

МОДЕЛЬ ЖИРОВОГО ГЕПАТОЗА КРЫС ПРИ ВЫСОКОЖИРОВОЙ И ВЫСОКОУГЛЕВОДНОЙ ДИЕТЫ

Илясов Азиз Сайтмуродович — доктор биологических наук, профессор, Навоийский инновационный университет (Навои, Узбекистан)

Джуманова Наргиза Эшмаматовна — соискатель, Навоийский инновационный университет (Навои, Узбекистан)

Аннотация

Целью исследования являлось изучение морфофункциональные изменений печени при воздействии высокожировой и высокоуглеводной (ВЖВУД) диеты в эксперименте. Работа выполнена на лабораторных животных, получавших ВЖВУД в течение определённого периода. Проведён комплекс гистологических исследований с использованием стандартных и специальных методов окраски (*Гематоксилин-эозин, Ван – Гизон, Судан III*). В результате выявлены характерные признаки жирового гепатоза (ЖГ): увеличение размеров гепатоцитов, наличие в цитоплазме множества липидных вакуолей, смещение ядер к периферии клеток, дезорганизация балочной структуры и умеренные сосудистые изменения. Полученные данные подтверждают возможность воспроизведения ЖГ с помощью ВЖВУД, что делает данную модель перспективной для изучения патогенеза жировой дистрофии печени.

Ключевые слова: экспериментальная модель, неалкогольная жировая болезнь печени, высокожировой и высокоуглеводной диета.

A MODEL OF FATTY HEPATOSIS IN RATS WITH A HIGH-FAT AND HIGH-CARBOHYDRATE DIET

Aziz Saitmurodovich Ilyasov

Doctor of Biological Sciences, Professor, Navoi Innovation University (Navoi, Uzbekistan)

Nargiza Eshmamatovna Jumanova

PhD Candidate, Navoi Innovation University (Navoi, Uzbekistan)

Abstract

The aim of this study was to investigate the morphofunctional changes in the liver experimentally induced by a high-fat, high-carbohydrate (HFHC) diet. The study was performed on laboratory animals given HFHC for a specific period. A series of histological examinations were performed using standard and specialized staining

methods (hematoxylin and eosin, van Gieson, and Sudan III). Characteristic features of fatty liver disease (FHD) were identified: enlarged hepatocytes, the presence of numerous lipid vacuoles in the cytoplasm, peripheral displacement of nuclei, disorganization of the trabecular structure, and moderate vascular changes. The obtained data confirm the feasibility of reproducing FHD using HFHC, making this model promising for studying the pathogenesis of fatty liver disease.

Keywords: experimental model, non-alcoholic fatty liver disease, HFHC diet.

Неалкогольная жировая болезнь печени (*НАЖБП*) является наиболее распространенной патологией печени в мире, а неалкогольный стеатогепатит является второй по частоте причиной для трансплантации печени среди взрослого населения [**Maurice J, Manousou P. 2018**]. По мнению авторов ЖГ — самое распространенное хроническое заболевание печени и увеличение распространенности ЖГ, малосимптомность клинической картины и недостаточное знание патогенеза этого заболевания, а также тяжесть его осложнений ставят эту проблему в ряд важнейших медико-социальных [**Tanaka N., et al. 2019**]. Экспериментальные модели ЖГ используются для изучения механизмов формирования, выяснения роли различных факторов внешней и внутренней среды в становлении патологических процессов в печени, а также позволяют детально изучить патогенез и изыскать средства для рациональной терапии и профилактики [**Cai-Yu Lian., et al. 2020**].

За последнее время многочисленными исследованиями выявлено, что у человека основным этиологическим фактором и предиктором НАЖБП является образ жизни: высококалорийное питание, избыточное потребление насыщенных жиров, рафинированных углеводов, подслащенных сахаром напитков и малоподвижный образ жизни [**Лазебник Л.Б., 2021; Джабраилова Х.А. и Исмаилова А.А. 2021**]. Избыточное поступление калорий приводит к нарушению липидного и углеводного обмена, увеличению поступления свободных жирных кислот в печень и их внутриклеточному накоплению. При этом развивается стеатоз гепатоцитов, сопровождающийся митохондриальной дисфункцией, окислительным стрессом и воспалительными реакциями, что может служить пусковым механизмом прогрессирования НАЖБП до стеатогепатита и фиброза печени [**Трашков А.П., и др. 2017; Кузнецова И.В., и др. 2021**].

Для изучения патогенеза ЖГ широко применяются экспериментальные модели, основанные на кормлении лабораторных животных высокожировым рационом. Такие модели позволяют воспроизводить ранние морфологические и метаболические изменения, характерные для НАЖБП у человека [**Линецкая О.И., и др. 2018**].

