



Степанов Ю.М., Діденко В.І., Кленіна І.А., Карачинова В.А., Ошмянська Н.Ю.
ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», м. Дніпро, Україна

Спектр жирних кислот сироватки крові пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки залежно від етіології та морфологічних особливостей

For cite: *Gastroenterologia*. 2018;52(3):127-134. doi: 10.22141/2308-2097.52.3.2018.141841

Резюме. У статті подано морфологічні особливості (за даними гістологічних методів дослідження, методу напівтонких зрізів та комп'ютерної морфометрії) розвитку та прогресування хронічних дифузних захворювань печінки, хронічного гепатиту, асоційованого з вірусом С, та алкогольної хвороби печінки. Показано, що залежно від етіологічного фактора важлива відмінність була виявлена за характером, ступенем стеатозу та локалізацією ліпідних крапель, що свідчить про розбіжність деяких біохімічних механізмів накопичення ліпідів у гепатоцитах. Розглянуто роль вільних жирних кислот сироватки крові при даних захворюваннях, виявлено підвищення їх вмісту у сироватці крові, встановлено дефіцит деяких фракцій, що може бути однією з причин формування неалкогольної жирової хвороби печінки та інших захворювань, пов'язаних з обміном речовин. Маркером запальних процесів можна вважати ленолеву (С18:3) й арахідонову (С20:0) вільні жирні кислоти. Запропоновано індекси співвідношення жирних кислот, що дозволяють охарактеризувати та встановити метаболічні шляхи розвитку та прогресування захворювання, що відіграє важливу роль у диференційованому підході при встановленні нозологічних форм захворювань печінки.

Ключові слова: неалкогольна жирова хвороба печінки; алкогольний стеатогепатит; стеатоз печінки; хронічний гепатит С; газова хроматографія; вільні жирні кислоти; поліненасичені жирні кислоти

Вступ

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

Уже доведено, що порушення синтезу та утилізації вільних жирних кислот виступає однією з причин формування ХДЗП та інших захворювань печінки, пов'язаних із порушенням обміну ліпідів.

Дослідження на тваринах та клінічні спостереження підтверджують концепцію, згідно з якою пошкодження гепатоцитів, характерне для ХДЗП, обумовлюється надлишком первинних метаболічних субстратів (глюкози, фруктози та жирних кислот) у печінці, внаслідок чого жирні кислоти впливають на біохімічні шляхи, що призводить до пошкодження клітин [6, 7]. Різні аспекти цих шляхів, що ведуть до стеатогепатиту, потенційно варіюватимуть у пацієнтів залежно від етіології захворювання, наявності ожиріння або діабету, але в результаті однаково призведуть до ускладнень [8].

До 25 % усіх випадків хронічних захворювань печінки пов'язані з уживанням алкоголю. ХДЗП як

алкогольного, так і неалкогольного генезу характеризується підвищенням відкладення тригліцеридів у гепатоцитах унаслідок надлишкового накопичення вільних жирних кислот (ВЖК) у печінці і/або їх посиленого синтезу органом з ацетилкоензиму А (ацетил-КоА), особливо при недостатності останнього. Продукція тригліцеридів у гепатоциті прямо залежить від умісту в ньому жирних кислот, ацетил-КоА та глюкози, що в процесі гліколізу перетворюється у фосфатидну кислоту, яка запускає синтез тригліцеридів. У міру накопичення жиру гепатоцити стають більш чутливими до токсичного впливу та втрачають свої функціональні властивості [10]. Головну роль у накопиченні жиру в гепатоциті на тлі споживання алкоголю відіграє ацетальдегід — основний токсичний продукт метаболізму етанолу. У процесі окиснення етанолу відмічається підвищене використання коферменту НАД⁺, який, приєднуючи протон, відновлюється до НАДН⁺. Підвищення відновленої форми НАДН⁺ при систематичному вживанні алкоголю знижує активність основних ферментів ліпоксигеназного шляху, які забезпечують транспорт жирних кислот у мітохондрії, зменшує їх внутрішньомітохондріальне окиснення, що призводить до вираженого порушення метаболізму жирів, накопичення в клітинах печінки тригліцеридів та розвитку стеатозу [9, 10].

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

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

Жирнокислотний склад сироватки крові пацієнтів зі стеатозом характеризується зниженням загального вмісту ВЖК за рахунок дефіциту ненасичених жирних кислот. У сукупності з морфологічними методами досліджень використання довголанцюгових ВЖК для діагностування захворювань, пов'язаних із порушенням структури, функцій та в'язкості гепатоцитів, відкриває можливість для розкриття патогенезу ХДЗП із метою підвищення диференціальної діагностики та ефективності лікування виявлених порушень [12].

Мета роботи — оцінка вільних жирних кислот у сироватці крові пацієнтів із ХДЗП залежно від його етіології та морфологічних особливостей, визначення ролі цих змін у прогресуванні патології печінки.

