

УДК 611.362:615.272.4

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСЛИПИДЕМИИ

Наталья Владимировна БИВАЛЬКЕВИЧ, Юлия Константиновна КАРАМАН

Владивостокский филиал ДНЦ ФПД СО РАМН — НИИ МКВЛ
690105, Владивосток, ул. Русская, 73г

Исследовано влияние высокожировой диеты на структуру ткани печени при моделировании алиментарной дислипидемии (ДЛП) в течение 180 суток. Установлено, что экспериментальная ДЛП, индуцированная высокожировой диетой, способствует быстрому развитию деструктивно-дистрофических процессов в печени, выражающихся в формировании стеатоза органа через 30 дней эксперимента, стеатогепатита — к 90 суткам и фиброза печени через 180 суток. Доказано, что высокожировая диета и дислипидемия являются важными факторами в патогенезе заболеваний печени.

Ключевые слова: алиментарная дислипидемия, стеатоз, стеатогепатит, фиброз печени.

В формировании нарушений липидного обмена (дислипидемий) приоритетная роль принадлежит печени, где происходят ключевые процессы мобилизации, переработки и биосинтеза липидов [1, 2]. Печень не только активно участвует в развитии дислипидемии, но и является органом-мишенью нарушений липидного обмена. В связи с этим большую группу заболеваний, ассоциированных с ДЛП, составляет патология гепатобилиарной системы (жировая болезнь печени, желчнокаменная болезнь) [1, 3]. Стеатоз печени является самым ранним проявлением повреждения органа при ДЛП. Прогрессирование стеатоза может сопровождаться воспалительно-некротическими явлениями, индуцирующими развитие стеатогепатита, а также запуском процессов фиброгенеза с формированием цирроза печени [1, 3, 4]. По данным литературы, формирование цирроза печени при алиментарной дислипидемии наступает в 7–16 % случаев [5, 6] и может длиться на протяжении долгого периода времени (5–15 лет). Дополнительными факторами, способствующими быстрому прогрессированию заболеваний печени, являются избыточная масса тела, инсулинорезистентность [5]. При этом сведений о значительной роли алиментарных факторов в патогенезе заболеваний печени неинфекционного генеза и скорости их прогрессирования крайне мало.

Принимая во внимание высокую распространенность стеатоза в популяции (46 % среди пациентов с избыточной массой тела и атерогенной гиперлипидемией), возможность прогрессирования жировой болезни печени в стеатогепатит и цирроз, актуальными являются изучение влияния

алиментарных факторов на формирование заболеваний гепатобилиарной системы, выявление точки перехода функциональных нарушений в структурные. В условиях наблюдения за пациентами эти задачи, как правило, неразрешимы из-за скудной и неспецифической клинической симптоматики, отсутствия достоверных биохимических маркеров, отражающих степень морфологического повреждения печени при ДЛП.

В этом отношении моделирование диетиндуцированной дислипидемии, запускающей механизмы повреждения печени у экспериментальных животных, позволит расширить представления о роли алиментарного фактора в патогенезе болезней гепатобилиарной системы, установить временные этапы развития заболеваний печени.

Цель исследования — изучить влияние высокожировой диеты на структуру ткани печени при моделировании алиментарной дислипидемии.

Материалы и методы

Объектом исследования стали половозрелые крысы-самцы линии Вистар ($n = 40$, масса $173 \pm 5,6$ г). Алиментарную ДЛП формировали с помощью гиперкалорийной высокожировой диеты (19 % топленого говяжьего сала и 2 % холестерина от общей массы рациона) в течение 180 суток [7]. Анализ ткани печени проводили через 30, 90 и 180 суток. Выделено 4 группы животных по 10 особей в каждой: контрольная группа — интактные крысы, находившиеся на стандартном рационе вивария; опытные группы — животные, содержавшиеся на экспериментальном рационе (30 суток — опытная группа 1; 90 суток — опытная группа 2; 180 суток — опытная группа 3).

