

МОРФОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ СУДИН МІКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ПЕЧІНКИ БІЛИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ 6 ТИЖНІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ОЛІЇ НАСІННЯ КОНОПЕЛЬ

Державне некомерційне підприємство «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького» (м. Львів, Україна)

Анотація. Олію насіння конопель отримують методом холодного віджиму, завдяки чому вона зберігає всю поживну цінність і містить незамінні поліненасичені жирні кислоти омега 6 і омега 3 в ідеальному співвідношенні 3:1, що має вирішальне значення для підтримки здоров'я та профілактики хронічних захворювань. Мета дослідження – визначити морфометричні показники мікроциркуляторного русла печінки щурів після 6 тижнів експериментального застосування олії насіння конопель. Експериментальне дослідження проведене на 26 статевозрілих білих щурах-самцях із дотриманням біоетичних норм впродовж 6 тижнів. У дослідній групі (14 щурів) разова добова доза олії насіння конопель складала 0,5 мл/кг, у контрольній (6 щурів) – 0,1 мл/кг. Інтактну групу склали 6 тварин. В кінці експерименту проводили гістологічне і морфометричне дослідження судин мікроциркуляторного русла печінки. Різниця вважалася статистично значущою при мінімальному рівні значимості $p < 0,05$. Після 6-ти тижневого експериментального застосування олії насіння конопель в дозі 0,5 мл/кг/добу встановлено правильну організацію судин мікроциркуляторного русла, відсутність дилатації і повнокров'я центральних вен, синусоїдів і міжчасточкових артерій, що свідчить про відсутність застоївних явищ. Порівняльний морфометричний аналіз судин мікроциркуляторного русла печінки після 6-ти тижневого експериментального застосування олії насіння конопель продемонстрував відсутність статистично значущих змін середніх показників діаметрів судин мікроциркуляторного русла, зокрема судин триад печінкової часточки, центральних вен, підчасточкових і збірних вен і синусоїдів ($p > 0,05$) з контрольною групою та групою інтактних тварин. Отримані результати вказують про безпеку застосування олії насіння конопель як дієтичної добавки в дозі 0,5 мл/кг/добу.

Ключові слова: печінка, мікроциркуляторне русло, гістологія, морфометрія, щури, експеримент, олія насіння конопель.

Abstract. Hemp seed oil is obtained by cold pressing, which preserves all its nutritional value and contains essential polyunsaturated fatty acids omega 6 and omega 3 in an ideal ratio of 3:1, which is crucial for maintaining health and preventing chronic diseases. The aim of the study was to determine the morphometric parameters of the microcirculatory bed of the liver in rats after 6 weeks of experimental application of hemp seed oil. An experimental study was conducted on 26 sexually mature male white rats in compliance with bioethical standards over a period of 6 weeks. In the experimental group (14 rats), the single daily dose of hemp seed oil was 0.5 ml/kg, and in the control group (6 rats) – 0.1 ml/kg. The intact group consisted of 6 animals. At the end of the experiment, histological and morphometric studies of the microcirculatory vessels of the liver were performed. The difference was considered statistically significant at a minimum significance level of $p < 0.05$. After 6 weeks of experimental use of hemp seed oil at a dose of 0.5 ml/kg/day, the correct organization of the microcirculatory vessels was established, the absence of dilation and engorgement of the central veins, sinusoids and interlobular arteries, which indicates the absence of congestive phenomena. Comparative morphometric analysis of the vessels of the liver microcirculatory bed after 6 weeks of experimental use of hemp seed oil demonstrated the absence of statistically significant changes in the average diameters of the vessels of the microcirculatory bed, in particular the vessels of the hepatic lobule triads, central veins, sublobular and collecting veins and sinusoids ($p > 0.05$) with the control group and the group of intact animals. The results obtained indicate the safety of using hemp seed oil as a dietary supplement at a dose of 0.5 ml/kg/day.

Key words: liver, microcirculatory bed, histology, morphometry, rats, experiment, hemp seed oil.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом НДР кафедри патологічної анатомії та судової медицини ЛНМУ імені Данила Галицького «Вивчення патогенетичних механізмів та патоморфологічних особливостей захворювань ендокринної, серцево-судинної, дихальної, нервової, травної, сечовидільної та репродуктивної систем з метою удосконалення їх морфологічної діагностики», номер державної реєстрації 0123U201668

Вступ.