Матеріали та методи

Обстежені 66 пацієнтів із ХДЗП, середній вік (59,2 ± 2,4) року. Усі обстежені хворі були розподілені на групи залежно від етіологічних факторів при формуванні та прогресуванні стеатозу та фіброзу печінки: I — неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП, n = 38); II — хронічний гепатит, асоційований з вірусом С (ХГС) (n = 13); III — алкогольна хвороба печінки (АХП, n = 15). Серед обстежених пацієнтів жінок було 46 %, а чоловіків — 54 %.

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

Для проведення комп'ютерної морфометрії біоптати фотографували і здійснювали вимірювання за допомогою програми ImageJ 1.45S (розроблена в National Institutes of Health, США). Комп'ютерний індекс фіброзу — це отримане на цифровому зображенні співвідношення площі колагену до загальної площі біоптату. Напівтонкі зрізи отримували за допомогою ультратому УМТП-7 із використанням скляних ножів. Гістологічні зрізи товщиною 1 мкм забарвлювали толудіновим синім. Дослідження напівтонких зрізів проводили методом світлової мікроскопії високої роздільної здатності (імерсійне масло, об'єктив x100). Отримані дані доповнювали інформаційну картину при вивченні парафінових зрізів.

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

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

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

КОН-метильовання ліпідів у біологічних субстратах, які містять воду (сироватка крові, гомогенат тощо). До 0,14 мл проби додавали 2 мл гексану (30 °С) і 0,28 мл КОН (1 М в 70% метанолі, 30 °С), пробірки перемішували впродовж 2,5 хв і витримували на водяній бані при

30 °С впродовж 20 хв, періодично помішуючи. Реакцію зупиняли 0,03 мл оцтової кислоти. Метильовані жирні кислоти, які знаходилися в гексановому шарі, аналізувалися на газовому хроматографі. При малій кількості проби до 28 мкл додавали 0,5 мл гексану і 56 мкл КОН (1 М в 70% метанолі, 30 °С) і проводили всі процедури, описані вище [14]. Групу контролю становили відносно здорові особи (n = 7).

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

Результати та обговорення

Морфологічна картина в I групі пацієнтів являла собою осередки великокрапельної жирової дистрофії на тлі відсутності фіброзу або тонких фіброзних септ та незначного накопичення клітин запалення. Для II групи пацієнтів були характерні найбільш виражені показники запалення та активності гепатиту: інфільтрація портальних трактів від помірної до вираженої, інтрачасточкова інфільтрація, вогнища некрозу гепатоцитів, збільшення кількості лімфоїдних фолікулів та жирова дистрофія, яка найчастіше супроводжувала помірне фіброзування та в більшості випадків являла собою осередки дрібнокрапельного або змішаного стеатозу, що розташовані в середині часточок і не зачіпають прикордонну пластинку. Морфологічна картина в III групі пацієнтів характеризувалась в першу чергу значною дезорганізацією ліпідних включень та поміт-

ними змінами гістологічної структури як за рахунок запалення, так гідропічної дистрофії гепатоцитів (рис. 1).

При біохімічному дослідженні спектра ВЖК у сироватці крові пацієнтів із ХДЗП нами було ідентифіковано більше 20 фракцій, серед яких такі основні насичені жирні кислоти: міристинова С14:0, пентодеканова С15:0, пальмітинова С16:0, стеаринова С18:0, такі основні ненасичені жирні кислоти: олеїнова С18:1, лінолева С18:3, арахідонова С20:4 (табл. 1).

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

Для пацієнтів з I та II групи було характерним вірогідне підвищення вмісту найбільш токсичної фракції — пальмітинової (С16:0) відповідно на 22,2 % ($p < 0,05$) та на 20,8 % ($p < 0,05$) щодо контролю (табл. 1). При цьому більшість морфологічних показників, пов'язаних із запаленням, були найменш вираженими в I групі пацієнтів (рис. 2А).

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

Із чим же в такому випадку пов'язане збільшення токсичної фракції? На нашу думку, таке збільшення може пояснюватися в тому числі й поширеною гідропічною дистрофією гепатоцитів, що зустрічалася в цій групі пацієнтів частіше за інші — у 54,5 % випадків порівняно з 18,75 % випадків в II групі та 25,0 % випадків в III групі.