Бивалькевич Н.В. — младш.н.с. лаборатории биомедицинских исследований

Караман Ю.К. — к.б.н., н.с. лаборатории биомедицинских исследований, e-mail: karaman@inbox.ru

Эвтаназию животных осуществляли путем декапитации под эфирным наркозом в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС [8]. Материалом исследования явились кровь, взятая утром натощак из шейной вены после декапитации крыс, ткань печени. В сыворотке крови с помощью наборов фирмы «Ольвекс» (Россия) определяли уровень общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой, низкой и очень низкой плотности (ХС ЛПВП, ХС ЛПНП и ХС ЛПОНП соответственно), рассчитывали индекс атерогенности (ИА) [9].

Для проведения гистологического исследования ткани печени небольшие фрагменты центральной части правой доли органа фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, приготовленного на 0,07М фосфатном буфере (рН 6,98). Обезвоживание тканей проводили в этиловом спирте возрастающей концентрации и заливали в парапласт. Далее с помощью микротомы (МЗП-01 «ТЕХНОМ», Россия) готовили срезы толщиной 7 мкм. Для гистологических исследований срезы окрашивали гематоксилин-эозином по Романовскому, пикрофуксином по Ван-Гизону на выявление коллагеновых волокон [10]. Препараты исследовали при помощи микроскопа фирмы «Carl Zeiss» (Германия) (ув. об. $\times 10$, $\times 40$ и $\times 100$).

При проведении статистической обработки результатов исследования после проверки нормальности распределения изучаемых параметров вычисляли среднее арифметическое значение (М), ошибку среднего арифметического значения (m). Статистическую значимость различий средних величин оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение показателей липидного обмена показало, что у крыс под влиянием атерогенного рациона на 30-е сутки формировалась алиментарная дислипидемия, проявляющаяся повышением уровня ОХС, ТГ, ХС ЛПОНП в сыворотке крови (табл.). При этом содержание ХС ЛПВП снижалось более чем в 2 раза, а индекс атерогенности увеличился на порядок ($p < 0,001$). Через 90 суток алиментарной нагрузки концентрация ОХС в крови выравнивалась с таковым показателем у контрольных крыс, уровни ТГ и ХС ЛПОНП достоверно снижались более чем в 2 раза. У крыс, получавших высокожировую диету в течение 180 суток, отмечено достоверное повышение содержания ОХС в крови и индекса атерогенности. Полученные результаты характеризуют динамику нарушений липидного обмена на всех этапах эксперимента. Обнаруженные при этом низкие значения концентрации ХС ЛПОНП у крыс 2-й и 3-й опытных групп являются одним из критериев метаболических нарушений в печени и развития стеатогепатита. Известно, что уменьшение в крови уровня липопротеидов очень низкой плотности может быть следствием нарушения синтеза аполипопротеинов и сборки ЛПОНП в печени.

Морфологические исследования ткани печени крыс с 30-суточной ДЛП выявили значительные изменения по сравнению с морфологией печени контрольных крыс (рис., а). У животных опытной группы 1 наблюдалось изменение балочной структуры печеночных долек, гепатоциты в паренхиме располагались беспорядочно (рис., б). Гепатоциты плотно прилегали друг к другу, что приводило к сужению просветов синусоидных капилляров. У значительной части гепатоцитов имелись признаки дистрофии: гипертрофия и из-

Таблица

Уровень липидов сыворотки крови у крыс при формировании алиментарной ДЛП, $M \pm m$

Показатели, ммоль/л	Контрольная группа, n = 10	Сроки развития алиментарной дислипидемии		
		30 дней (опытная 1), n = 10	90 дней (опытная 2), n = 10	180 дней (опытная 3), n = 10
ОХС	$1,57 \pm 0,04$	$3,34 \pm 0,04^{***}$	$1,68 \pm 0,08$	$2,04 \pm 0,17^*$
ТГ	$1,12 \pm 0,04$	$1,95 \pm 0,06^{***}$	$0,51 \pm 0,05^{***}$	$1,17 \pm 0,08$
ХС ЛПВП	$0,67 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,02^{***}$	$0,50 \pm 0,08$	$0,5 \pm 0,15$
ХС ЛПНП	$0,7 \pm 0,16$	$0,84 \pm 0,196$	$0,96 \pm 0,12$	$0,9 \pm 0,06$
ХС ЛПОНП	$0,65 \pm 0,19$	$1,14 \pm 0,29^*$	$0,23 \pm 0,02^{**}$	$0,20 \pm 0,03^{***}$
ИА, у.е.	$1,43 \pm 0,15$	$11,87 \pm 1,55^{***}$	$2,46 \pm 0,35$	$7,4 \pm 0,8^{***}$