Олію з насіння конопель отримують шляхом холодного віджиму, тобто пресуванням під тиском, завдяки чому вона зберігає всю поживну цінність

[1]. Олія з насіння конопель має оптимальний профіль жирних кислот, що містить до 90% ненасичених жирних кислот, причому поліненасичені жирні кислоти складають 70-80% цієї фракції [2]. Переважною мононенасиченою жирною кислотою є олеїнова кислота (Омега-9), тоді як найпоширенішими поліненасиченими є лінолева кислота (Омега-6) та α -ліноленова кислота (Омега-3) [2, 3]. Ці ненасичені жирні кислоти не можуть синтезуватися в організмі і є попередниками біологічно активних довголанцюгових поліненасичених жирних кислот, які перетворюються в арахідонову кислоту, тоді як α -ліноленова кислота трансформується в докозагексаєнову кислоту класу Омега-3 та ейкозапентаєнову кислоту класу

Омега-3 [4]. Ці перетворення мають вирішальне значення для підтримки структури клітинних мембран, здоров'я серцево-судинної системи, регуляції запалення, цілісності шкіри та неврологічної функції. Співвідношення Омега-6/Омега-3 в олії насіння конопель коливається від 3:1 до 5:1, що відповідає рекомендаціям Європейської агенції з безпеки харчових продуктів та харчових продуктів щодо підтримки здоров'я та профілактики хронічних захворювань [5]. Таке збалансоване співвідношення відображає традиційні японську та середземноморську дієти, пов'язані з низьким рівнем захворюваності на ішемічну хворобу серця, що різко контрастує з типовими західними дієтами, які характеризуються нездоровим співвідношенням 10:1 [6]. Хоча існують суперечки щодо оптимального співвідношення Омега-6 до Омега-3, і деякі дослідження демонструють, що співвідношення навіть 1:1 можуть бути ідеальними для зменшення запальних реакцій, сучасні дані свідчать про те, що співвідношення від 2:1 до 4:1 забезпечують серцево-судинні переваги порівняно з типовим західним співвідношенням 10–15:1 [7, 8]. Тривають дебати, що є більш важливим для серцево-судинних результатів: абсолютне споживання жирних кислот чи їх відносні співвідношення, хоча обидва чинники, ймовірно, сприяють загальному запальному стану [9]. Конопляна олія також містить гамма-ліноленову кислоту класу Омега-6 та стеаридонову кислоту класу Омега-3, які є важливими попередниками для синтезу довголанцюгових поліненасичених жирних кислот з протизапальними властивостями [10]. Крім того, конопляна олія забезпечує додаткову перевагу Омега-3 поліненасичених жирних кислот. Вміст насичених жирних кислот залишається менше 12% в основному з пальмітинової кислоти в середньому 2-9% та стеаринової кислоти, що забезпечує сприятливе співвідношення поліненасичених жирних кислот, пов'язане зі зниженням ризику атеросклерозу та ішемічної хвороби серця [11]. Важливими на сьогодні є експериментальні дослідження впливу олії насіння конопель на судинну систему печінки, зокрема на мікроциркуляторне русло, вивчення стану кровотоку, морфометричних показників судинного русла залежно від дози і тривалості застосування конопляної олії.

Мета дослідження.

Визначити морфометричні показники мікроциркуляторного русла печінки щурів після 6 тижнів експериментального застосування олії насіння конопель.

Об'єкт і методи дослідження.

Експериментальне дослідження проведено на 26 нелінійних статевозрілих білих щурах-самцях віком 5-7 місяців і вагою 180-230 г на початок експерименту. Експеримент тривав 6 тижнів. Дослідну групу склали 14 щурів, яким упродовж 6 тижнів один раз на добу перорально крапельно вводили олію насіння конопель, доза олії становила 0,5 мл/кг/добу (середня доза); контрольну групу склали 6 тварин, яким упродовж шести тижнів щоденно один раз на добу перорально крапельно вводили олію насіння конопель, доза становила 0,1 мл/кг/добу (низька доза); інтактну групу склали 6 статевозрілих білих щурів-самців.

Всі експериментальні дослідження за участю тварин проводилися у стандартних умовах віварію після етичного схвалення у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького, яке було надане членами комісії з питань біоетики (Протокол №7 від 29.08.2022 року) з дотриманням вимог Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 2010/63/ EU, Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорсткого поводження», етичним вимогам згідно наказу МОЗ України № 231 від 01.11.2000 року [12, 13].