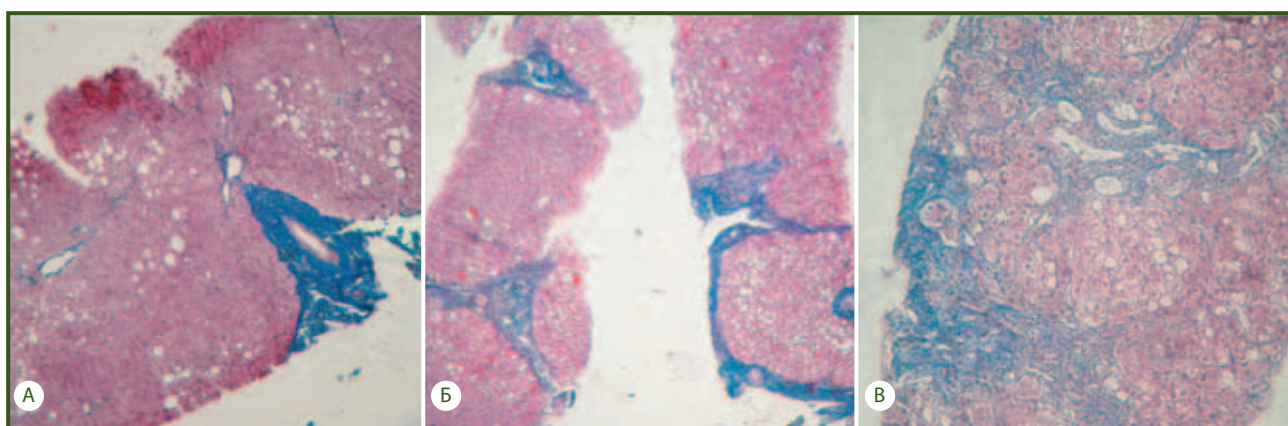


Рисунок 1 — А) Перипортальний фіброз без септ (F1 за Metavir) за умов розвитку НАЖХП. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченка, зб. х200. Б) Локалізована велико- та середньокрапельна жирова дистрофія на тлі щільного перипортального фіброзу (F3 за Metavir) за умов розвитку ХГС. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченка, зб. х100. В) Численні фіброзні септи (F3 за Metavir) та помірна активність гепатиту за умов розвитку АХП. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченка, зб. х200

Таблиця 1 — Спектр вільних жирних кислот (мкг/мл) сироватки крові в пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки, $M \pm m$

Біохімічний показник	Групи			
	Контрольна (n = 7)	I (n = 38)	II (n = 13)	III (n = 15)
Бутират C4:0	2,63 ± 0,84	5,34 ± 1,18	5,653 ± 2,88	5,354 ± 3,632**
Капроат C6:0	0,07 ± 0,02	0,809 ± 0,297*	0,654 ± 0,389	1,397 ± 0,528*
Каприлат C8:0	0,51 ± 0,07	1,926 ± 0,761*	1,983 ± 0,816	8,118 ± 5,245
Додеканоат C12:0	0,002 ± 0,000	0,012 ± 0,005	0,004 ± 0,003	0,005 ± 0,002
Тридеканоат C:13	0	0,002 ± 0,000	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000
Мірилат C14:0	0	0,008 ± 0,005	0,014 ± 0,013	0,067 ± 0,057
Пентадеканоат C15:0	0,020 ± 0,003	0,022 ± 0,006	0,006 ± 0,003*	0,007 ± 0,002**
Пентадеканоат C15:1 (cis-10)	0	0,008 ± 0,004	0,008 ± 0,006	0,003 ± 0,002
Пальмітат C16:0	0,001 ± 0,000	0,004 ± 0,001*	0,034 ± 0,028*	0,016 ± 0,006
Пальмітолеат C16:1 (cis-9)	0,001 ± 0,000	0,003 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,003 ± 0,000
Гептадеканоат C17:0	0,016 ± 0,003	0,024 ± 0,007	0,036 ± 0,026	0,029 ± 0,010
Гептадеканоат C17:1 (cis-10)	0,0012 ± 0,000	0,005 ± 0,002	0,005 ± 0,004	0,008 ± 0,004
Стеарат C18:0	0,04 ± 0,01	0,052 ± 0,018	0,008 ± 0,003	0,009 ± 0,004
Олеат C18:1 (cis-9)	0,007 ± 0,002	0,013 ± 0,005	0,012 ± 0,006	0,062 ± 0,001**
Октадеканоат C18:1 (trans-9)	0,003 ± 0,001	0,015 ± 0,009	0,016 ± 0,010	0,044 ± 0,035
Лінолеат C18:2 (cis-9,12)	0	0,007 ± 0,003	0,020 ± 0,017	0,011 ± 0,005
Лінолеаїдат C18:2 (trans-9,12)	0,015 ± 0,004	0,135 ± 0,074	0,114 ± 0,075	0,059 ± 0,048
Ліноленат C18:3 (cis-9,12,15)	0,13 ± 0,07	0,368 ± 0,131	0,517 ± 0,336	0,765 ± 0,202
Арахідат C20:0	0	0,014 ± 0,006	0,058 ± 0,047	0,083 ± 0,075
Ейкозеноат C20:1 (cis-11)	0,009 ± 0,001	0,175 ± 0,145	0,195 ± 0,182	0,031 ± 0,024
Генеїкозаноат C21:0	0,04 ± 0,01	0,680 ± 0,576	0,113 ± 0,063	0,295 ± 0,099*
ВЖК	0,26 ± 0,09	5,528 ± 0,967***	5,987 ± 3,109***	11,83 ± 6,19**

Примітки: вірогідність змін між показниками хворих порівняно з групою контролю: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

