

Влияние высокожирового рациона питания на морфофункциональное состояние печени крыс

В.Н. Байматов¹, Н.С. Тропская², Е.А. Кислякова², И.Г. Вилкова²,
О.С. Кислицына², Т.С. Попова²

¹ – ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», Москва

² – ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Контактная информация: д.б.н. Тропская Наталья Сергеевна, ntropskaya@mail.ru

Исследовано влияние высокожирового рациона на морфофункциональное состояние печени. Эксперименты выполнены на 19-ти крысах, которым в течение трех недель внутрижелудочно вводили стандартную питательную смесь (контрольная группа) либо стандартную питательную смесь с добавлением кукурузного масла (опытная группа), что соответствовало дополнению к основному рациону 40%-ной доли жира от общей суточной калорийности. Выявлено, что высокожировая нагрузка приводит к формированию стеатоза и воспалительной инфильтрации печени.

Ключевые слова: высокожировая диета, кукурузное масло, стеатоз, крысы.

Введение

В мире неуклонно растет количество людей с избыточной массой тела и алиментарным ожирением, что обусловлено нарушениями структуры питания и гиподинамией. Одним из факторов, которые приводят к увеличению массы тела, является избыток жиров в пище. Высокожировая нагрузка способствует аккумуляции липидов в гепатоцитах, что является триггерным механизмом развития стеатоза печени и неалкогольного стеатогепатита.

В качестве животных-моделей часто используются крысы и мыши, поскольку у них сравнительно короткий срок беременности, большое по численности потомство, а также дешевое содержание и разведение [2]. Наиболее распространенными лабораторными животными для большинства биомедицинских ис-

следований являются популяция линий крыс Wistar и инбредные линии мышей C57Bl6/J и Balb/c. Животные этих линий отличаются высокой воспроизводимостью результатов с однотипным и стабильным ответом организма на экспериментальные воздействия пищевыми веществами и фармакологическими препаратами.

У грызунов предложена следующая классификация жировых рационов: диета с низким содержанием жира (до 10% от калорийности суточного рациона), диета с высоким содержанием жира (30-50% от суточной калорийности), диета с очень высоким содержанием жира (более 50% от суточной калорийности) [7]. Необходимо отметить, что в рационы включают либо животные, либо растительные жиры, либо их сочетание. Из животных жиров используют сливочное

масло, свиное сало, говяжий жир, а из растительных – подсолнечное, оливковое, пальмовое, кокосовое, кукурузное масла [1, 4, 5, 8].

Высокожировая диета может приводить к различной степени развития стеатоза, воспаления и фиброза, что определяется характером рациона (процентное содержание и состав жиров) и продолжительностью его применения. Так, диета, состоящая из 10% растительного масла, сала и 2% холестерина от общего состава рациона, у крыс в течение 12-ти недель приводит к жировой инфильтрации печени и формированию стеатоза [6]. При кормлении животных эмульсией с очень высоким содержанием растительных жиров (71% от общего рациона) уже на 21-е сут происходит формирование стеатоза и воспалительной инфильтрации печени [9].

В экспериментальных исследованиях жировой компонент добавляют, как правило, к стандартному сухому корму, реже – используют жидкие стандартные диеты. При этом животные получают питание *ad libitum*, что является, на наш взгляд, существенным недостатком, т.к. количество потребляемого корма не стандартизировано в этих условиях.

В конце прошлого века Американский институт питания предложил использовать для изучения всех аспектов нормальных и патологических состояний у животных очищенные ингредиенты для создания стандартного корма с открытой формулой. Например, для грызунов был принят стандартный рацион AIN-формула 76А, где требования по белку покрываются за счет молочного белка казеина с добавлением метионина. Углеводы в этом случае поставляются за счет кукурузного крахмала и сахарозы, кукурузное масло

обеспечивает потребности в жирах, а целлюлоза является источником волокон. Витамины и минеральные вещества добавляются в специальных для грызунов пропорциях. Поскольку формула такого корма «открыта», она может быть доступна для научного сообщества, что делает возможным ее воспроизведение и модификацию с учетом др. питательных компонентов [2, 7]. В качестве стандартной жидкой диеты можно использовать также готовые смеси для энтерального питания. Так, белковый, углеводный и жировой состав изокалорической смеси для энтерального питания «Нутризон» соответствует стандартному рациону, описанному выше. Введение таких смесей через зонд экспериментальным животным обеспечит стандартизацию потребляемых питательных веществ.

