4439-4446. <http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/682>.

178. Raksha, N., Halanova, T., Maievskyi, O., Dzevulska, I., Kaminsky, R., Yanchyshyn, A., ... Kovalchuk, O. (2022). Biochemical disorders in the thyroid gland in rats with hyperhomocysteinemia. *Biomedical Research and Therapy*, 9 (5), 5065-5074. doi: 10.15419/bmrat.v9i5.740.

179. Régis Guieu, Jean Ruf & Giovanna Mottola (2022). Hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases. *Ann Biol Clin*, 80(1), 7-14. doi: 10.1684/abc.2021.1694

180. Riberio, D. F., Cella, P. S., da Silva, L. E. C. M., Jordao, A. A. & Deminice, R. (2018). Acute exercise alters homocysteine plasma concentration in an intensity-dependent manner due increased methyl flux in liver of rats. *Life Sci*, 196, 63-68.

181. Romecin, P., Atucha, N. M., Navarro, E. G., Ortiz, M. C., Lyu, D. & Rosado, J. A. (2016). Role of homocysteine and folic acid on the altered calcium homeostasis of platelets from rats with biliary cirrhosis. *Platelets*, 7, 698-705.

182. Sathnur, P., Sourav, K. & Utpal, S. (2014). Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulfide. *Curr Med Chem*, 21 (32), 3662-3672.

183. Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *Int J Prev Med*, 4(6), 624–30

184. Shehab M Abd El-Kader & Eman M Salah El-Den Ashmawy (2015). Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol*, 7(6), 846–858.

185. Shuai, Y., Jie, C., Lintao, D., Ying, X., Yuhao S., & Xue L. (2022). Homocysteine, folate, and nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review with meta-analysis and Mendelian randomization investigation. *Am J Clin Nutr.* 116(6), 1595-1609. doi: 10.1093/ajcn/nqac285.
186. Skovierova, H., Vidomanova, E., Mahmood, S., Sopkova, J., Drgova, A., Cervenova, T.,...Lehotsky, J. (2016). The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int J Mol Sci*, 17 (10), 1733.
187. Smith, A. D., & Refsum, H. (2021). Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention. *J Intern Med*, 290 (4), 826-854. doi: 10.1111/joim.13279.
188. Sorensen, J. T., Gaustadnes, M., Stabler, S. P., Allen, R. H., Mudd, S. H., & Hvas, A. M. (2016). Molecular and biochemical investigations of patients with intermediate or severe hyperhomocysteinemia. *Mol Genet Metab*, 117 (3), 344-350.
189. Sreckovic, B., Sreckovic, V. D., Solatovic, I., Colak, E., Sumarac-Dumanovic, M., Janeski, H.,...Mrdovic, I. (2017). Homocysteine is a marker for metabolic syndrome and atherosclerosis. *Diabetes Metab Syndr*, 11 (3), 179-182.
190. Stojanovic, M., Scepanovic, L., Bosnic, O., Mitrovic, D., Jozana-Stankov, O., Scepanovic, V.,...Djuric, D. (2016). Effects of Acute Administration of D, L-Homocysteine Thiolactone on the Antioxidative Status of Rat. *Intestine and Liver Acta Veterinaria*, 66 (1), 26-36. doi:10.1515/acve-2016-0002
191. Taysi, S., Keles, M. S., Gumustekin, K., Akyuz, M., Boyuk, A., Cikman, O.,...Bakan, N. (2015). Plasma homocysteine and liver tissue S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine status in vitamin B6-deficient rats. *Eur Rev Med Pharmacol*, 19 (1), 154-160.
192. Timkova, V., Tatarkova, Z., Lehotsky, J., Recay, P., Dobrota, D. & Kaplan, P. (2016). Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress and protein expression in rat cardiac mitochondria. *Mol Cell Biochem*, 411(1-2), 261-270.