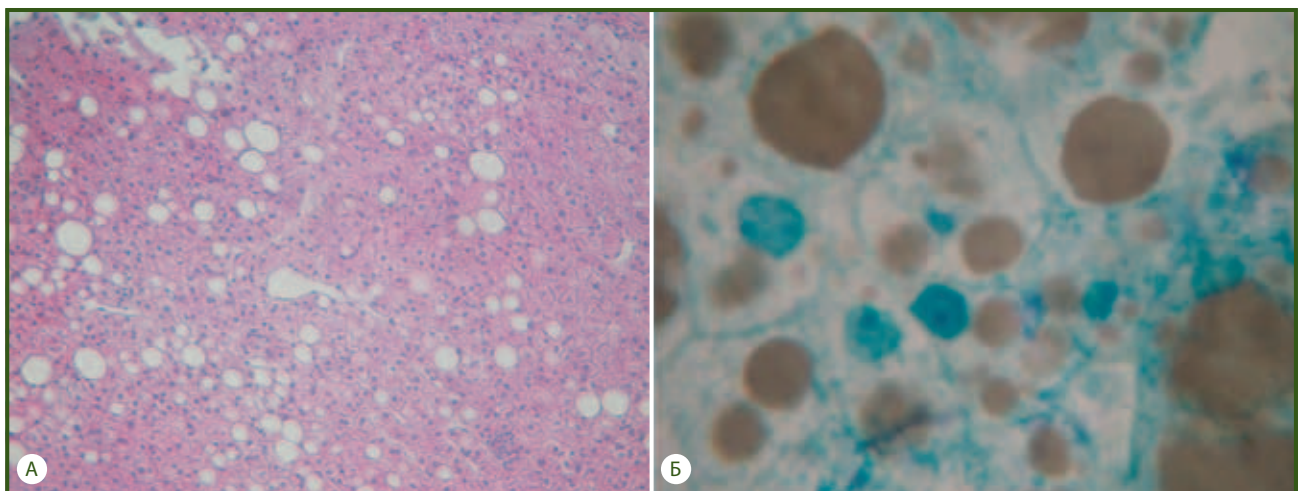


Рисунок 2 — Великокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів, характерна для пацієнтів I групи. А) Стеатоз без ознак запалення на тлі портального фіброзу без септ. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченка, зб. х200. Б) Гомогенні ліпідні включення темно-янтарного кольору. Напівтонкий зріз печінки хворого на НАЖХП. Забарвлення толудіновим синім, зб. х1000

Крім цього, у пацієнтів I групи відбувалося підсилення синтезу пентадеканової кислоти (C15:1) із більш низькомолекулярних попередників. Це можна пояснити тим, що при формуванні НАЖХП відбувається перебудова метаболічних шляхів з активним використанням пропіонату, який є субстратом не тільки для синтезу жирних кислот із непарним числом атомів вуглецю, а й для утворення амінокислот (глутамату, аспартату, глутаміну), азотистих основ фосfolіпідів. На мікροструктурному рівні дисліпідемія характеризується наявністю великих гомогенних (простих за складом) жирових крапель у цитоплазмі гепатоцитів. За допомогою методики напівтонких зрізів були локалізовані ці ліпідні включення темно-янтарного кольору, які рівномірно заповнювали всю цитоплазму гепатоцитів (рис. 2Б).

На відміну від цього для II групи пацієнтів були характерні найбільш виражені показники запалення та активності гепатиту: інфільтрація портальних трактів від помірної до вираженої, інтрачасточкова інфільтрація, вогнища некрозу гепатоцитів (рис. 3А).

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

Зміни в спектрі ненасичених жирних кислот при ХДЗП характеризувалися накопиченням моноенених жирних кислот за рахунок зростання частки пальмітолеїнової кислоти (C16:1) в I групі пацієнтів в 1,8 раза, у II групі — в 1,7 та в III групі — 8,8 раза, а також зниженням вмісту полієнових кислот, що виникало лише завдяки відсутності фракції жирної кислоти C20:4.