Целью настоящего исследования явилось экспериментальное моделирование стеатоза печени путем энтерального зондового введения питательной смеси с добавлением в качестве жирового компонента кукурузного масла.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 19-ти крысах-самцах популяции линий Wistar в возрасте 12-ти мес. массой тела 400-450 г. Протокол исследования был одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

За 10 дней до экспериментов животным была выполнена предварительная оперативная подготовка, заключающаяся во вживлении зонда в антральный отдел желудка. После фиксации зонд проводили через мягкие ткани брюшной стенки и тазовой области и затем протаскивали

под кожей хвоста и выводили наружу. Брюшную полость ушивали послойно. После чего животные помещались в металлические индивидуальные клетки.

Все животные содержались в лаборатории, в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20-24°C и влажности 45-65%, с режимом освещенности 12/12: 8-20 ч – свет, 20-8 ч – сумеречное освещение.

В экспериментах в качестве стандартной диеты использовали изокалорическую смесь для энтерального питания «Нутризон», содержащую 16% белка, 49% углеводов и 35% жиров.

На протяжении эксперимента в течение 21 дня ежедневно животным контрольной группы (n=9) внутрижелудочно вводили смесь «Нутризон», крысам опытной группы (n=10) также внутрижелудочно ежедневно вводили смесь «Нутризон» с добавлением кукурузного масла, что соответствовало дополнению к основному рациону 40%-ной доли жира от общей суточной калорийности.

В начале эксперимента и по его окончании, перед эвтаназией, у всех животных измеряли массу тела. На 22-й день эксперимента после введения летальной дозы наркоза и вскрытия брюшной полости отбирали печень, почки, надпочечники, селезенку, слепую кишку для определения относительной массы ор-

ганов и проводили взятие образцов из левой боковой доли печени для гистологического анализа. Для этого материал фиксировали 12%-ным нейтральным формалином, делали парафиновые срезы толщиной 7 мкм, окрашивание – гематоксилин-эозином. Срезы просматривали на микроскопе «Биомед-2» (Россия) с применением цифровой фотокамеры с архивацией изображений.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0. Для каждой группы животных для всех параметров рассчитывали среднее арифметическое значение, стандартное отклонение, медиану, персентили. В связи с тем, что распределения значений не носили нормального характера, данные в окончательном варианте представляли как медиану и персентили – Me (25; 75)%. При сравнении данных значений относительной массы органов опытной группы с контрольной группой использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались значения при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Анализ данных показал, что содержание животных на высокожировом рационе в течение трех недель приводит к изменению относительной массы внутренних органов (табл.). Наблюдалось

Таблица

Относительная масса органов, Me (25; 75)%

Орган	Контрольная группа	Опытная группа
Печень	2,45 (2,26; 2,60)	2,58 (2,49; 2,72)
Почки	0,52 (0,51; 0,52)	0,54 (0,53; 0,57)*
Селезенка	0,22 (0,20; 0,28)	0,30 (0,25; 0,30)
Надпочечники	0,015 (0,014; 0,016)	0,016 (0,014; 0,017)
Слепая кишка	0,67 (0,67; 0,71)	0,58 (0,54; 0,63)

Примечание: * – отличия опытной группы от контрольной статистически значимы, $p < 0,05$.

статистически значимое по сравнению с контролем увеличение относительной массы почек. Относительная масса печени и селезенки статистически значимо не изменялись, однако имелась соответствующая тенденция.

У крыс контрольной группы морфологическая структура гепатоцитов соответствовала норме. Печеночные пластинки начинались от центральной вены, дольки печени располагались веерообразно от центра к периферии.

У крыс опытной группы в печени нарушалось пластинчатое строение,

происходила дезорганизация гепатоцитов. Наблюдалось расширение внутридольковых синусоидных кровеносных капилляров и изменение направленности печеночных пластинок. Гепатоциты были с плохо выраженной цитолеммой, содержали мелкие капли жира разного размера (рис. 1).

Между печеночными пластинками отмечалось увеличение количества макрофагов, которые имели вытянутую или звездчатую форму, лейкоцитов (рис. 2). В центральной вене нередко наблюдали стаз, что, вероятно, приводило

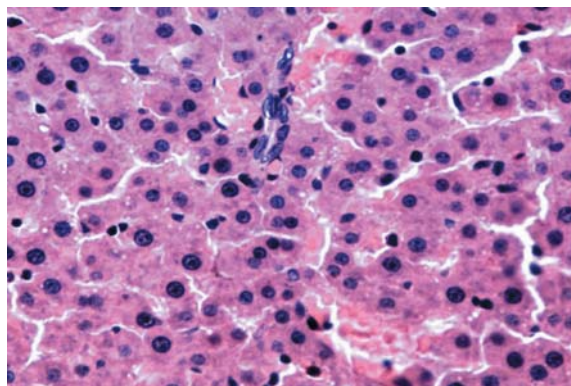


Рис. 1. Гепатоциты с плохо выраженной цитолеммой, содержат мелкие капли жира, разнообразной формы, имеют разное количество ядер. Гематоксилин-эозин. Ув. x10 (окуляр), x40 (объектив).

