

# Патоморфологическое исследование печени мышей *Mus musculus C57BL6* на фоне атерогенной диеты

Р.Ф. Гайфуллина<sup>1</sup>, М.Н. Катина<sup>1</sup>, С.Р. Абдулхаков<sup>2</sup>, Л.Р. Касимова<sup>1</sup>,  
А.Р. Абдулхакова<sup>2</sup>, А.А. Ризванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет, Казань

## Liver pathomorphology of *Mus musculus C57BL6* on atherogenic diet

R.F. Gaifullina<sup>1</sup>, M.N. Katina<sup>1</sup>, S.R. Abdulhakov<sup>2</sup>, L.R. Kasimova<sup>1</sup>, A.R. Abdulhakova<sup>2</sup>, A.A. Rizvanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan Federal Volga Region University, Kazan

<sup>2</sup>Kazan State Medical University, Kazan

Атеросклеротическое поражение сосудов – одна из ведущих причин наступления смерти и инвалидизации населения в мире. Печень играет большую роль в патогенезе атерогенной дислипидемии, развитии и прогрессировании атеросклероза. Мы исследовали влияние атерогенной диеты на морфологию печени мышей *Mus musculus C57BL6*, содержащихся на атерогенной диете. Эта линия мышей, в отличие от некоторых других линий, способна к естественному развитию атеросклероза. Спустя 14 недель скармливания животным атерогенной диеты мы наблюдали выраженную гепатомегалию (масса печени составила 9% массы тела животных), деформацию долчатой структуры печени. Также были обнаружены явления микро- и макровезикулярного стеатоза, апоптоза, фиброза, обнаружена воспалительная лейкоцитарная инфильтрация. Таким образом, печень не только играет важную роль в развитии дислипидемии, но и сама является органом-мишенью при нарушении обмена липидов.

**Ключевые слова:** атеросклероз, дислипидемия, печень, стеатоз, фиброз, апоптоз, воспаление.

Атеросклеротическое поражение сосудов способно привести к таким тяжелым патологическим состояниям как ишемический инсульт и инфаркт миокарда – заболеваниям, являющимся ведущими причинами смерти и наступления инвалидности во всех развитых странах мира [1]. Именно поэтому актуально исследование атерогенеза и поиск новых методов борьбы с атеросклерозом. С этой целью используются модели атеросклероза у лабораторных животных путем скармливания им атерогенной диеты и за счет генетических модификаций (например, АроE-нокаутные мыши, LDLR-дефицитные мыши) [2]. Однако атеросклероз это мультифакториальное заболевание, обусловленное генетической предрасположенностью, образом жизни, вредными привычками, связанное с заболеваниями других органов и систем [3]. Вследствие того, что генно-модифицированные модели позволяют изучать только отдельные аспекты атерогенеза, остаются актуальными модели с использованием атерогенной диеты, позволяющие изучать заболевание в условиях, наиболее приближенных к образу жизни и диете людей [4].

Мышь *Mus musculus C57BL6* являются линейными инbredными не трансгенными животными.

*Atherosclerosis is one of the leading causes of disability and death worldwide. Liver plays a huge role in pathogenesis of atherogenic dyslipidemia, development and progression of atherosclerotic lesions. We studied the effect of atherogenic diet on liver morphology in animal model of diet-induced atherosclerosis in mice *Mus musculus C57BL6*. This strain has a natural ability to develop atherosclerosis, while some other mouse stains has not. After 14 weeks on atherogenic diet a severe hepatomegaly (9% of body mass) and lobular structure deformation was found. We also observed signs of micro- and macrovesicular steatosis, cell apoptosis, fibrosis and inflammatory leukocyte infiltration. So, liver not only plays an important role in dyslipidemia, but it is also a target-organ in lipid metabolism imbalance.*

**Key words:** atherosclerosis, dyslipidemia, liver, steatosis, fibrosis, apoptosis, inflammation.

У них отмечается атеросклеротическое поражение аорты при содержании их на атерогенной диете [5]. Существуют различные виды атерогенных диет, большинство из них основаны на большом количестве жиров в рационе и добавке холестерина. Можно предположить, что скармливание животным такого нефизиологичного для них корма может оказать воздействие не только на процесс атерогенеза, но и на морфологию и функцию других органов и систем. Печень ответственна за синтез Аро-белков, входящих в состав липопротеинов, синтез и обмен холестерина, за счет чего она активно участвует в патогенезе дислипидемии, которая выявляется у 20–80% больных неалкогольной жировой болезнью печени [6].