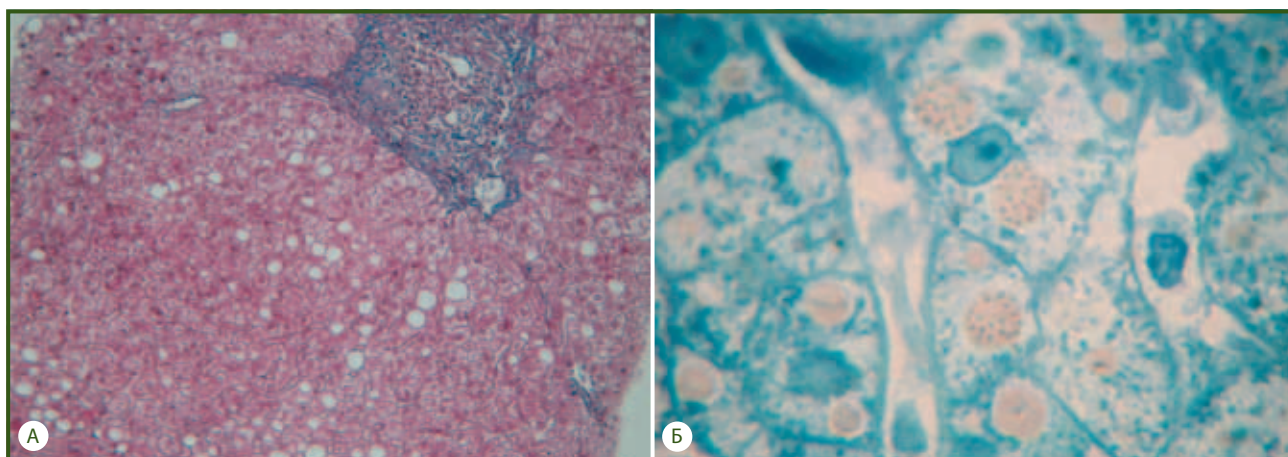


Рисунок 3 — Жирова дистрофія гепатоцитів, характерна для пацієнтів II групи. А) Характерна локалізація ліпідних крапель, перипортальне запалення та фіброзування. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченка, зб. х200. Б) Гетерогенність ліпідних крапель, інкрустація ліпідних включень ліпідами високої щільності. Напівтонкий зріз печінки, забарвлення толуїдиновим синім

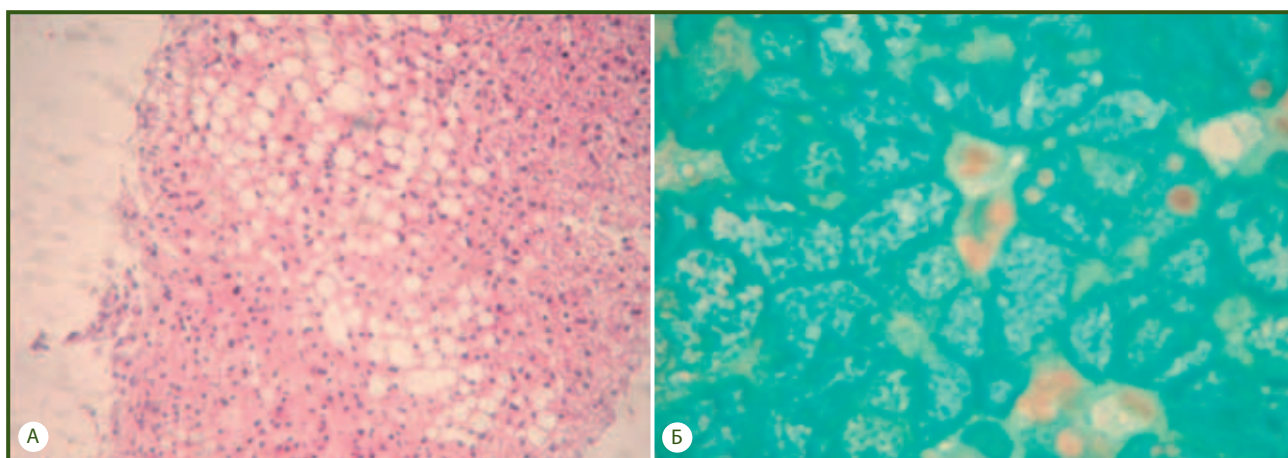


Рисунок 4 — Жирова дистрофія гепатоцитів, характерна для пацієнтів III групи. А) На тлі поширеної білкової дистрофії осередки велико/середньокрапельного стеатозу займають до 30 % біоптату. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб. х200. Б) Ліпідні краплі поряд із загиблими гепатоцитами. Напівтонкий зріз печінки, забарвлення толуїдиновим синім

Отже, треба зазначити, що II група пацієнтів характеризувалася менш вираженими, але більш різноманітними змінами ліпогенезу. Це підтверджується також і тим, що дослідження біоптатів методикою напівтонких зрізів дозволило продемонструвати гетерогенність складу ліпідних крапель у гепатоцитах, а також гетерогенність їх розміру. Так, за допомогою методики напівтонких зрізів у II групі пацієнтів були виявлені ліпідні краплі янтарного кольору, дрібні та середні ліпідні краплі бурого кольору, дуже дрібні прозорі краплі, які рівномірно заповнювали цитоплазму гепатоцитів. У ліпідних краплях великого розміру спостерігалась інкрустація ліпідами більш високої щільності, що характеризувалась більш темним кольором (рис. 3Б).

У III групі пацієнтів спостерігалися найбільш помітні зміни морфологічної будови здебільшого за рахунок дезорганізації будови, запалення, апоптозу та некрозу гепатоцитів, осередкової жирової дистрофії гепатоцитів (рис. 4). Також у пацієнтів цієї групи виявлено й вірогідне підвищення пальмітинової (C16:0) та олеїнової (C18:1) кислот.

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

Морфометричне дослідження показало, що індекс стеатозу був найвищим у I групі пацієнтів — $(0,36 \pm 0,11)$, що підтверджує дані морфологічного дослідження щодо поширеності жирової дистрофії, при цьому індекс фіброзу був найменшим та становив $(0,0443 \pm 0,0110)$. У II групі пацієнтів було зафіксовано найбільш значні коливання індексу стеатозу із середнім значенням $(0,23 \pm 0,09)$, у той час як індекс фіброзу становив $(0,0812 \pm 0,0600)$. III група пацієнтів вірогідно відрізнялась від I групи за індексом фіброзу $(0,1266 \pm 0,0130)$ та стеатозу $(0,2289 \pm 0,1500)$, при цьому ці показники в даній групі були найвищими.