В кінці експерименту після евтаназії та автопсії проводили забір тканини печінки для морфологічного дослідження. Виготовляли гістологічні препарати і забарвлювали їх за стандартною методикою, після гістологічного вивчення проводили морфометричне дослідження діаметра судин мікроциркуляторного русла печінки з визначенням показників за допомогою програмного забезпечення Aperio ImageScope v12.3.3 (Leica biosystems, Wetzlar, Німеччина). Загальне вивчення гістологічних препаратів, морфометричне дослідження, мікрофотографування препаратів проводили з використанням світлооптичного мікроскопа Leica DM 2500 (Leica Microsystems GmbH, Німеччина) з цифровою камерою Leica DFC450 C (Німеччина) та програмним забезпеченням Leica Application Suit Version 3.8. Статистичну обробку даних проводили в програмі Microsoft Office Excel. Достовірність різниці між груповими показниками перевіряли за критерієм Манна-Уїтні $p(U)$. Різниця вважалася статистично значущою при мінімальному рівні значимості $p < 0,05$ [14].

Результати дослідження та їх обговорення.

При мікроскопічному вивченні гістологічних препаратів дослідної групи і при порівнянні з контрольною групою та інтактними тваринами морфологічних змін печінки встановлено не було. Гістологічно печінка характеризувалася часточковою структурою. У триадах печінки візуалізувалися міжчасточкові вени і артерії, жовчні протоки і лімфатичні судини без патологічних змін. Визначення середніх діаметрів судин триад і порівняння з контрольною групою показало, що показники достовірно не відрізнялися від контрольної групи ($p > 0,05$). Так, середній діаметр міжчасточкової вени у дослідній групі склав $45,65 \pm 1,49$ мкм (у контрольній – $45,86 \pm 2,04$ мкм), середній діаметр навколочасточкової вени склав $23,56 \pm 1,44$ мкм (у контрольній – $23,66 \pm 2,02$ мкм), які достовірно не відрізнялися між собою ($p > 0,05$) (рис. 1). Міжчасточкова артерія за діаметром менша від вени, без особливостей. Середній зовнішній діаметр склав $27,25 \pm 1,03$ мкм, середній внутрішній діаметр – $17,4 \pm 0,65$ мкм; відповідно, у контрольній групі середній зовнішній діаметр – $26,7 \pm 1,46$ мкм, середній внутрішній діаметр – $17,78 \pm 1,12$ мкм. Достовірність за критерієм Манна-Уїтні склала $p > 0,05$ при порівнянні з контрольною групою середніх показників внутрішнього і зовнішнього діаметрів міжчасточкової артерії (рис. 2). При дослідженні гістологічних препаратів печінки звертали увагу на центральні вени, їх дилатацію, наявність повнокров'я. Як і в дослідній групі, так і в контрольній та інтактних тваринах нами не було встановлено застою крові в центральних венах, порушень відтоку і дилатації. Морфометричне дослідження діаметра центральних вен у дослідній

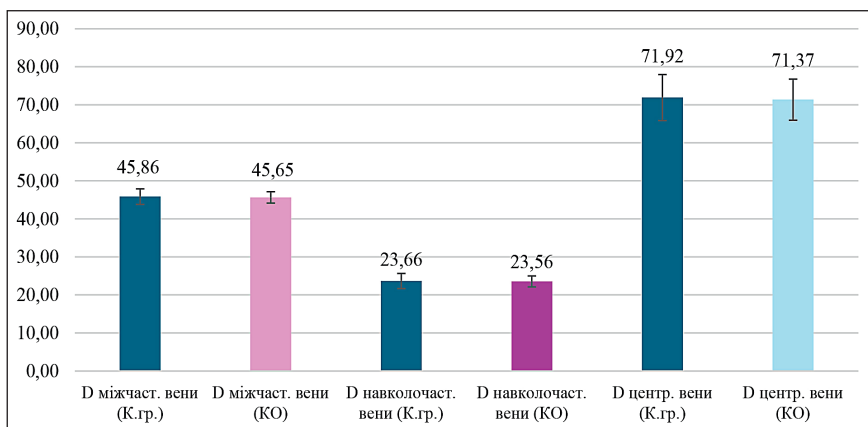


Рисунок 1 – Порівняння середніх показників діаметрів міжчасточкової, навколочасточкової, центральної вен (мкм) групи олії насіння конопель (доза 0,5 мл/кг/добу) з контрольною групою (доза 0,1 мл/кг/добу) наприкінці 6 тижня експерименту (M±SD).