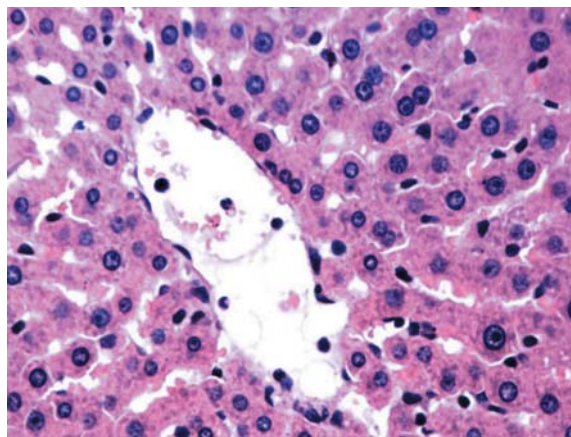


Рис. 2. Пикноз и хроматолиз ядер гепатоцитов, различное их функциональное состояние. Гематоксилин-эозин. Ув. x10 (окуляр), x40 (объектив).

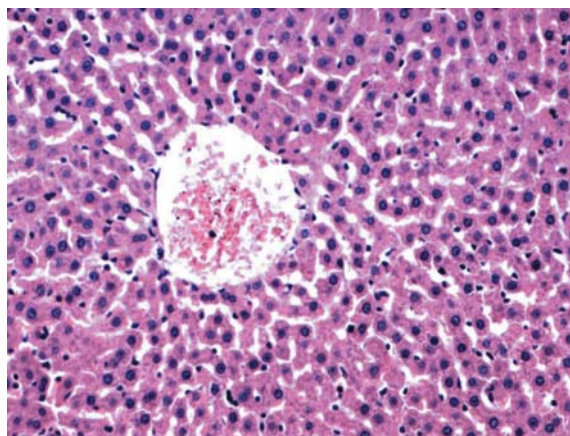


Рис. 3. Расширение внутридольковых синусоидальных кровеносных капилляров и дезорганизация печеночных пластинок. Гематоксилин-эозин. Ув. х8 (окуляр), х20 (объектив).

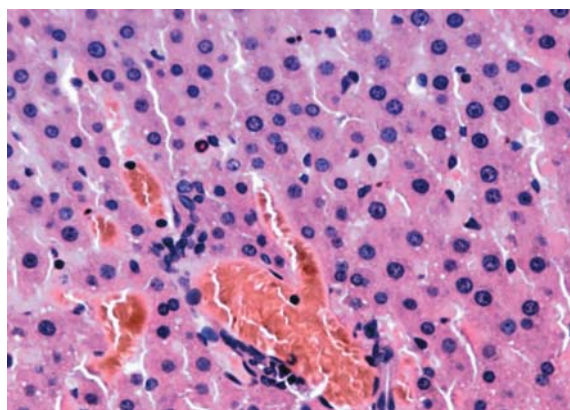


Рис. 4. Микроциркуляторные расстройства в печени крыс опытной группы при мелкокапельной жировой дистрофии. Гематоксилин-эозин. Ув. х10 (окуляр), х20 (объектив).

к изменению и увеличению перисинусоидального пространства (рис. 3, 4).

Наряду с дистрофическими изменениями в печеночных дольках происходила и функциональная перестройка. В них наблюдались признаки регенераторной активности, которая выражалась в клеточном полиморфизме. Подтверждением этого являлась и гипертрофия гепатоцитов с появлением полиплоидных двуядерных, и, реже, трехядерных клеток.

Важно отметить, что, в отличие от человека, патологические изменения у крыс сохраняются на протяжении 1-1,5 мес., после чего подвергаются регрессии.

Закключение

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о том, что высокожировая нагрузка способствует развитию деструктивно-дистрофических изменений ткани печени,

морфологически классифицирующихся как стеатоз. Это связано с тем, что макрофаги печени, активно захватывая липиды, не успевают их биотрансформировать. В результате чего увеличивается как количество измененных макрофагов, так и количество жира в печени. Параллельно с вышеописанными изменениями в исследованных органах удалось выявить наличие компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на нивелирование морфофункциональных изменений. Процессы регенерации на данном этапе структурной реорганизации печени осуществляются, по-видимому, гипертрофией гепатоцитов. Увеличение массы почек является важным критерием компенсаторной гипертрофии данного органа в условиях повышения метаболической нагрузки [3], а, возможно, и ватной, для выведения накапливаемых продуктов метаболизма.