193. Toda, N., & Okamura, T. (2016). Hyperhomocysteinemia impairs regional blood flow: involvements of endothelial and neuronal nitric oxide. *Pflugers Arch*, 468(9), 1517-1525.
194. Tofler, G. H., Massaro, J., O'Donnell, C. J., Wilson, P. W. F., Vasani, R. S., Sutherland, P. A.,...D'Agostino, R. B. S. (2016). Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. *Thromb Res*, 140, 30-35.
195. Touda, F., Akhvlediani, M., Vorobiova, E., Tsvitvadze G. & Baramidze, A. (2017). Homocysteine and D-dimer levels and multilayer computer tomography for diagnosing pulmonary artery thromboembolism. *Vessel Plus*, 1, 38-42.
196. Trefts E, Gannon M & Wasserman D. (2017). The liver. *Curr Biol*, 6(27(21), R1147–51. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
197. Tripathi, M., Zhang, C. W., Singh, B. K., Sinha, R. A., Moe, K. T., DeSilva, D. F.,...Yen, P. M. (2016). Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by vitamin B supplementation. *Cell death and disease*, 7(12), 1-14.
198. Tsuchiya, H., da Costa, K. A., Lee, S., Renga, B., Jaeschke, H., Yang, Z.,...Wang, L. (2015). Interactions Between Nuclear Receptor SHP and FOXA1 Maintain Oscillatory Homocysteine Homeostasis in Mice. *Gastroenterology*, 148 (5), 1012-1023.
199. Tung, H. C., Hsu, S. S., Tsai, M. H., Lin, T. Y., Hsin, I. F., Huo, T. I.,...Lee, S. D. (2017). Homocysteine deteriorates intrahepatic derangement and portal-systemic collaterals in cirrhotic rats. *Clin Sci (Lond)*, 131 (1), 69-86.
200. Ventura, P., Venturelli, G., Marcacci, M., Fiorini, M., Marchini, S., Cuoghi, C.,...Pietranselo, A. (2016). Hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T, polymorphism in patients with portal vein thrombosis complicating liver cirrhosis. *Thromb Res*, 141, 189-195.

201. Vitvitsky, V., Mosharov, E., Tritt, M., Ataulakhanov, F. & Banerjee, R. (2013). Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep*, 8 (1), 57-63.
202. Wang, H., Sun, Q., Zhou, Y., Zhang, H., Luo, C., Xu, J.,...Wang, W. (2017). Nitration-mediated deficiency of cystathione β -synthase activity accelerates the progression of hyperhomocysteinemia. *Free Radic Biol Med*, 113, 519-529.
203. Wang, R., Wang, Y., Mu, N., Lou, X., Li, W., Chen, Y.,...Tan H. (2017). Activation of NLRP3 inflammasomes contributes to hyperhomocysteinemia – aggravated inflammation and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Lab Invest*, 97 (8), 922-934.
204. Wang, Y., Liu, J., Jiang, Y., Zhang, H. & Wang, G. (2016). Hyperhomocysteinemia is associated with decreased apolipoprotein AI levels in normal healthy people. *BMC Cardiovasc Disord*, 16, 10.
205. Won, B. Y., Park, K. C., Lee, S. H., Kim, M. J., Park, K. S.,...Park, K. H. (2016). Sex Difference in the Association between Serum Homocysteine level and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Korean J Fam Med*, 37 (4), 242-247.
206. Wong Y, Golledge J, Flicker L, McCaul K, Hankey G, Bockxmeer F,... Norman P. (2013). Plasma total homocysteine is associated with abdominal aortic aneurysm and aortic diameter in older men. *J Vasc Surg*, 58, 364–370.
207. Xi, M., Zhang, Y., Xu, Y., Yang, W. Y., Jiang, X., Sha, X.,...Yang, X. (2016). Caspase-1 inflammasomes activation mediates homocysteine-induced pyrop-apoptosis in endothelial cells. *Research*, 118(10), 1525-1539.
208. Xiaowen Huang, Qinglin Zhao, Dankang Li, Bingnan Ren, Limin Yue, Fengxian Shi, ...Weidong Zhang (2020). Association between gene promoter methylation of the one-carbon metabolism pathway and serum folate among patients with hyperhomocysteinemia. *Eur J Clin Nutr*, 74(12), 1677-1684. doi: 10.1038/s41430-020-0657-9.
209. Yan Liang, Kota Kaneko, Bing Xin, Jin Lee, Xin Sun, Kun Zhang,... Gen-Sheng Feng (2022). Temporal analyses of postnatal liver development and

maturation by single-cell transcriptomics. *Dev Cell*, 57(3), 398-414.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2022.01.004.