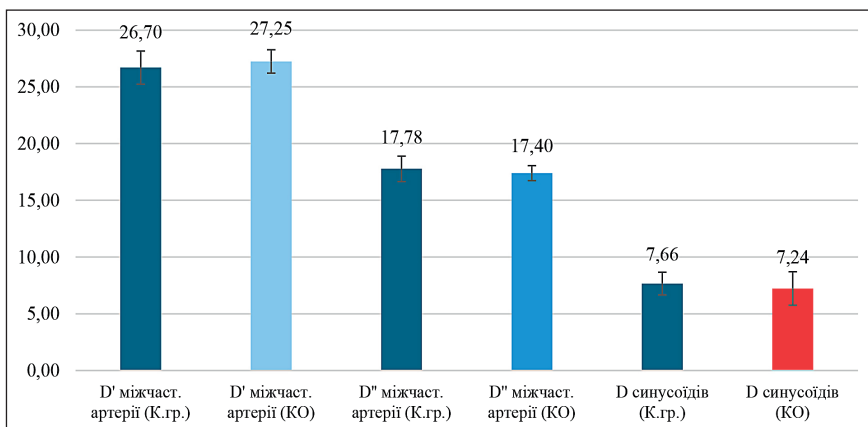


Рисунок 2 – Порівняння середніх показників діаметрів міжчасточкової артерій та синусоїдів (мкм) групи олії насіння конопель (доза 0,5 мл/кг/добу) з контрольною групою (доза 0,1 мл/кг/добу) наприкінці 6 тижня експерименту (M±SD).

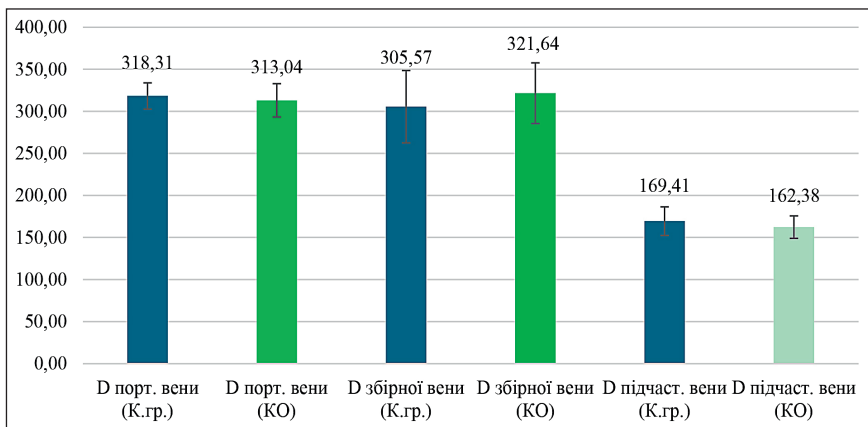


Рисунок 3 – Порівняння середніх показників діаметрів портальної, збірної, підчасточкової вен (мкм) групи олії насіння конопель (доза 0,5 мл/кг/добу) з контрольною групою (доза 0,1 мл/кг/добу) наприкінці 6 тижня експерименту (M±SD).

групі продемонструвало, що середній показник становив $71,37 \pm 5,41$ мкм; у контрольній групі – $71,92 \pm 6,04$ мкм, причому показники достовірно не відрізнялися між собою ($p > 0,05$) (рис. 1).

При гістологічному і морфометричному дослідженні печінки звертали увагу на правильну організацію синусоїдів, їх діаметри в різних зонах часточки. Так, середній діаметр синусоїдів у дослідній групі склав $7,24 \pm 1,47$ мкм і достовірно не відрізнявся від контрольної групи ($7,66 \pm 1,0$ мкм), відповідно $p > 0,05$ (рис. 2). Ендотелій у синусоїдах був збережений, однак дуже

добре візуалізувалися клітини Купфера, які виглядали гіпертрофованими. В окремих полях зору в центральній зоні часточки і в проміжній зоні синусоїди були помірно дилатованими, проте повнокров'я і сладжу еритроцитів нами не спостерігалось.