Примечание: (*) — статистическая значимость различий относительно контрольной группы:

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

менение формы клеток в сочетании со сниженной базофилией и вакуолизацией цитоплазмы. Отдельные клетки приобретали вид пустотелых структур с эктопично расположенным пикнотическим ядром, что отражает параллельное развитие деструктивных процессов [11]. Результаты исследования структуры ткани печени опытной группы 1 показали, что через 30 дней формирования алиментарной ДЛП у крыс развивается стеатоз печени, проявляющийся гипертрофией гепатоцитов, накоплением в них избыточного количества жира.

У животных, получавших высокожировую диету в течение 90 суток, формировался стеатогепатит, что подтверждалось обнаружением фокальных участков гепатоцитов в состоянии некробиоза с сопутствующей лимфомакрофагальной инфильтрацией (рис., в). В препортальной и центральной зонах долек синусоидные капилляры были расширены, лимфатические сосуды имели крупные раз-

меры, центральные вены полнокровные. Жировая дистрофия гепатоцитов сохранялась и имела вид мелкокапельной и крупнокапельной вакуолизации. Кариоплазма была плотная с 1-2 ядрышками. Обнаруживалось видимое увеличение размеров гепатоцитов по сравнению с контрольной группой животных. Из результатов исследования следует, что высокожировая диета на 90-е сутки развития ДЛП приводит к формированию осложненной формы жирового гепатоза — стеатогепатита, характеризующейся явлениями мембранодеструкции, некроза ткани, нарушением гистологической архитектоники мофофункциональных единиц печени (ацинусы, портальная и классическая дольки).

На 180 сутки экспериментальной диеты морфологическая картина ткани печени крыс подверглась значительным деструктивно-дистрофическим изменениям, выразившимся в увеличении площади некротизированных участ-