При ЖГ у животных наблюдаются увеличение массы тела, гипергликемия, гиперлипидемия, инсулинерезистентность и накопление жира в печени. Морфологически отмечается увеличение размеров гепатоцитов, появление жировых вакуолей в цитоплазме, смещение ядер к периферии клеток и дезорганизация балочной структуры [Бондаренко В.А. и Черных И.В. 2020]. Использованный ВЖВУД обеспечивает высокую степень поедаемости корма животными и поддержание нормального водного баланса организма. Показатель воспроизводимости ЖГ при использовании данной модели в течение 12 нед достигает 100% [Янко Р.В., и др. 2021].

Экспериментальный рацион ВЖВУД в наибольшей степени соответствует рациону питания людей, страдающих ЖГ. Создание подобных животных моделей ВЖВУД остается по-прежнему актуальной задачей экспериментальной медицины [Лещенко Д.В., и др. 2015; Лапшина Н.А., Климова И.А. 2021].

Цель исследования – изучение влияния ВЖВУД на морфофункциональные характеристики ткани печени и биохимические показатели сыворотки крови крыс.

Материалы и методы исследования. Гистологическое исследование является ключевым методом оценки изменений печени при ВЖВУД. Применение стандартных и специальных методов окраски (*гематоксилин-эозин, Судан III/IV, ван Гизон*) позволяет визуализировать структурные нарушения, отложение липидов и изменения соединительнотканного каркаса [Киреева Н. В., Громова С. А. 2020]. Эти методы дают возможность комплексно оценивать морфофункциональное состояние печени и динамику патологических процессов.

В эксперименте использовались белые беспородные крысы. Животные содержались в стандартных выварных условиях при свободном доступе к воде и пище, с соблюдением температурного режима и светового дня (12/12 ч). Все процедуры проводились в соответствии с этическими принципами обращения с животными и одобрены локальным этическим комитетом.

Контрольная группа $n = 10$ содержалась на стандартном лабораторном корме. Каждая крыса ежедневно съедала 20 г комбикорма: белки 24%, жиры 6%, углеводы 44% и чистую воду (*66,0 ккал в сутки на 1 крысу*) [Бирулина Ю.Г., и др., 2020]. Для моделирования ЖГ печени животные основной группы ($n = 20$) в течение срока 12 недель получали высококалорийный рацион, (ВЖВУД) включавший. Каждая крыса получала 6 г специально приготовленного гранулированного корма «ВЖВУД» комбинированного (жироуглеводного) высококалорийного рациона (*70% стандартного комбикорма с добавлением 30% свиного сальца*); 6,8 г свиного сала, 3,6 г белых сухарей; 3,6 г семян подсолнечника. Через день вместо воды подопытные крысы получали 10% раствор фруктозы (*161,5 ккал в сутки на 1 крысу*) [Янко Р.В., и др. 2021].

По окончании эксперимента животных выводили из опыта гуманным способом. Печень извлекали, фиксировали в 10 % нейтральном формалине, после чего проводили стандартную гистологическую обработку. Для получения срезов использовали микротом, толщина срезов составляла 4–5 мкм.

Срезы окрашивали следующими методами: Гематоксилин-эозин — для общей оценки гистоархитектоники ткани; Судан III — для выявления липидных включений (*на замороженных срезах*). Ван Гизон — для оценки соединительнотканного каркаса и состояния пучков коллагеновых волокон в печени.

Микроскопическое исследование проводили с использованием светового микроскопа с использованием цифровой камеры микропрепараты фотографировали на микроскопе Nikon Eclipse E100 (*Япония*), при увеличениях $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$. Документирование осуществляли с помощью цифровой камеры, подключённой к микроскопу.

Массу тела крыс еженедельно измеряли на весах SATURN (Китай). После выведения животных из эксперимента проводили диссекцию, взвешивание висцеральной жировой ткани и печени на лабораторных весах (Scout Pro, Китай). Массовые коэффициенты органов рассчитывали по формуле: массовый коэффициент = (масса органа/масса тела) 100 %.

Биохимические показатели сыворотки крови крыс (общий холестерин (*ОХ*), триглицериды (*ТГ*), общий билирубин (*ОБ*), аланинаминотрансферазу (*АЛТ*), аспартатаминотрансферазу (*АСТ*), щелочную фосфатазу (*ЩФ*)) определяли общепринятыми методами на биохимическом автоматическом анализаторе BS-200 (*Mindray, Китай*) с программным обеспечением BS-330, используя коммерческие наборы «Диасенс» (*Республика Беларусь*).