Моделирование атеросклероза на животных с помощью специальных диет изучается с начала XX в. в известных работах отечественных ученых Н.Н. Аничкова и С.С. Халатова. Поэтапно изучена морфология атеросклеротических поражений крупных сосудов [2]. Однако практически не встречается сообщений об экстраваскулярных изменениях в организме животных при содержании их на атерогенной диете. В данном исследовании исследовано воздействие

e-mail: raushania13@rambler.ru

скармливания животным атерогенной диеты на морфологию печени.

### **Материал и методы**

**Лабораторные животные.** В нашем исследовании использовались взрослые самцы мышей *Mus musculus* C57Bl6. Животные SPF-категории получены из питомника лабораторных животных «Пущино». Всего было 10 животных, из них 5 содержались на атерогенной диете, 5 составляли контрольную группу, содержащуюся на стандартном рационе вивария. Содержание и использование лабораторных животных соответствовало правилам, принятым в Российской Федерации, рекомендациям локального этического комитета и национальным законам [7].

**Атерогенная диета.** В качестве атерогенной диеты использовался модифицированный рацион Paigen, в состав которого входят: холевая кислота (Вектон, 81-25-4) 0,5%, холестерин (Panreac, 371274) 2%, подсолнечное масло 20%, стандартный корм для лабораторных животных (Лабораторкорм) 77,5%. Животные содержались на атерогенной диете в течение 14 нед., после чего были выведены из эксперимента.

**Морфологическое исследование.** Для микроскопического исследования морфологических изменений в печени животных на фоне атерогенной диеты использовали иммунофлуоресцентное окрашивание поперечных криостатных микросрезов ткани печени. Проводили формалиновую перфузию животных 10% раствором формалина, выделенную печень помещали в вышеуказанный раствор формалина на 24 ч, после чего раствор заменялся на раствор для хранения тканей (30% раствор сахарозы (Sigma, США) в фосфатно-солевом буфере PBS (Биолот, Россия) с добавлением азота натрия (Sigma, 71290) в качестве консерванта). Для изготовления срезов использовали микротом-криостат HM560 Cryo-Star (Carl Zeiss, Германия), толщина срезов 8 мкм. Полученные срезы подсушивали на воздухе в течение 2 ч, регидратировали 5 мин в растворе PBS, инкубировали при комнатной температуре в увлажненной

камере с 0,1% раствором Тритона X-100 в течение 20 мин для пермобилизации мембранны, инкубировали с 10% раствором лошадиной сыворотки (Биолот) в PBS для блокирования неспецифического связывания антител. Затем срезы инкубировали в течение 1 ч с первичными антителами, разведенными в соотношении 1:100 в растворе PBS с добавкой 1% лошадиной сыворотки. Инкубировали 45 мин с соответствующими вторичными антителами, коньюгирующими с флуорохромами (ослиные антитела к IgG кролика, коньюгированные с AlexaFluor 488, Invitrogen, США; ослиные антитела к IgG мыши, коньюгированные с AlexaFluor 555, Invitrogen, США). Процедуру повторяли для другой пары первичных и вторичных антител, после чего срезы красили DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, D1306) для визуализации ядер клеток. Между каждой процедурой проводилось тщательное отмывание срезов в растворе PBS трехкратно по 5 мин.

Для выявления признаков стеатоза печени применяли окрашивание на нейтральные жиры с помощью Oil Red O (Sigma, 00625), который окрашивает жиры в ярко-красный цвет. Для этого срезы печени инкубировали с изопропиловым спиртом в течение 10 мин, далее окрашивали стандартным рабочим раствором Oil Red O в течение 1 ч, тщательно промывали и окрашивали ядра гематоксилином в течение 5 мин. Срезы заключались в водорастворимую среду Immumount (Thermo Scientific, США). Результаты анализировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioOberver.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

### **Результаты**

Сравнительное исследование печени экспериментальной и контрольной групп животных показало достоверное увеличение массы печени грызунов, содержащихся в течение 14 нед. на атерогенной диете, по сравнению с контрольной группой на  $9 \pm 0,9\%$  и  $2,3 \pm 0,1\%$  от массы тела соответственно.