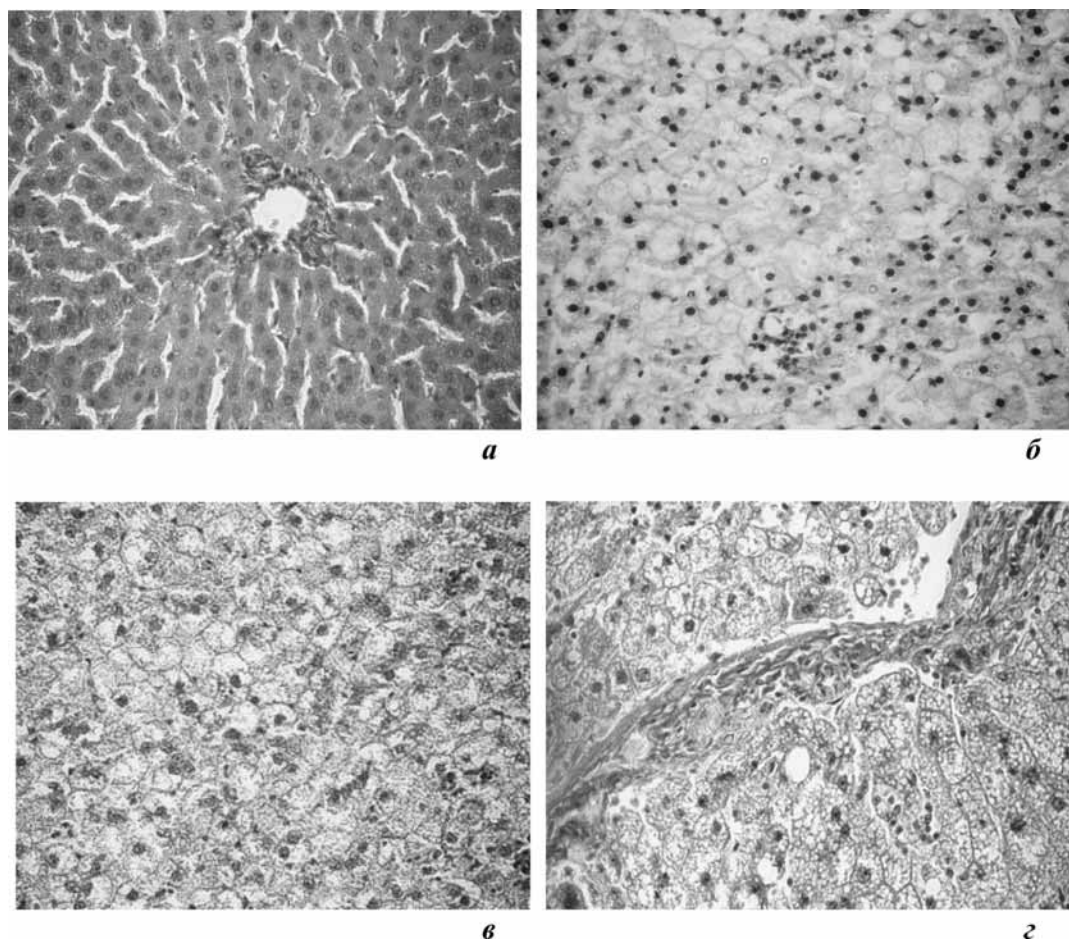


Рис. Гистологическое строение ткани печени крыс (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$).
 а — контрольная группа. б — опытная группа 1 (ДЛП 30 суток). Гипертрофированные гепатоциты, наполненные мелкокапельными и крупнокапельными жировыми включениями, ядро смещено к периферии клетки. Просветы синусоидных капилляров сужены. в — опытная группа 2 (ДЛП 90 суток). Участок гистологического среза со смешанным типом стеатоза и некротизированными гепатоцитами.
 г — опытная группа 3 (ДЛП 180 суток). Окраска пикрофуксином по Ван-Гизону, ув. $\times 400$.
 Участок гистологического среза с фиброзом. Гидропическая дистрофия гепатоцитов.

ков (10–15 % от общей площади исследуемых участков печени). Деструктивные изменения гепатоцитов сопровождались мезенхимально-клеточной реакцией, особенно заметной в зонах портальных трактов, где обнаруживалось скопление круглоклеточной инфильтрации. Гепатоциты не образовывали трабекул, располагались беспорядочно, синусоиды резко сужены. Было отмечено расширение крупных портальных трактов за счет разрастания стромы и заполнения ее воспалительным инфильтратом. Некоторые портальные тракты были с некротическими изменениями сосудов. Стенки таких сосудов слабо различались. Выявлялась деструкция желчных протоков. На препаратах, окрашенных по Ван-Гизону, обнаруживалось увеличение количества коллагеновых волокон. Они распространялись из портальных пространств, образуя картину портального и незначительной степени септального фиброза печени (рис., г). Гепатоциты имели крупные размеры, цитоплазма мелкочаечистая просветленная, ядра имели сморщенный вид и были смещены к периферии клетки. Данная морфологическая картина характеризует развитие гидропической дистрофии печени. На основании полученных данных следует, что 180-дневное воздействие на животных гиперкалорийной диетой способствовало патологическому структурно-функциональному преобразованию ткани печени, активизации процессов фиброгенеза, приводящим к замещению паренхиматозной печеночной ткани на соединительную, формированию фиброза. Отсюда следует, что пищевой дисбаланс и развившаяся вследствие этого дислипидемия индуцируют быстрое формирование заболеваний гепатобилиарной системы.

Результаты морфологического исследования ткани печени крыс с алиментарной дислипидемией позволили установить влияние высокожировой диеты на развитие деструктивно-дистрофических изменений структурно-функциональной организации печени, морфологически классифицирующихся как стеатоз, стеатогепатит и фиброз. Рацион, насыщенный жирами и холестерином, способствует отложению липидов в клетках печени, что приводит к гипертрофии гепатоцитов, смещению ядер к периферии клеток, сужению просветов синусоидных капилляров. Эти изменения запускают патогенез заболеваний печени. Наличие избыточного количества легкоокисляемого жира в печени активирует процессы перекисного окисления липидов [1]. Продукты липопероксидации способны повреждать мембраны гепатоцитов, активировать звездчатые клетки печени с развитием воспаления и фиброза. Уменьшение диаметра синусоидных капилляров приводит к гипоксии ткани, эндотоксинемии, что также способствует процессам мембранодеструкции и некроза.