Для оценки содержания липидов (*ТГ*) в тканях органа использовали окраску суданом III. Исследование микропрепараторов, морфометрию и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа «Альтами LUM-1», оснащенного цифровой фотокамерой.

Экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 10.0. Распределение исследуемых показателей проверяли по критерию Шапиро–Уилка. При условии нормальности распределения использовали параметрические методы статистики: данные представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$), а статистическую значимость отличий оценивали на основании *t*-критерия Стьюдента. Данные считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. В группе интактных патологических изменений выявлено не было. В группе контрольных животных у 62,5 % животных выявлены морфологические признаки ЖГ. Данные о летальности лабораторных

животных в алиментарных моделях ЖГ немногочисленны. В основной массе источников она или не отмечалась, или такие результаты не были приведены.

У животных, получавших при ВЖВУД, к концу эксперимента отмечалось увеличение массы тела в среднем на 25–30% по сравнению с контрольной группой.

В исследовании где животные, получали гиперкалорийную диету с примерно равным соотношением жиров и углеводов (25,5% и 20,1% соответственно) к концу первого месяца исследования значимо прибавляли 40,0% от первоначальной массы тела.

У крыс экспериментальной группы визуально печень имела увеличенные размеры, более светлый оттенок и рыхлую консистенцию.

Гистологическое исследование выявило выраженные морфологические изменения в печени экспериментальных животных. На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, наблюдалось увеличение размеров гепатоцитов, наличие жировых вакуолей различной величины, преимущественно в периферических отделах цитоплазмы, со смещением ядер к периферии клеток. Нарушалась балочная структура печени, расширялись синусоиды, местами выявлялись признаки начальных дистрофических изменений.

В эксперименте при окрашивании Суданом III - липидные включения в гепатоцитах отчетливо визуализировались в виде красно-желтых капель, располагающихся диффузно. При окрашиваниях по Ван - Гизону выявили умеренное увеличение пучков коллагеновых волокон в портальных трактах и перisinусоидальных зонах, что может указывать на начальные проявления фиброза печени. В таблице 1. показаны морфологические показатели печени в эксперименте.

Таблица 1.

Морфологические показатели печени в эксперименте

№	показатель	группа животных	
		контроль	эксперимент
1	средняя масса печени, г	$7,2 \pm 0,5$	$9,4 \pm 0,7 *$
2	наличие жировых вакуолей в гепатоцитах (%)	$3,0 \pm 1,0$	$42,0 \pm 5,0 *$
3	смещение ядер гепатоцитов (%)	$1,0 \pm 0,5$	$36,0 \pm 4,0 *$
4	нарушение балочной структуры полей зрения (%)	0	$28,0 \pm 3,0 *$
5	коллаген в портальных трактах (оценка в баллы)	$1,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2 *$

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Анализ полученных данных эксперимента показывает, что ВЖВУД приводит к развитию типичных признаков ЖГ, аналогичных ранним стадиям ЖГ

у человека. Накопление липидов в гепатоцитах сопровождается нарушением структуры ткани и активацией соединительнотканного компонента.

Помимо морфологических изменений печени, у животных опытной группы отмечались выраженные метаболические сдвиги, отражающие развитие ЖГ и нарушения обмена веществ. Наиболее существенные различия наблюдались в показателях липидного и углеводного обмена.

Анализ ключевых биохимических показателей сыворотки крови исследуемых групп животных выявил наличие нарушений липидного, углеводного, а также белкового обменов у контрольной группы. Нарушения липидного обмена проявлялись синдромом дислипидемии, а именно: гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией у контрольной группы животных, нарастающими на протяжении всего эксперимента. При этом в показателях интактной группы никаких значимых колебаний данных показателей не наблюдалось. Отмечено, что средний уровень триглицеридов (*ТГ*) животных через 12 месяцев пребывания на ВЖВУД в 1,9 раза превышал уровень интактной группы соответственно ($p < 0,05$).

Аналогичная тенденция наблюдалась при анализе уровня общего холестерина (*ОХ*) сыворотки крови. Показатель группы животных с патологией через 12 месяцев эксперимента превышал показатель контрольной в 1,4 раза ($p < 0,05$).

По данным **Буценко Н.С. и Костина О.А. (2020)** накопление липидных вакуолей, смещение ядер к периферии клеток, дезорганизация балочной структуры, расширение синусоидов и умеренное увеличение количества коллагеновых волокон в портальных трактах сопровождаются значимыми сдвигами в биохимических показателях крови — гипергликемией, гиперлипидемией и повышением активности печёночных ферментов (*АЛТ, АСТ*), что свидетельствует о нарушении обмена веществ и повреждении гепатоцитов.