Список литературы

1. Байматов В.Н., Козлов В.Н., Иванов С.П. Структурные изменения печени у крыс при коррекции экспериментальных послерадиационных поражений // Морфология. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 27.
2. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., Егорова Е.Н., Миняев М.В., Петрова М.Б. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома (обзор литературы) // Верхневолжский медицинский журнал. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 34-39.
3. Медведев В.И. Адаптация человека. – СПб: ИМЧ РАН, 2003. – 584 с.
4. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Гвозденко Т.А., Жукова Н.В. Модификация состава жирных кислот печени крыс в условиях высокожирового рациона // Бюллетень СО РАМН. – 2012. – Т. 32, № 2. – С. 9-14.
5. Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types // J. of Molecular Endocrinology. – 2006. – V. 36, No. 3. – Pp. 485-501.
6. Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., et al. Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia // World J. Gastroenterol. – 2003. – No. 9. – Pp. 2045-49.
7. Gadja A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A. Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models // Laboratory Equipment. – 2008.
8. Hsu C.L., Wu C.H., Huang S.L., Yen G.C. Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats // J. of Agricultural and Food Chemistry. – 2009. – V. 57, No. 2. – Pp. 425-431.
9. Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis // Am. J. of Clin. Nutr. – 2004. – No. 3(79). – Pp. 502-509.

References

1. Bajmatov V.N., Kozlov V.N., Ivanov S.P. Strukturnye izmeneniya pecheni u krysv pri korrekcii ehksperimental'nyh posleradiacionnyh porazhenij [Structural changes in the liver of rats during correction of experimental post-radiation lesions]. Morphology. 2016. V. 149, No. 3. P. 27. (In Russian).
2. Leshchenko D.V., Kostyuk N.V., Belyakova M.B., Egorova E.N., Minyaev M.V., Petrova M.B. Dieticheski inducirovannye zhivotnye modeli metabolicheskogo sindroma (obzor literatury) [Diet-induced animal models of metabolic syndrome (Literature review)]. Verhnevolzhskij medicinskij zhurnal [Upper Volga Medical Journal]. 2015. V. 14, No. 2. Pp. 34-39. (In Russian).
3. Medvedev V.I. Adaptatsiya cheloveka [Human adaptation]. Saint-Petersburg: IMCh RAN, 2003. 584 p. (In Russian).
4. Novgorodceva T.P., Karaman Yu.K., Gvozdenko T.A., Zhukova N.V. Modifikatsiya sostava zhirnykh kislot pecheni krysv v usloviyakh vysokozhirovogo raciona [Modification of the fatty acids of rat liver in conditions of highfat load]. Byulleten' SO RAMN [The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences]. 2012. V. 32, No. 2. Pp. 9-14. (In Russian).
5. Buettner R., Parhofer K.G., Woenckhaus M., et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. J. of Molecular Endocrinology. 2006. V. 36, No. 3. Pp. 485-501.

6. *Fan J.G., Zhong L., Xu Z.J., et al.* Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J. Gastroenterol.* 2003. No. 9. Pp. 2045-49.
7. *Gadja A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A.* Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models. *Laboratory Equipment.* 2008.
8. *Hsu C.L., Wu C.H., Huang S.L., Yen G.C.* Phenolic compounds rutin and o-coumaric acid ameliorate obesity induced by high-fat diet in rats. *J. of Agricultural and Food Chemistry.* 2009. V. 57, No. 2. Pp. 425-431.
9. *Lieber C.S., Leo M.A., Mak K.M., et al.* Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. of Clin. Nutr.* 2004. No. 3(79). Pp. 502-509.

The effect of high fat diets on the morphofunctional state of the liver of rats

**V.N. Baymatov, N.S. Tropskaya, E.A. Kislyakova, I.G. Vilkova,
O.S. Kislitsyna, T.S. Popova**

The effect of the high fat diets on the morphofunctional state of the liver was studied. The experiments were performed on 19 rats, which for three weeks were intragastrically injected with standard nutrient mixture (control group) or standard nutrient mixture with corn oil (experimental group), which corresponded to the addition to the basic diet of 40% fat content calorie content. It is revealed that high-fat load leads to the formation of steatosis and inflammatory infiltration of the liver.

Key words: high fat diets, corn oil, steatosis, rats.