Таким образом, установлено, что пролонгированное влияние высокожировой диеты и формирующие липидные нарушения являются важными этиопатогенетическими факторами индукции и прогрессирования заболеваний гепатобилиарной системы.

Литература

1. Бувеева Е.Л., Драпкина О.М., Ивашкин В.Т. Атерогенная дислипидемия и печень // Рос. мед. вести. 2008. (1). 17–23.
Bueverova E.L., Drapkina O.M., Ivashkin V.T. Atherogenous dyslipidemia and liver // Ros. med. vesti. 2008. (1). 17–23.
2. Дибиров А.Д., Петухов В.А., Сон Д.А. и др. Морфофункциональные изменения органов гепатопанкреатобилиарной системы при экспериментальной дислипидемии // Бюлл. exper. биол. и мед. 2000. 130. (7). 45–50.
Dibirov A.D., Petuhov V.A., Son D.A. et al. Morphofunctional changes of organ hepatopancreatic systems at experimental dyslipidemia // Bull. exper. biol. and med. 2000. 130. (7). 45–51.
3. Лазебник Л.Б., Зеленогородская Л.А., Морозов И.А. и др. Клинико-морфологические изменения печени при атерогенной дислипидемии и при лечении статинами // Тер. архив. 2003. (5). 8–12.
Lazebnik L.B., Zelenogorskaya L.A., Morozov I.A. et al. Clinical – morphological changes of a liver at atherogenous dyslipidemia and at treatment statine // Ter. arkh. 2003. (5). 8–12.
4. Григорьев П.Я. Жировой гепатоз (жировая инфильтрация печени): диагностика, лечение и профилактика // Рус. мед. журн. 2002. (1). 30–31.
Grigoriev P.J. Fatty hepatosis (fatty infiltration a liver): diagnostics, treatment and preventive maintenance // Ros. med. zhurn. 2002. (1). 30–31.
5. Chitturi S., Farrell G.C. Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis // Semin. Liver. Dis. 2001. 21. 27–41.
6. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. Пер. с англ. М.: ГЭОТАР – Медицина, 1999. 860 с.
Sherlock S., Dooley J. Diseases of a liver and biliary system. Translation from English. M.: GEOTAR – Medicine, 1999. 860 p.
7. Fan J. Effect of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia // World J. Gastroenterol. 2003. 9. (9). 2045–2049.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasburg: Council of Europe, 1986. 51 p.
9. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов, липопротеидов и его нарушения. СПб.: Питер Ком, 1999. 512 с.
Klimov A.N., Nikulchaeva N.G. Exchange lipids, lipoproteids and its infringements. SPb.: Piter Kom, 1999. 512 p.

10. Пирс Э. Гистохимия. М.: Изд-во иностр. литературы, 1962. 967 с.

Pirs A. Gystochemistry. M.: Izd-vo inostr. literatury, 1962. 967 p.

11. Логинов А.С., Аруин Л.И. Клиническая морфология печени. М.: Медицина, 1985. 240 с.

Loginov A.S., Aruin L.I. Clinical liver morphology. M.: Medicine, 1985. 240 p.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF THE LIVER AT EXPERIMENTAL DYSLIPIDEMIA

Natalia Vladimirovna BIVALKEVICH, Yulia Konstantinovna KARAMAN

The Vladivostok department of the Far Eastern research center for physiology and respiratory pathology of SB RAMS – Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment

690105, Vladivostok, Russkaya st., 73g

It is investigated influence high fat diet on structure of a livers tissue at modelling alimentary dyslipidemia (DLP) within 180 days. It is established, that experimental DLP, induced of high fat diet, promotes fast development of is destructive-dystrophic processes in a liver, expressed in formation steatosis of organ in 30 days of experiment, steatohepatitis – by 90 days and fibrosis to a liver in 180 days. It is proved, that high fat diet and dyslipidemia are the important factors in pathogenesis of liver diseases.

Key words: alimentary dyslipidemia, steatosis, steatohepatitis, fibrosis of the liver.

Bivalkevich N.V. – junior scientist of the laboratory of biomedicine researches

Karaman Yu.K. – candidate of biological sciences, research worker of the laboratory of biomedicine researches, e-mail: karaman@inbox.ru