При исследовании уровня трансаминаз перед окончанием эксперимента выявлена тенденция к повышению концентраций АсАТ и АлАТ сыворотки крови по сравнению с контрольной группы животных. В таблица 2. показаны биохимические показатели крови в эксперименте.

Таблица 2.

Биохимические показатели крови в эксперименте

№	показатель	группа животных	
		контроль	эксперимент
1	Глюкоза, ммоль/л	$5,1 \pm 0,4$	$7,3 \pm 0,5$ *
2	Общий холестерин, ммоль/л	$2,8 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,4$ *
3	Триглицериды, ммоль/л	$0,9 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$ *
4	АЛТ, Ед/л	$35,0 \pm 5,0$	$78,0 \pm 8,0$ *
5	АСТ, Ед/л	$42,0 \pm 6,0$	$85,0 \pm 10,0$ *

6	Общий белок, г/л	70,0 ± 3,0	68,0 ± 4,0
---	------------------	------------	------------

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Влияние НАЖБП на показатели липидного обмена различно и зависит от морфологической формы заболевания, возраста пациентов, а также наличия сопутствующих заболеваний и синдромов [Khalil F., 2018]. При исследования показывают прямую зависимость уровней ОХ и ТГ сыворотки крови от степени НАЖБП.

Также, изменения биохимических показателей крови могут быть связаны с преобладанием тех или иных веществ в диете. В исследованиях с выраженным преобладанием углеводов в диете у животных уровень ТГ и ОХ повышался, в исследованиях с преобладанием жирового компонента диеты наблюдалась тенденция к снижению их концентраций [Оковитый С.В., и др. 2018].

Многие исследования подчеркивают связь между ЖГ и несколькими факторами МС, включая абдоминальное ожирение, инсулинерезистентность (ИР) и дислипидемию (гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, или их сочетание).

В эксперименте при ВЖВУД накопление ТГ в печени, вероятно, является следствием избыточного окисления жирных кислот и секреции ЛПОНП, поскольку оба этих пути активируются у пациентов с ЖГ. В таблица 3. показаны изменения липидного спектра в эксперименте.

По данными Сидоров П.И. и Алексеева А.Н. (2020) свободные жирные кислоты (СЖК) транспортируются в печень, где преобразуются в ТГ. Накопление триглицеридов в печени сопровождается нарушением энергетического обмена и способности инсулина подавлять продукцию глюкозы и ЛПОНП, что приводит к гипергликемии, гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии.

Таблица 3.

Изменения липидного спектра в эксперименте

№	показатель	контроль	эксперимент
1	ЛПВП (ммоль/л)	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,1 *
2	ЛПНП (ммоль/л)	1,1 ± 0,2	2,4 ± 0,3 *
3	Индекс атерогенности	1,2 ± 0,2	3,1 ± 0,4 *

* — различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

По мнению авторов возрастание концентрации липидов, холестерина и триглицеридов в ткани печени подопытных крыс свидетельствует о развитии ЖГ, который в дальнейшем может привести к стеатогепатиту и циррозу печени. В печени часть свободных жирных кислот этерифицируется с образованием триглицеридов, а часть вступает в реакции β -окисления, затем в цикл Кребса с

образованием аденоzinтрифосфата. При большом количестве жирных кислот образуется избыток триглицеридов, холестерина и липопротеинов очень низкой плотности, увеличивается их содержание в крови, а также накопление в гепатоцитах [Сидоров П.И. и Алексеева А.Н. 2020].

Развитие гипергликемии описано во множестве моделей НАЖБП при использовании гиперкалорийной диеты, насыщенной фруктозой. Так, добавление 10 % фруктозы в питьевую воду в эксперименте на крысах линии Wistar, приводило к возникновению гипергликемии на фоне сопутствующего ожирения и нарушений липидного обмена [Zhong F., 2020].

Таким образом, модель ЖГ крыс характеризуется не только схожестью условий формирования (*гиперкалорийное питание и с развитие висцерального ожирения*), но и морфологическими (*признаки стеатогепатита*) и биохимическими (*дислипидемия, гипергликемия*) проявлениями. Однако, значимым недостатком модели ЖГ является высокая продолжительность формирования патологии, и как следствие – ее трудозатратность. Но данные результаты исследование дополняют морфофункциональные показатели и подтверждают формирование у животных экспериментальной модели МС и ЖГ, аналогичной НАЖБП у человека.

ВЫВОДЫ.