При окрашивании микросрезов ткани печени Oil Red O выявлены признаки диффузного мелко-

### **Антитела, использованные в работе**

Антиген	Характеристика антигена	Используемые антитела
Bcl-2	Антиапоптотический белок, играющий важную роль в опухолевом росте и аутоиммунной патологии.	Santa Cruz, sc-7382. Моноклональные IgG1 мыши, 200 мкг/мл. Используемое разведение 1:100
Каспаза-3	Относится к семейству цистеиновых протеаз, расщепляющих белки исключительно после аспартата. Каспазы играют важную роль в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах	Santa Cruz, sc-98785. Поликлональные IgG кролика, 200 мкг/мл. Используемое разведение 1:100
CD45	Общий маркер лейкоцитов	Santa Cruz, sc-25590. Поликлональные IgG кролика, 200 мкг/мл. Используемое разведение 1:100
Коллаген II	Фибриллярный белок, основа соединительной ткани. Содержание коллагена в ткани коррелирует со степенью ее фиброза	Abcam, AB3092. Моноклональные IgG2a мыши, 1 мг/мл. Используемое разведение 1:100

и крупнокапельного стеатогепатоза, больше выраженного в перипортальной области (рис. А, Б). В контрольной группе животных таких изменений не наблюдалось (рис. В).

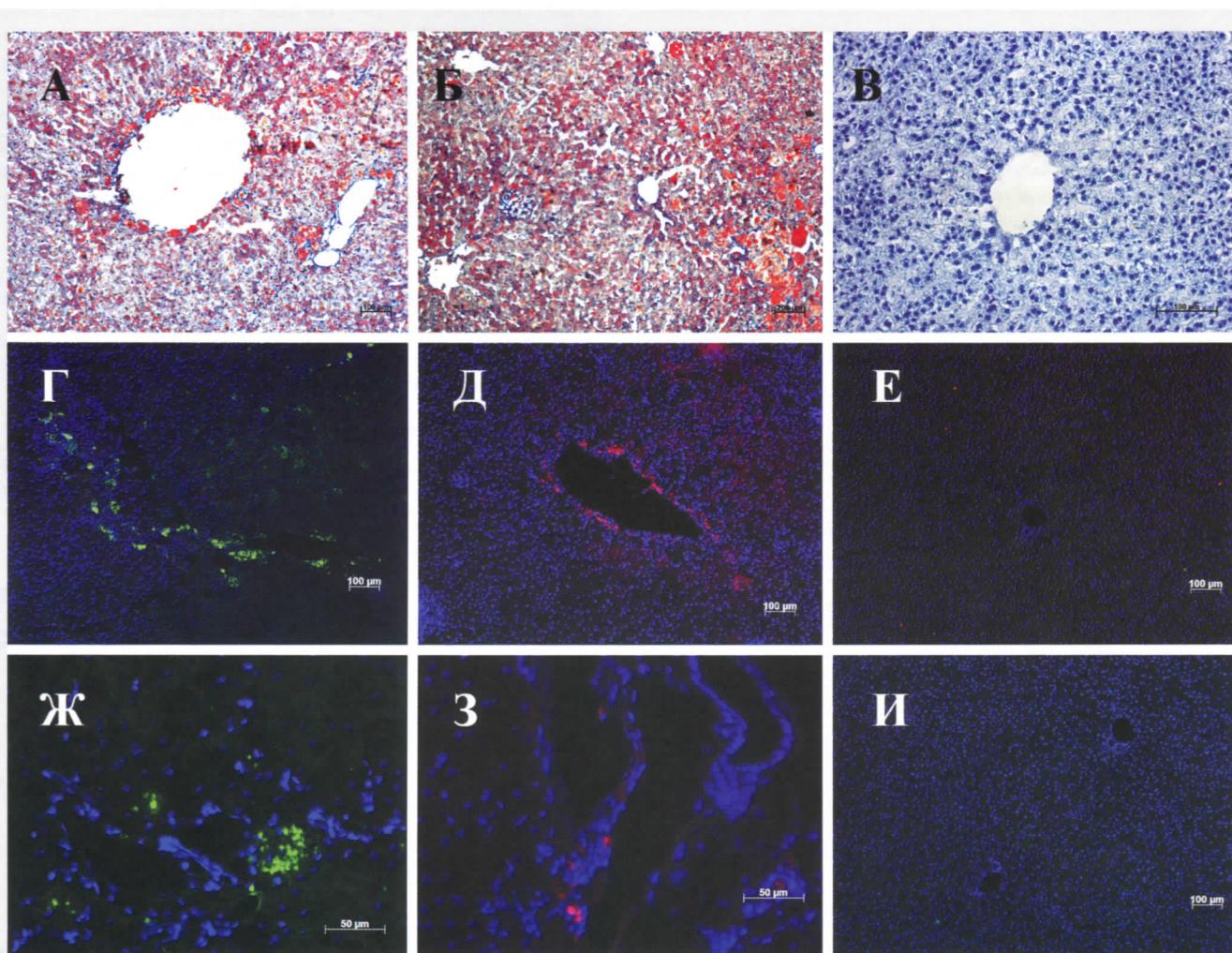
При иммунофлуоресцентном окрашивании с антителами к CD45, общему маркеру лейкоцитов, выявлена массивная очаговая лейкоцитарная инфильтрация (рис. Ж). На микропрепаратах, окрашенных гематоксилином, также выявляются признаки диффузной и очаговой лейкоцитарной инфильтрации, преимущественно в перипортальных областях (рис. Б).