При розрахунку коефіцієнтів співвідношення окремих фракцій жирних кислот було виявлено зниження k1 в групах пацієнтів: у I — в 1,4 раза; II — у 8,5 раза; у III — у 38,0 раза, що свідчить про зниження активності основного ферменту ліпоксигеназного шляху Δ9-десатурази та, як наслідок, зниження клітинного росту та диференціації за рахунок її впливу на текучість мембран та сигнальної трансдукції (рис. 5). Було виявлено зниження k2 в I групі пацієнтів в 1,3 раза, у II групі — у 8,3 раза та в III групі — у 5,3 раза порівняно з контролем, що може свідчити про зниження активності Δ6-десатурази.

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

Таким чином, для пацієнтів із НЖХП є характерними численні морфологічні та біохімічні патомеханізми: підвищення синтезу ВЖК у сироватці крові та їх накопичення у печінці (токсичний вплив), запальні процеси (ушкодження гепатоцитів), присутність окисного стресу (табл. 2).

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

Висновки

1. У пацієнтів із ХДЗП у ліпідному екстракті сироватки крові було виявлено підвищення вмісту ВЖК, що підтверджує гіпотезу про пролонговану ліпотоксичну дію цих кислот на печінку, різнонаправлені зміни окремих фракцій ВЖК, зниження/відсутність вмісту арахідонової жирної кислоти (C20:4) в мембранних структурах гепатоцитів як наслідок інтенсивного використання цієї фракції у вільнорадикальних реакціях та синтезі простагландинів.

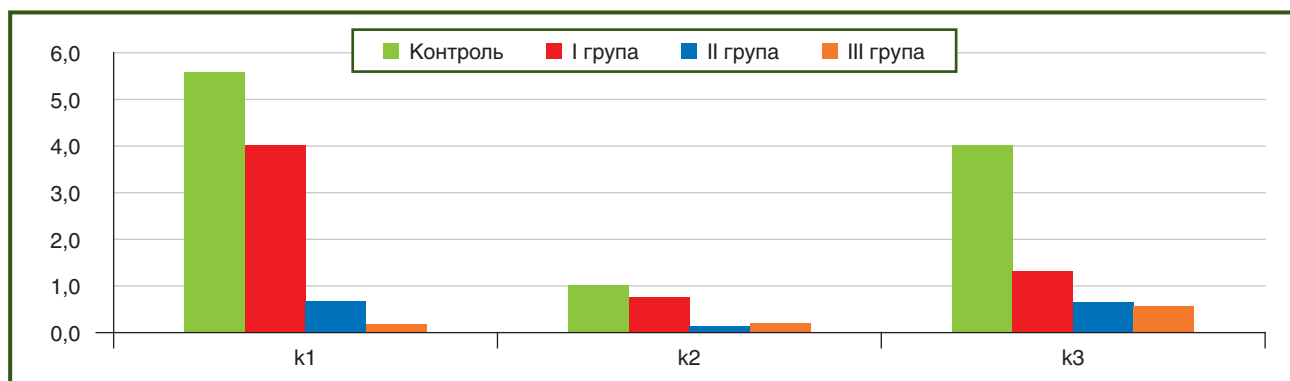


Рисунок 5 — Коефіцієнти співвідношення фракцій вільних жирних кислот ліпідного екстракту сироватки крові

Примітки: k1 — співвідношення концентрацій стеаринової кислоти та олеїнової (C18:0/C18:1); k2 — співвідношення концентрацій пальмітолеїнової кислоти та пальмітинової (C16:1/C16:0); k3 — співвідношення концентрацій стеаринової кислоти та пальмітинової (C18:0/C16:0).

**Таблиця 2 — Узагальнююча схема морфобіохімічних змін при ХДЗП.
Хронічні дифузні захворювання печінки (гіпотетичні морфобіохімічні патомеханізми)**

	Неалкогольна жирова хвороба печінки	Хронічний гепатит, асоційований із вірусом С	Алкогольна жирова хвороба печінки
Токсичні процеси (біохімічний показник)	Пальмітинова С16:0 Стеаринова С18:0 ↑↑↑	Пальмітинова С16:0 Стеаринова С18:0 ↑↑↑	Пальмітинова С16:0 Стеаринова С18:0 ↑
Загибель гепатоцитів (морфологічний показник)	Гідропічна дистрофія ↑	Некроз гепатоцитів ↑↑	Гідропічна дистрофія Некроз гепатоцитів Апоптоз гепатоцитів ↑↑↑
Запалення (біохімічний показник)	Олеїнова С18:1 (cis-9) в 1,8 раза Октадеканойнова С18:1 (trans-9) у 5 разів ↑	Олеїнова С18:1 (cis-9) в 1,7 раза Октадеканойнова С18:1 (trans-9) у 5,3 раза ↑	Олеїнова С18:1 (cis-9) у 8,8 раза Октадеканойнова С18:1 (trans-9) у 14,6 раза ↑↑
Запалення (морфологічний показник)		Перипортальна інфільтрація Інтрачасточкова інфільтрація Адгезія лімфоцитів Лімфоїдні фолікули ↑↑↑	Виражена перипортальна інфільтрація Інтрачасточкова інфільтрація ↑↑
Оксидативний стрес (біохімічний показник)	Арахідонова С20:0 в 4,0 раза ↑	Арахідонова С20:0 в 4,5 раза ↑	Арахідонова С20:0 в 6,4 раза ↑↑
Коефіцієнти ВЖК (біохімічний показник)	k1, k2, k3 ↓	k1, k2, k3 ↓	k1, k2, k3 ↓