210. Yang, A., Jiao, Y., Yang, S., Deng, M., Yang, X., Mao, C.,...Jiang, Y. (2018). Homocysteine activates autophagy by inhibition of CFTR expression via interaction between DNA methylation and H3K27me3 in mouse liver. *Cell Death and Disease*, 9 (2), 169. doi:10.1038/s41419-017-0216-z

211. Yang, F., Qi, X., Gao, Z., Yang, X., Zheng, X., Duan, C.,...Zheng, J. (2016). Homocysteine injures endothelial cells by inhibiting mitochondrial activity. *Exp Ther Med*, 12 (4), 2247-2252.

212. Yang, X., Xu, H., Hao, Y., Zhoo, L., Cai, X., Tian, J.,...Jiang, Y. (2014). Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 α mediates hepatic endoplasmic reticulum stress in homocysteine-induced atherosclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 46 (10), 902-910.

213. Yanping Li, Tianyi Huang, Yan Zheng, Tauland Muka, Jenna Troup & Frank B Hu (2016). Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc*, 5(8), e003768. doi: 10.1161/JAHA.116.003768.

214. Yasutake Tanaka, Michio Kawano, Sawako Nakashima, Chisato Yamaguchi, Makoto Asahina, Mai Sakamoto,...Masao Sato (2023). Mutation in Smek2 regulating hepatic glucose metabolism causes hypersarcosinemia and hyperhomocysteinemia in rats. *Sci Rep*, 13(1), 3053. doi: 10.1038/s41598-022-26115-z.

215. Yuan Cao, Ke Zhou, Wei Diao, Xipeng Long, Fangfang Tian, Minggang Su,...Zhiyun Jia Quant (2021). Age-related changes of standardized uptake values in the blood pool and liver: a decade-long retrospective study of the outcomes of 2,526 subjects. *Imaging Med Surg*, 11(1), 95-106. doi: 10.21037/qims-20-35.

216. Yvo M Smulders & Martin den Heijer (2013). [Homocysteine levels: measure or not?]. *Henk J Blom Ned Tijdschr Geneeskd*, 157(44), A6265.

217. Zanic, B. L., Obradovic, M., Bajic, V., Haidara, M. A., Jovanovic, M. & Isenovic, E. R. (2018). Homocysteine and Hyperhomocysteinemia. *Curr Med Chem*, doi: 10.2174/092986732666180313105949.
218. Zbidi, H., Redondo, P. C., Lopez, J. J., Bartegi, A., Salido, G. M., Rosado, J. A. (2010). Homocysteine induces caspase activation by endoplasmic reticulum stress in platelets from 2 diabetics and healthy donors. *Thromb Haemost*, 103 (5), 1022-1032.
219. Zhang, B., Dong, J. L., Chen, Y. L., Liu, Y., Huang, S. S., Zhong, X. L.,...Wang, Z. G. (2017). Nrf2 mediates the protective effects of homocysteine by increasing the levels of GSH content in Hep G2 cells. *Mol Med Rep*, 16 (1), 597-602.
220. Zhiyuan Wu, Haiping Zhang, Zhiwei Li, Haibin Li, Xinlei Miao, Huiying Pan,...Xiuhua Guo (2022). Mutual effect of homocysteine and uric acid on arterial stiffness and cardiovascular risk in the context of predictive, preventive, and personalized medicine. *EPMA J*, 13(4), 581-595. doi: 10.1007/s13167-022-00298-x.