1. Длительное воздействие ВЖВУД приводит к развитию у животных выраженных морфологических и биохимических изменений, (*возрастание концентрации глюкозы, триглицеридов и холестерина*) отражающих развитием гипергликемии и дислипидемии.
2. Повышение активности АЛТ и АСТ указывает на цитолитический синдром, связанный с нарушением морфофункциональных структур гепатоцитов что приводит развитием МС в печени.
3. Модель ЖГ на основе комбинированного ВЖВУД у всех лабораторных крыс может быть использована для дальнейшего изучения патогенеза заболевания, а также для профилактических подходов к данной патологии.

Список литературы

1. Бирулина Ю.Г., Иванов В.В., Буйко Е.Е., Быков В.В., Смаглий Л.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Гусакова С.В., Попов О.С., Васильев В.Н. Экспериментальная модель метаболического синдрома у крыс на основе высокожировой и высокоуглеводной диеты. // Бюллетень сибирской медицины. 2020; 19 (4): 14–20. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-14-20>.
2. Бондаренко В. А., Черных И. В. Патоморфологические изменения печени на фоне длительного высококалорийного питания //Российский журнал

- гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2020. – Т. 30, № 6. – С. 55–61.
3. Буценко Н.С., Костина О.А. Биохимические изменения при неалкогольной жировой болезни печени //Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – № 7. – С. 32–38.
 4. Джабраилова Х.А., Исмаилова А.А. Роль жировой дистрофии печени в формировании метаболического синдрома //Медицинский вестник. – 2021. – № 3. – С. 55–60.
 5. Киреева Н. В., Громова С. А. Гистологические изменения печени при моделировании ожирения у животных //Морфология. – 2020. – Т. 158, № 1. – С. 72–78.
 6. Кузнецова И. В., Петрова О. С., Лапшина Н. А. Морфологические аспекты ранних стадий неалкогольной жировой болезни печени //Российский медицинский журнал. – 2021. – № 3. – С. 45–51.
 7. Лапшина Н.А., Климова И.А. Морфофункциональные изменения печени при избыточном калораже рациона у лабораторных животных //Морфология. – 2021. – Т. 160, № 4. – С. 45–52.
 8. Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Туркина С.В., и др. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;(1):4–52.
 9. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., и др. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома (обзор литературы) //Верхневолжский медицинский журнал. — 2015. — Т. 14. — №2.
 10. Линецкая О.И., Нургалеева Е.А., Эткина Э.И. Динамика биохимических параметров крови крыс препубертатного возраста на фоне углеводного типа питания с дополнительной коррекцией микробиома желудочно-кишечного тракта биотиком //Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2018. Т. 6, №3. С. 366-373. doi:10.23888/HMJ201863366-373
 11. Оковитый С.В., Шустов Е.Б., Белых М.А., Кириллова Н.В., Спасенкова О.М., Иванов А.Г., Караваева А.В., Ткачева А. В. Моделирование неалкогольного стеатоза печени: особенности метаболических изменений в организме лабораторных животных. Биомедицина. 2018; 4:29–43.
 12. Сидоров П.И., Алексеева А.Н. Нарушения обмена липидов и морфология печени в условиях избыточного питания //Биомедицина. – 2020. – № 6. – С. 60–67.
 13. Трашков А.П., Брус Т.В., Васильев А.Г., Артеменко М.Р., Печатникова В.А., Гуменная М.А. Биохимический профиль крыс с неалкогольной жировой

- болезнью печени различной степени тяжести и его коррекция препаратом ремаксол. //Педиатр. 2017;8(4):78–85. DOI: 10.17816/PED8478-85.
14. Янко Р.В., Чака Е.Г., Зинченко А.С., Сафонов С.Л., Левашов М.И. Особенности моделирования жирового гепатоза у крыс разного возраста на основе высококалорийного рациона //Ожирение и метаболизм. — 2021. — Т. 18. — №4. — 387-397. doi: <https://doi.org/10.14341/omet12789>— С. 34-39.
 15. Cai-Yu Lian, Zhen-Zhen Zhai, Zi-Fa Li, et al. High fat diet triggered non-alcoholic fatty liver disease: A review of proposed mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*. 2020; 330:109-199. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109199>.
 16. Khalil F., Nabil Rafat M., Salah V., Attia M., Ibrahim W. Study of lipid profile in different grades of non-alcoholic fatty liver disease. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2018;73(8):7388–7393.
 17. Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Med (Lond)*. 2018;18(3):245-250. doi: <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-245>
 18. Tanaka N, Kimura T, Fujimori N, et al. Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World J Gastroenterol*. 2019;25(2):163-177. doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i2.163>
 19. Zhong F., Zhou X., Xu J., Gao L. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestion*. 2020;101(5):522–535. DOI: 10.1159/000501851.