2. Типова морфологічна картина при НАЖХП являла собою осередки великокрапельної жирової дистрофії на тлі незначного фіброзування та запалення. Для ХГС були характерні найбільш виражені показники запалення та активності гепатиту на тлі помірного фіброзування та дрібнокрапельного або змішаного стеатозу. У групі ХГС були зафіксовані найбільш значні коливання індексу стеатозу зі середнім значенням ($0,23 \pm 0,09$), у той час як індекс фіброзу становив ($0,0812 \pm 0,0600$). У групі АХП індекси фіброзу ($0,1266 \pm 0,0130$) та стеатозу ($0,2289 \pm 0,1500$) були найвищими, а типова морфологічна картина характеризувалася в першу чергу значною дезорганізацією ліпідних включень та помітними змінами гістологічної будови за рахунок як запалення, так і гідропічної дистрофії гепатоцитів.

3. При розрахунку коефіцієнтів співвідношення окремих жирних кислот було виявлено зниження k1 у групах пацієнтів: у I — в 1,4 раза; у II — у 8,5; у III — 38,0 раза; k2 в групах пацієнтів: у I — в 1,3 раза, у II — 8,3, III — у 5,3 раза, що свідчить про зниження активності ферментів ліпоксигеназного шляху, які беруть участь у подовженні вуглеводного ланцюга та утворенні подвійного зв'язку в молекулі жирної кислоти; k3 в групах пацієнтів: у I — у 3 рази, у II — 6, у III — у 7 разів порівняно з контролем, відображає зниження синтезу ненасичених жирних кислот у пацієнтів всіх груп.

4. Морфологічні та біохімічні показники при АХП вірогідно відрізнялись від НАЖХП: за індексом фіброзу ($(0,1266 \pm 0,0130)$ порівняно з $(0,0443 \pm 0,0110)$) та стеатозу ($(0,2289 \pm 0,1500)$ порівняно з $(0,36 \pm 0,11)$).

Науково-практичне впровадження. Ця робота відноситься до числа фундаментальних досліджень у галузі біохімії та морфології. Отримані результати значно доповнюють сучасні уявлення щодо біохімічних механізмів розвитку хронічних дифузних захворювань

печінки. Визначення вмісту вільних жирних кислот у сироватці крові пацієнтів із хронічними дифузними захворюваннями печінки впроваджено в клінічну практику нашого інституту, що дозволяє значно покращити диференціальну діагностику та ефективність лікування виявлених порушень. Метод кількісної гістологічної оцінки стадії фіброзу та стеатозу при хронічних дифузних захворюваннях печінки за допомогою комп'ютерної морфометрії дозволяє отримати числові дані та проаналізувати їх зв'язок із іншими гістологічними, лабораторними та клінічними даними. На відміну від звичайної гістологічної оцінки біоптатів додаткова морфометрична характеристика дає можливість отримання більш точних, об'єктивних, відтворюваних результатів. Розробка проїшла апробацію в лабораторії патоморфології ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України», КЗ УОЗ МКЛ №2 (м. Харків), КЗ «ЦПМСД №2» (м. Вінниця) з позитивними результатами (значне підвищення точності морфологічного дослідження).

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

References

1. Stepanov YuM. The use of essential phospholipids for the treatment of fatty liver disease. *Gastroenterologia*. 2016;(62):58-64. (in Russian).
2. Didenko VI. Recent advances in the assessment of hepatic steatosis. *Gastroenterologia*. 2015;(57):94-100. (in Ukrainian).
3. Chen R, Han S, Dong D, et al. Serum fatty acid profiles and potential biomarkers of ankylosing spondylitis determined by gas chromatography-mass spectrometry and multivariate statistical analysis. *Biomed Chromatogr*. 2015 Apr;29(4):604-11. doi: 10.1002/bmc.3321.
4. Wang DC, Sun CH, Liu LY, et al. Serum fatty acid profiles

using GC-MS and multivariate statistical analysis: potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012 Jun;33(6):1057-66. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.013.

5. Cao H, Hotamisligil GS. Fatty acid c16: 1n7-palmitoleate a lipokine and biomarker for metabolic status. *Patent US20110213032A1*; 2011.

6. Jiang M, Chen T, Feng H, et al. Serum metabolic signatures of four types of human arthritis. *J Proteome Res*. 2013 Aug 2;12(8):3769-79. doi: 10.1021/pr400415a.

7. Perez-Cornago A, Brennan L, Ibero-Baraibar I, et al. Metabolomics identifies changes in fatty acid and amino acid profiles in serum of overweight older adults following a weight loss intervention. *J Physiol Biochem*. 2014 Jun;70(2):593-602. doi: 10.1007/s13105-013-0311-2.