ДОДАТКИ

Додаток А

НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Halahan, Y. (2020). Submicroscopic changes in the liver of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 26(1), 19-23. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26\(1\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26(1)-03).
2. Raksha, N., Halahan; Y., Guminskyi; Y., & Maievskyi, O (2021). Disorders of proteolytic homeostasis in the liver of rats with hyperhomocysteinemia. *Biomedical Research and Therapy*, 8(9), 4439-4446. (*Web of Science*) <http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/682>.
3. Maievskyi, O. Y., & Halahan, Y. V. (2023). Microscopic and histochemical changes in the liver of adult rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 29(1), 4-8. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(1\)-01](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(1)-01).
4. Halahan, Y. V. (2023). Histological and histochemical changes in liver tissue of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 27(1), 6-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-01](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-01).

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

5. Галаган Ю. В. (2023). *Особливості гістологічних змін тканини печінки старих щурів при змодельованій гіпергомоцистеїнемії*. Збірник тез доповідей 92-а науково-практичної конференції студентів та молодих вчених

із міжнародною участю «Інновації в медицині та фармації» (стор. 198). Івано-Франківськ.

6. Галаган Ю. В. (2023). *Електронно-мікроскопічні зміни в печінці щурів віком 1-2 місяці за умов гіпергомоцистеїнемії*. Збірник матеріалів Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (III Жутаєвські читання) (стор. 18). Полтава.

7. Галаган Ю. В. (2023). *Порівняння особливостей структурних змін печінки молодих та зрілих тварин за умов гіпергомоцистеїнемії*. Збірник тез наукових робіт учасників XX Наукової конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку – 2023» (стор. 591). Вінниця.

8. Галаган Ю. В. (2023). *Features of histological changes in liver tissue of old rats with simulated hyperhomocysteinemia*. Збірник матеріалів науково-практичної конференції «Формування науки: стан і перспективи розвитку в умовах сьогодення» (стор. 76). Київ.

9. Галаган Ю. В. (2023). *Порушення протеолітичного гомеостазу у печінці щурів з моделлю гіпергомоцистеїнемії*. Збірник тез доповідей XIX Наукової конференції “Львівські хімічні читання – 2023” (стор. 198). Львів.

НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ДОДАТКОВО ВІДОБРАЖАЮТЬ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

10. Halahan, Y. V., Maievskyi, O. Y., Guminskyi, Y. Y., & Korol, A. P. (2019). The effect of hyperhomocysteinemia on the patterns of electron microscopic changes in the liver of adult rats. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (36), 16-21. <https://doi.org/10.31393/bba36-2019-03>.

11. Halahan, Y. V., Maievskyi, O. Y., Guminskyi, Y. Y., Korol, A. P., & Prokopenko, S. V. (2019). Features of electron microscopic changes in the liver of rats aged 24-26 months under conditions of hyperhomocysteinemia. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (37), 60-65. <https://doi.org/10.31393/bba37-2019-10>.

Апробація результатів дисертації:

- XX науковій конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Перший крок в науку-2023» (м. Вінниця, 2023) – стендова доповідь.
- Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Морфогенез та регенерація» (III Жутаєвські читання) (м. Полтава, 2023) – стендова доповідь.
- XIX Науковій конференції “Львівські хімічні читання – 2023” (м. Львів, 2023) – стендова доповідь.

Додаток Б1

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор закладу вищої освіти
з наукової роботиВінницького національного
медичного університету

ім. М.І. Пирогова

проф. Власенко О.В.

2023 року



А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

Назва роботи: “Структурні зміни печінки щурів різного віку на тлі гіпергомоцистеїнемії (експериментальне дослідження)”.

1. Автор: Галаган Юлія Василівна, асистент кафедри гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: При гістологічному дослідженні вперше встановлено, що на тлі гіпергомоцистеїнемії в печінці молодих щурів спостерігається незначне потовщення навколочасточкової сполучної тканини, в більшості клітин вакуольно-гідропічна та жирова дистрофія, зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену в гепатоцитах, їх нерівномірна локалізація в часточках печінки; у дорослих тварин – помітне потовщення волокнистої сполучної тканини навколо часточок та в складі порталних трактів, дисконплектація печінкових балок, осередки некрозу паренхіми печінки, гіпертрофія та гіперплазія гладких міоцитів середньої оболонки та фіброз зовнішньої оболонки стінки міжчасточкових артерій, лейкоцитарна інфільтрація порталних трактів, значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену; у щурів старшого віку – фіброз печінки, зростання вмісту колагенових волокон в перисинусоїдальних просторах та просторах між гепатоцитами, у цитоплазмі клітин виражена жирова дистрофія, збільшення осередків некрозу гепатоцитів, значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену.

