

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 (M), 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 снизились 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-

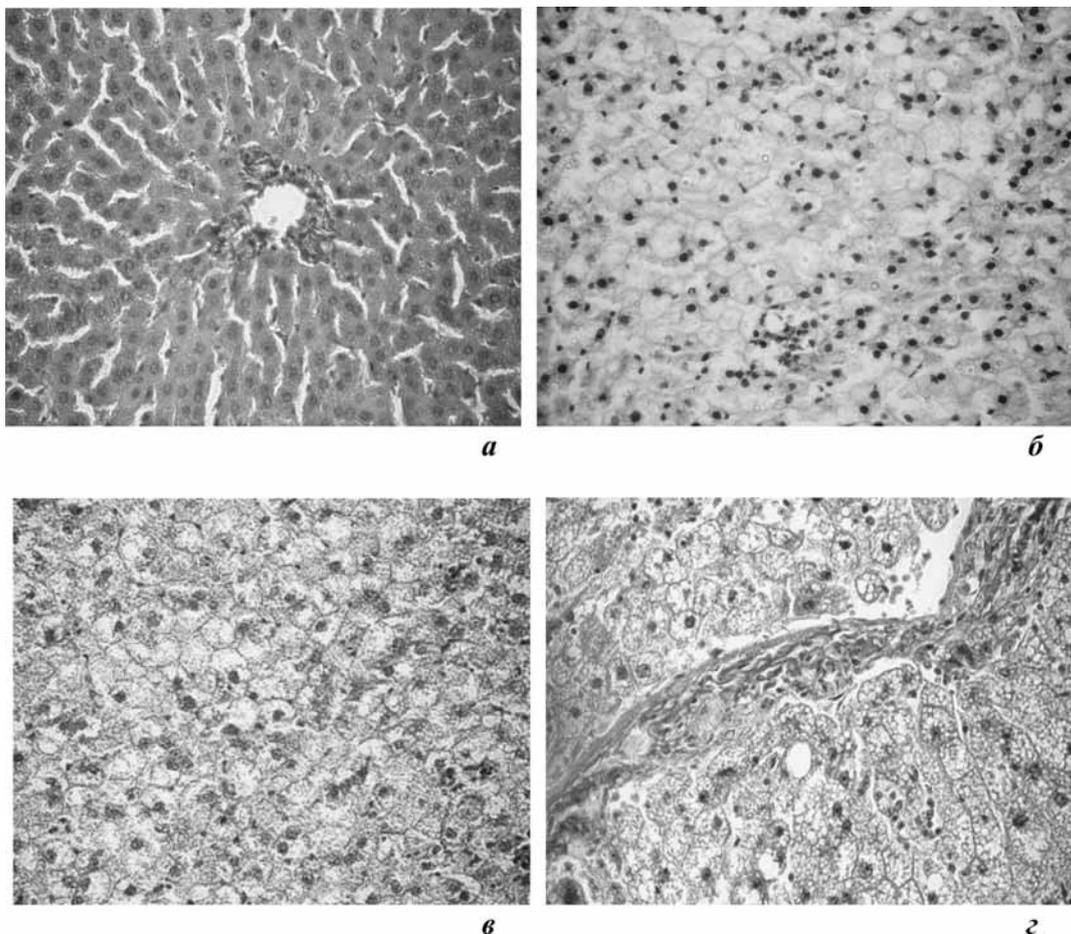


Рис. Гистологическое строение ткани печени крыс (окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$).
а – контрольная группа. б – опытная группа 1 (ДЛП 30 суток). Гипертрофированные гепатоциты, наполненные мелкокапельными и крупнокапельными жировыми включениями, ядро смещено к периферии клетки. Просветы 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 мелкочаеистая 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 активизирует 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 формирующиеся липидные нарушения являются важными этиопатогенетическими факторами индукции и прогрессирования заболеваний гепатобилиарной системы.

Литература

1. Буеверова 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. экспер. биол. и мед. 2000. 130. (7). 45–50.
Dibirov A.D., Petuhov V.A., Son D.A. et al. Morphofunctional changes of organ hepatopancreobiliary 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