8. Copaci I, Lupescu I, Caceane E, Chiriac G, Ismail G. Noninvasive markers of improvement of liver steatosis achieved by weight reduction in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Rom J Intern Med*. 2015 Jan-Mar;53(1):54-62. doi: 10.1515/rjim-2015-0008.

9. Butorova LI, Kalashnikova MA, Kraynikova NG, Osadchuk MA, Plavnik TE, Tokmulina GM. Hepatoprotective therapy of alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *Effective Pharmacotherapy*. 2016;(34):12-21. (in Russian).

10. Baryshnikova NV, Belousova LN. Alcoholic liver disease: features of diagnosis and treatment. *Consilium Medicum. Gastroenterologia*. 2014;(2):16-18. (in Russian).

11. Didenko VI, Klenina IA, Babii SO, Karachynova VA. Topicality of identification of free fatty acids pattern in biologic substrates in the diagnosis of gastroenterological diseases. *Gastroenterologia*. 201;51(2):137-141. (in Ukrainian).

12. Zygalo EV, Jagmur VB, Klenina IA, Melanich SV, Popok DV, Skorohod TO. The role of intestinal microbiota in the development of lipid metabolism disorders in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Medychnyj forum*. 2017;(12):31-34. (in Ukrainian).

13. Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. *Gistologicheskaja i mikroskopicheskaja tekhnika: rukovodstvo [Histological and microscopic technique: a guide]*. Smolensk: SAU; 2000. 476 p. (in Russian).

14. Ichihara K, Yamaguchi C, Araya Y, Sakamoto A, Yoneda K. Preparation of fatty acid methyl esters by selective methanolysis of polar glycerolipids. *Lipids*. 2010 Apr;45(4):367-74. doi: 10.1007/s11745-010-3404-5.

15. Eniukov IS. *Metody, algoritmy, programmy mnogomernogo statisticheskogo analiza. Paket PPSA [Methods, algorithms, programs of multivariate statistical analysis. Package PPSA]*. Moscow: Finansy i statistika; 1986. 232 p. (in Russian).

Отримано 20.05.2018 ■

Степанов Ю.М., Диденко В.И., Кленина И.А., Карачинова В.А., Ошмянская Н.Ю.
ГУ «Институт гастроэнтерологии НАМН Украины», г. Днепр, Украина

Спектр жирных кислот сыворотки крови пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени в зависимости от этиологии и морфологических особенностей

Резюме. В статье представлены морфологические особенности (по данным гистологических методов исследования, метода полутонких срезов и компьютерной морфометрии) развития и прогрессирования хронических диффузных заболеваний печени, хронического гепатита, ассоциированного с вирусом С, и алкогольной болезни печени. Показано, что в зависимости от этиологического фактора важное отличие было выявлено по характеру, степени стеатоза и локализации липидных капель, что свидетельствует о расхождении некоторых биохимических механизмов накопления липидов в гепатоцитах. Рассмотрена роль свободных жирных кислот сыворотки крови при данных заболеваниях, выявлено повышение их содержания в сыворотке крови, установлен дефицит некоторых фракций, что может

быть одной из причин формирования неалкогольной жировой болезни печени и других заболеваний, связанных с обменом веществ. Маркером воспалительных процессов можно считать ленолеую (С18:3) и арахидоновую (С20:0) свободные жирные кислоты. Предложены индексы соотношения жирных кислот, которые позволяют охарактеризовать и установить метаболические пути развития и прогрессирования заболевания, что играет важную роль в дифференцированном подходе при установлении нозологических форм заболеваний печени.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени; алкогольный стеатогепатит; стеатоз печени; хронический гепатит С; газовая хроматография; свободные жирные кислоты; полиненасыщенные жирные кислоты

Yu.M. Stepanov, V.I. Didenko, I.A. Klenina, V.A. Karachinova, N.Yu. Oshmianska
State Institution "Institute of Gastroenterology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Dnipro, Ukraine

Spectrum of serum fatty acids in patients with chronic diffuse liver disease depending on etiology and morphological features

Abstract. The study analyzes morphological features of the development and progression of hepatic steatosis in non-alcoholic fatty liver disease, chronic hepatitis C and alcoholic fatty liver disease. Depending on etiological factor, the important difference was noted in steatosis nature and degree, localization of lipid droplets, which proves the discrepancy between some biochemical mechanisms of lipid accumulation in the hepatocytes. The role of serum free fatty acids has been considered in these diseases, an increase of their content in the blood serum has been detected, as well as deficiency of certain fractions that may be one of the causes of non-alcoholic fatty liver disease and other

diseases associated with lipid metabolism. It was proved that linoleic (C18:3) and arachidonic (C20:0) free fatty acids can be considered as inflammatory markers. The indices of the fatty acids ratio have been proposed, which allows for better characterization and analysis of metabolic pathways responsible for the development and progression of fatty liver diseases. All this plays an important role in differentiated approaches to the diagnosis and treatment of liver diseases.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease; alcoholic steatohepatitis; liver steatosis; chronic hepatitis C; gas chromatography; free fatty acids; polyunsaturated fatty acids