Крім центральної вени, у системі відтоку крові з печінки беруть участь підчасточкові і збірні вени. Стінка підчасточкових вен була тоненька, зв'язку з синусоїдами підчасточкові вени не мали. Середній діаметр підчасточкових вен склав $162,38 \pm 13,4$ мкм, проте мінімальне значення було $135,13$ мкм, а максимальне значення діаметра – $181,19$ мкм. При порівнянні з контрольною групою середній показник діаметра не відрізнявся від контрольної групи, $p > 0,05$. Морфометричні показники діаметра збірної вени у дослідній групі також достовірно не відрізнялися від групи контролю, $p > 0,05$. Дослідження портальної вени дозволило встановити відсутність достовірної різниці між показниками діаметрів у дослідній і контрольній групах ($p > 0,05$), рис. 3. Крім того, ознак портальної гіпертензії, які би проявлялися дилатацією центральних вен та артерій портальних трактів, нами не діагностовано.

Висновки.

1. За результатами проведеного гістологічного аналізу печінки після 6-ти тижневого експериментального застосування олії насіння конопель як дієтичної добавки в дозі 0,5 мл/кг/добу встановлено правильну організацію судин мікроциркуляторного русла, відсутність дилатації і повнокров'я центральних вен, синусоїдів і міжчасточкових артерій, що свідчить про відсутність застійних явищ.

2. Порівняльний морфометричний аналіз судин мікроциркуляторного русла печінки після 6-ти тижневого експериментального застосування олії насіння конопель продемонстрував відсутність статистично значущих змін середніх показників діаметрів судин мікроциркуляторного русла, зокрема судин триад печінкової часточки, центральних вен, підчасточкових і збірних вен і синусоїдів ($p > 0,05$) з контрольною групою та групою інтактних тварин, що вказує про безпеку застосування олії насіння конопель як дієтичної добавки в дозі 0,5 мл/кг/добу.

Література

1. Martini N. Hempseed oil. *Journal of Primary Health Care*. 2021;13(4):375-376. DOI: [10.1071/HC19567](https://doi.org/10.1071/HC19567).
2. Crescente G, Piccolella S, Esposito A, Scognamiglio M, Fiorentino A, Pacifico S. Chemical composition and nutraceutical properties of hempseed: an ancient food with actual functional value. *Phytochem Rev*. 2018;17:733-49. DOI: [10.1007/s11101-018-9556-2](https://doi.org/10.1007/s11101-018-9556-2).
3. Farinon B, Molinari R, Costantini L, Merendino N. The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*. 2020;12(7):1935. DOI: [10.3390/nu12071935](https://doi.org/10.3390/nu12071935).
4. Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*. 2000;1:420-39. DOI: [10.1002/biot.200600012](https://doi.org/10.1002/biot.200600012).
5. Callaway JC. Hempseed as a nutritional resource: an overview. *Euphytica*. 2004;140:65-72. DOI: [10.1007/s10681-004-4811-6](https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6).
6. Oikonomou E, Psaltopoulou T, Georgiopoulos G, Siasos G, Kokkou E, Antonopoulos A, et al. Western dietary pattern is associated with severe coronary artery disease. *Angiology*. 2018;69:339-46. DOI: [10.1177/0003319717721603](https://doi.org/10.1177/0003319717721603).
7. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*. 2002;56:365-79. DOI: [10.1016/S0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00253-6).
8. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J Nut Metabolism*. 2012;2012:539426. DOI: [10.1155/2012/539426](https://doi.org/10.1155/2012/539426).
9. Harris WS, Tintle NL, Imamura F, Qian F, Korat AVA, Marklund M, et al. Blood n-3 fatty acid levels and total and cause-specific mortality from 17 prospective studies. *Nat Commun*. 2021;12:2329. DOI: [10.1038/s41467-021-22370-2](https://doi.org/10.1038/s41467-021-22370-2).
10. Ziboh VA, Miller CC, Cho Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:361S-6S. DOI: [10.1093/ajcn/71.1.361S](https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.361S).
11. Kris-Etherton PM, Richter CK, Bowen KJ, Skulas-Ray AC, Jackson KH, Petersen KS, et al. Recent clinical trials shed new light on the cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Methodist Debakey Cardiovasc J*. 2019;15:171-8. DOI: [10.14797/mdcj-15-3-171](https://doi.org/10.14797/mdcj-15-3-171).
12. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 52 p.
13. European Parliament. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. *Off J Eur Union*. 2010;53(L276):33-79.
14. Hruzieva TS, Lekhan VM, Ohniev VA, Haliienko LI, Kriachkova LV, Palamar BI, et al. *Biostatystyka*. Vinnytsya: Nova knyha; 2020. 384 s. [in Ukrainian].