3. Актуальність дослідження: Хронічні захворювання гепатобіліарної системи є надзвичайно поширеними в світі. Патологічні зміни в будові та функціях печінки діагностують у понад 2 мільярдів людей, при цьому смертність від зазначених захворювань за останні 20 років збільшилася вдвічі. Проблема хронічних дифузних захворювань печінки на сьогодні є однією з найбільш важливих в сучасній гастроентерології і визначається насамперед тяжкістю прогнозу, складністю діагностики та лікування, має загальномедичне і соціальне значення.

Серед основних причин хронічних захворювань гепатобіліарної системи в Україні найбільш частими є неалкогольна жирова хвороба печінки, цироз печінки, гепатоцелюлярна карцинома та вірусні гепатити. Неалкогольна жирова хвороба печінки зустрічається у всіх вікових групах і становить 14 – 30% від загальної популяції. У деяких країнах неалкогольна жирова хвороба печінки трапляється у третини дорослого насе-

лення. Дане захворювання асоціюється з ожирінням та інсулінорезистентністю, вважається печінковим проявом метаболічного синдрому, часто поєднується із цукровим діабетом 2 типу та гіпертонічною хворобою. Неалкогольна жирова хвороба печінки охоплює спектр станів від доброякісного гепатоцелюлярного стеатозу до запального неалкогольного стеатогепатиту, фіброзу та цирозу. Більшість гепатоцелюлярних ліпідів накопичуються у вигляді тригліцеридів, але присутні й інші ліпідні метаболіти, такі як вільні жирні кислоти, холестерин та фосфоліпіди, що можуть грати роль у прогресуванні даного захворювання.

Не дивлячись на значні досягнення сучасної науки у вивченні ролі гіпергомоцистеїнемії в патогенезі багатьох захворювань внутрішніх органів, на сьогоднішній день відкритим залишається питання щодо морфологічних змін структури печінки. Таким чином, вивчення особливостей структурної організації печінки є надзвичайно актуальним завданням, оскільки дає змогу визначити патогенетичні механізми розвитку захворювань, удосконалити методи їх діагностики та адекватного лікування.

4. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова.

5. Джерела інформації: Maievskiy, O. Y., & Halahan, Y. V. (2023). Microscopic and histochemical changes in the liver of adult rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 29(1), 4-8. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(1\)-01](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(1)-01).

Halahan, Y. V. (2023). Histological and histochemical changes in liver tissue of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 27(1), 6-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-01](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-01).

6. Ким і коли впроваджено: кафедра гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

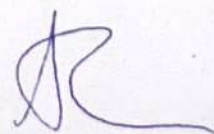
Початок впровадження: травень 2023 р.

Протокол засідання кафедри № 12 від 17 травня 2023р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри гістології
Вінницького національного
медичного університету ім. М.І. Пирогова
к.мед.н., доцент



Анатолій КОРОЛЬ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор закладу вищої освіти з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України
проф. Кліщ І.М.

Квітня 2023 року



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: “Структурні зміни печінки щурів різного віку на тлі гіпергомоцистеїнемії (експериментальне дослідження)”.