При микроскопии заметна выраженная деформация дольчатой структуры печени, расширение со-

судов портальной системы. В зонах наибольших изменений при иммунофлуоресцентном окрашивании с антителами к коллагену выявляется его повышенная экспрессия, что является признаком развивающегося фиброза печени.

Также обнаруживается повышенная экспрессия про- (каспаза-3) и антиапоптотических (Bcl-2) факторов (рис. Г, Д). Патологические изменения в ткани печени более выражены в перипортальных областях.

При анализе срезов печени животных контрольной группы признаков стеатоза, очагов воспаления, апоптоза клеток и развивающегося фиброза выявлено не было (рис. 1В, Е, И).



Печень мышей, содержащихся на атерогенной диете:

А – микро- и макрокапельный стеатоз; Б – очаги лейкоцитарной инфильтрации;

Г – экспрессия каспазы-3; Д – экспрессия Bcl-2;

Е – экспрессия каспазы-3 и Bcl-2; Ж – экспрессия CD45;

З – экспрессия коллагена; И – экспрессия коллагена и CD45;

В – животные контрольной группы.

А–Б – гистохимический анализ; Г–Е – иммунофлуоресцентный анализ.

Окраска: А–В – гематоксилин, Oil Red O; Г – антитела к каспазе-3; Д – антитела к Bcl-2;

Е – антитела к каспазе-3, Bcl-2; Ж – антитела к CD45; З – антитела к коллагену II; И – антитела к коллагену II и CD45.

Докраска ядер: DAPI

## Обсуждение

В данной работе впервые охарактеризованы экстра-аортальные изменения в организме мышей при содержании их на атерогенной диете. Показано, что при содержании мышей C57BL/6 на атерогенной диете в течение 14 нед. развивается выраженная гепатомегалия (масса печени экспериментальных животных 9% от массы тела, в контроле – 2,3%).

Атерогенная диета приводит к выраженной деформации дольчатой структуры печени, очаговой и диффузной воспалительной лейкоцитарной инфильтрации, апоптозу гепатоцитов вдоль порталовых трактов, микро- и макрокапельному стеатозу печени лабораторных животных.

Вышеописанная картина во многом аналогична таковой при неалкогольной жировой болезни печени. Это заболевание часто встречается у лиц с различными видами нарушения обмена веществ, ожирением, метаболическим синдромом, также способствующих развитию и усугублению атеросклеротического поражения сосудов. Таким образом, было показано, что печень не только активно участвует в патогенезе атерогенной дислипидемии, но и сама выступает в роли органа-мишени при нарушениях липидного обмена, и дислипидемия оказывает выраженное воз-

действие не только на процесс атерогенеза, но и на состояние печени.

Полученные данные позволяют использовать модель атеросклероза на мышах также и в качестве модели неалкогольной жировой болезни печени, а возможно и других патологий обмена веществ. Так же данная модель позволяет исследовать взаимосвязь между нарушениями функции печени в сфере липидного и холестеринового обмена и развитием и прогрессированием атеросклеротического поражения сосудов.

## Благодарности

Выполнение данного научного исследования финансируется за счёт государственного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.552.11.7083 и грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (12-04-31607, 12-04-33070). Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Fuster V. Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. Presented at the 71st scientific sessions of the American Heart Association. Dallas, Texas. Circulation 1999; 99(9): 1132–7.
2. Drew A.F., editor. Atherosclerosis: Experimental methods and protocols. Methods in Molecular Medicine. Humana Press; 2001.
3. Spiteller G. Is atherosclerosis a multifactorial disease or is it induced by a sequence of lipid peroxidation reactions? Ann. NY Acad. Sci. 2005; 1043: 355–66.
4. Russell J.C., Proctor S.D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. Cardiovasc. Pathol. 2006. 15(6): 318–30.
5. Schreyer S.A., Wilson D.L., LeBoeuf R.C. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. Atherosclerosis 1998; 136(1): 17–24.
6. Буеверова Е.Л., Ивашин В.Т. Атерогенная дислипидемия и печень. Российские медицинские вести 2008; 13(1): 17–23.
7. Генин А.М., Капланский А.С. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. Авиакосмическая и экологическая медицина 2001; 4: 14–20.

Поступила 13.08.2012