1. Автор: Галаган Юлія Василівна, асистент кафедри гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: Вперше на ультрамікроскопічному рівні встановлено, що структурні зміни печінки у молодих щурів за умов гіпергомоцистеїнемії проявляються просвітленням матриксу мітохондрій гепатоцитів, збільшенням кількості та розміру крапель жиру, розширенням просвітів жовчних каналців та перисуносоїдних просторів, проліферацією жиронакопичувальних клітин, набряклістю цитоплазми ендотеліоцитів в стінках синусоїдів, сладжами еритроцитів і тромбоцитів, які контактують з ендотеліоцитами; у дорослих тварин ультраструктурні зміни в гепатоцитах, ендотеліоцитах стінок синусоїдів, зірчастих макрофагоцитах мали дистрофічний та деструктивний характер, спостерігалась трансформація жиронакопичувальних клітин в фібробласти; у старих щурів – деструкція мітохондрій в ендотелії судин, деструкція та гіпертрофія органел, посилення адгезії тромбоцитів, еритроцитів та лейкоцитів, сладжі еритроцитів в просвітах синусоїдів, зростання чисельності зірчастих макрофагоцитів і посилення їх міграції в пересинусоїдні простори, зменшення кількості жиронакопичувальних клітин і, відповідно, розростання колагенових волокон, розширення пересинусоїдних просторів та потовщення бар’єру між кров’ю і гепатоцитами, порушення транспорту речовин, гіпоксії, гідропічна та жирова дистрофія гепатоцитів.

3. Актуальність дослідження: Хронічні захворювання гепатобіліарної системи є надзвичайно поширеними в світі. Патологічні зміни в будові та функціях печінки діагностують у понад 2 мільярдів людей, при цьому смертність від зазначених захворювань за останні 20 років збільшилася вдвічі. Проблема хронічних дифузних захворювань печінки на сьогодні є однією з найбільш важливих в сучасній гастроентерології і визначається насамперед тяжкістю прогнозу, складністю діагностики та лікування, має загальномедичне і соціальне значення.

Серед основних причин хронічних захворювань гепатобіліарної системи в Україні найбільш частими є неалкогольна жирова хвороба печінки, цироз печінки, гепатоцелюлярна карцинома та вірусні гепатити. Неалкогольна жирова хвороба печінки зустрічається у всіх вікових групах і становить 14 – 30% від загальної популяції. У деяких країнах неалкогольна жирова хвороба печінки трапляється у третини дорослого населення. Дане захворювання асоціюється з ожирінням та інсулінорезистентністю, вважається печінковим проявом метаболічного синдрому, часто поєднується із цукровим діабетом 2 типу та гіпертонічною хворобою. Неалкогольна жирова хвороба печінки охоплює спектр станів від доброякісного гепатоцелюлярного стеатозу до запального неалкогольного стеатогепатиту, фіброзу та цирозу. Більшість гепатоцелюлярних ліпідів накопичуються у вигляді тригліцеридів, але присутні й інші ліпідні метаболіти, такі як

вільні жирні кислоти, холестерин та фосфоліпіди, що можуть грати роль у прогресуванні даного захворювання.

Не дивлячись на значні досягнення сучасної науки у вивченні ролі гіпергомоцистеїнемії в патогенезі багатьох захворювань внутрішніх органів, на сьогоднішній день відкритим залишається питання щодо морфологічних змін структури печінки. Таким чином, вивчення особливостей структурної організації печінки є надзвичайно актуальним завданням, оскільки дає змогу визначити патогенетичні механізми розвитку захворювань, удосконалити методи їх діагностики та адекватного лікування.

4. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова.

5. Джерела інформації:

Halahan, Y. V., Maievskiy, O. Y., Guminskyi, Y. Y., & Korol, A. P. (2019). The effect of hyperhomocysteinemia on the patterns of electron microscopic changes in the liver of adult rats. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (36), 16-21. <https://doi.org/10.31393/bba36-2019-03>.

Halahan, Y. V., Maievskiy, O. Y., Guminskyi, Y. Y., Korol, A. P., & Prokopenko, S. V. (2019). Features of electron microscopic changes in the liver of rats aged 24-26 months under conditions of hyperhomocysteinemia. *Biomedical and Biosocial Anthropology*, (37), 60-65. <https://doi.org/10.31393/bba37-2019-10>.

Halahan, Y. (2020). Submicroscopic changes in the liver of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 26(1), 19-23. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26\(1\)-03](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2020-26(1)-03).

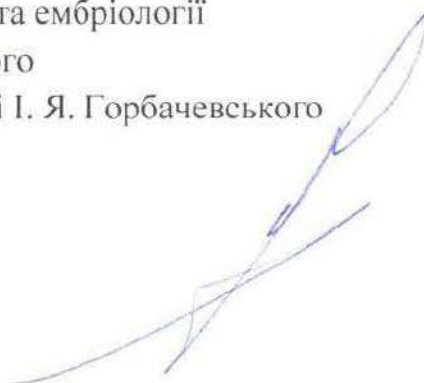
6. Ким і коли впроваджено: кафедра гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського

Протокол засідання кафедри № 4 від 14 квітня 2023р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри гістології та ембріології
Тернопільського національного
медичного університету імені І. Я. Горбачевського
МОЗ України
д.біол.н., професор



Зоя НЕБЕСНА

«Затверджую»

Директор ННЦ

«Інститут біології та медицини»

Київського національного

університету імені Тараса Шевченка

Остапченко Л.І.



А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

Назва роботи: “Структурні зміни печінки щурів різного віку на тлі гіпергомоцистеїнемії (експериментальне дослідження)”.

1. Автор: Галаган Юлія Василівна, асистент кафедри гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: При біохімічному дослідженні зразків крові та гомогенатів печінки щурів різного віку за умов гіпергомоцистеїнемії вперше доведено зростання загальної протеолітичної активності у даному органі тварин всіх експериментальних груп, підвищення активності метало-залежних ферментів, накопичення низькомолекулярних білків та зниження частки білків з молекулярною масою понад 50 кДа, зростання рівня деяких матриксних металопротеїназ, зокрема ММП-1, ММП-2 і ММП-3.

3. Актуальність дослідження: Хронічні захворювання гепатобіліарної системи є надзвичайно поширеними в світі. Проблема хронічних дифузних захворювань печінки на сьогодні є однією з найбільш важливих в сучасній гастроентерології і визначається насамперед тяжкістю прогнозу, складністю діагностики та лікування, має загальномедичне і соціальне значення.

Серед основних причин хронічних захворювань гепатобіліарної системи в Україні найбільш частими є неалкогольна жирова хвороба печінки, цироз печінки, гепатоцелюлярна карцинома та вірусні гепатити. У деяких країнах неалкогольна жирова хвороба печінки трапляється у третини дорослого населення. Дане захворювання асоціюється з ожирінням та інсулінорезистентністю, вважається печінковим проявом метаболічного синдрому, часто поєднується із цукровим діабетом 2 типу та гіпертонічною хворобою. Неалкогольна жирова хвороба печінки охоплює спектр станів від доброякісного гепатоцелюлярного стеатозу до запального неалкогольного стеатогепатиту, фіброзу та цирозу. Більшість гепатоцелюлярних ліпідів накопичуються у вигляді тригліцеридів, але присутні й інші ліпідні метаболіти, такі як вільні жирні кислоти, холестерин та фосфоліпіди, що можуть грати роль у прогресуванні даного захворювання.

Таким чином, вивчення особливостей структурної організації печінки є надзвичайно актуальним завданням, оскільки дає змогу визначити патогенетичні

механізми розвитку захворювань, удосконалити методи їх діагностики та адекватного лікування.

4. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова.

5. Джерела інформації:

Raksha, N., Halahan; Y., Guminskyi; Y., & Maievskyi, O (2021). Disorders of proteolytic homeostasis in the liver of rats with hyperhomocysteinemia. *Biomedical Research and Therapy*, 8(9), 4439-4446. (*Web of Science*)
<http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/682>.

6. Ким і коли впроваджено: кафедра біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Початок впровадження: _____ 2023 р.

Протокол засідання кафедри №__ від _____ 2023р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
д.біол.н., професор



О. М. Савчук

ЗАТВЕРДЖУЮ



Перший проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи
Полтавського державного
медичного університету

проф. Дворник В. М.
18 квітня 2023 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Назва роботи: “Структурні зміни печінки щурів різного віку на тлі гіпергомоцистемії (експериментальне дослідження)”.

1. Автор: Галаган Юлія Василівна, асистент кафедри гістології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

2. Пропозиція до впровадження: При гістологічному дослідженні вперше встановлено, що на тлі гіпергомоцистемії в печінці молодих щурів спостерігається незначне потовщення навколочасточкової сполучної тканини, в більшості клітин вакуольно-гідропічна та жирова дистрофія, зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену в гепатоцитах, їх нерівномірна локалізація в часточках печінки; у дорослих тварин – помітне потовщення волокнистої сполучної тканини навколо часточок та в складі портальних трактів, дисконплектація печінкових балок, осередки некрозу паренхіми печінки, гіпертрофія та гіперплазія гладких міоцитів середньої оболонки та фіброз зовнішньої оболонки стінки міжчасточкових артерій, лейкоцитарна інфільтрація портальних трактів, значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену; у щурів старого віку – фіброз печінки, зростання вмісту колагенових волокон в перисинусоїдальних просторах та просторах між гепатоцитами, у цитоплазмі клітин виражена жирова дистрофія, збільшення осередків некрозу гепатоцитів, значне зниження активності сукцинатдегідрогенази та вмісту глікогену.

3. Актуальність дослідження: Хронічні захворювання гепатобіліарної системи є надзвичайно поширеними в світі. Патологічні зміни в будові та функціях печінки діагностують у понад 2 мільярдів людей, при цьому смертність від зазначених захворювань за останні 20 років збільшилася вдвічі. Проблема хронічних дифузних захворювань печінки на сьогодні є однією з найбільш важливих в сучасній гастроентерології і визначається насамперед тяжкістю прогнозу, складністю діагностики та лікування, має загальномедичне і соціальне значення.

Серед основних причин хронічних захворювань гепатобіліарної системи в Україні найбільш частими є неалкогольна жирова хвороба печінки, цироз печінки, гепатоцелюлярна карцинома та вірусні гепатити. Неалкогольна жирова хвороба печінки зустрічається у всіх вікових групах і становить 14 – 30% від загальної популяції. У деяких країнах неалкогольна жирова хвороба печінки трапляється у третини дорослого населення. Дане захворювання асоціюється з ожирінням та інсулінорезистентністю, вважається печінковим проявом метаболічного синдрому, часто поєднується із цукровим діабетом 2 типу та гіпертонічною хворобою. Неалкогольна жирова хвороба печінки охо-

плює спектр станів від доброякісного гепатоцелюлярного стеатозу до запального неалкогольного стеатогепатиту, фіброзу та цирозу. Більшість гепатоцелюлярних ліпідів накопичуються у вигляді тригліцеридів, але присутні й інші ліпідні метаболіти, такі як вільні жирні кислоти, холестерин та фосфоліпіди, що можуть грати роль у прогресуванні даного захворювання.

Не дивлячись на значні досягнення сучасної науки у вивченні ролі гіпергомоцистеїнемії в патогенезі багатьох захворювань внутрішніх органів, на сьогоднішній день відкритим залишається питання щодо морфологічних змін структури печінки. Таким чином, вивчення особливостей структурної організації печінки є надзвичайно актуальним завданням, оскільки дає змогу визначити патогенетичні механізми розвитку захворювань, удосконалити методи їх діагностики та адекватного лікування.

4. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова.

5. Джерела інформації: Maievskyi, O. Y., & Halahan, Y. V. (2023). Microscopic and histochemical changes in the liver of adult rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Morphology*, 29(1), 4-8. [https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29\(1\)-01](https://doi.org/10.31393/morphology-journal-2023-29(1)-01).

Halahan, Y. V. (2023). Histological and histochemical changes in liver tissue of young rats with hyperhomocysteinemia. *Reports of Vinnytsia National Medical University*, 27(1), 6-9. [https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27\(1\)-01](https://doi.org/https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-01).

6. Ким і коли впроваджено: кафедра гістології, цитології та ембріології Полтавського державного медичного університету

Початок впровадження: квітень 2023 р.

Протокол засідання кафедри № 18 від 18.04. 2023р.

7. Форма впровадження: результати дослідження впроваджено у навчальний процес та лекційний курс.

8. Соціально-економічний ефект: покращення підготовки молодих спеціалістів.

Завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології
Полтавського державного
медичного університету,
д.мед.н., професор



Володимир ШЕПІТЬКО