

УДК 619:616.36

МИКРОСТРУКТУРА ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ ПРЕМИКСА ACTIVE MIX

¹Берестов Д.С.-к.б.н., доцент, ^{1,2}Шишкин А.В.-д.м.н., профессор, ³Трошин Е.И.-д. биол. н., профессор, ¹Васильев Ю.Г.- д.м.н., профессор, ¹Красноперов Д.И.-

¹ФГБОУ ВО Ижевская государственная сельскохозяйственная академия.

²ФГБОУ ВО Удмуртский государственный университет.

³ФГБОУ ВО Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины.

Ключевые слова: печень, гистология, хелаты микроэлементов, жировая инфильтрация, гепатоциты. **Keywords:** liver, histologic, trace elements in chelated form, fatty infiltration, hepatocyte.

РЕФЕРАТ

Разработана кормовая добавка, содержащая витамины в форме микроэмульсии, микроэлементы в хелатной форме. Принципиальным отличием является отсутствие в её составе пропиленгликоля. Для исключения протекания неблагоприятных химических реакций и устранения биохимического антагонизма компонентов, добавка разделена на две смеси для попеременного ежедневного введения внутрь. Цель работы - в эксперименте на мышах оценить влияние на микроскопическую организацию печени различных доз компонентов добавки при ее ежедневном введении на протяжении месяца. Исследования проведено на 92 половозрелых беспородных белых мышах - самцах, разделенных на шесть опытных и одну контрольную группы (таблица 1). Ежедневно мыши получали различные дозировки премикса. Введение премикса осуществлялось перорально ежедневно индивидуально каждому животному с чередованием смесей в соответствии с нашими рекомендациями. Для получения количества, удобного для введения мышам, заниженные дозировки дополнялись физиологическим раствором до объема, эквивалентного другим группам. Контрольные животные получали аналогичное количество физиологического раствора.

Микроструктура печени оценивалась анализом гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином на 7-е, 14-е и 30-е сутки эксперимента. Введение в рацион премикса ActiveMix не вызывает изменения ориентировочно-исследовательского поведения животных. В некоторых группах наблюдаются признаки повышения двигательной активности и уменьшаются косвенные признаки стресс-реакции. На фоне введения в рацион мышей премикса ActiveMix наблюдается уменьшение степени выраженности жировой инфильтрации печени экспериментальных животных. Положительный эффект влияния премикса на микроскопическую картину печени отмечался уже на 7 сутки эксперимента.

Наиболее эффективным в отношении указанного эффекта является введение добавки в дозировках 0,3 и 0,6 г/кг живой массы. Применение добавки в завышенных вплоть до 3 г/кг живой массы дозах не вызывает нарушения микроскопической организации печени.

ВВЕДЕНИЕ

Общеизвестно, что интенсификация сельскохозяйственного производства предполагает использование животных с выдающимся генетическим потенциалом,

полная реализация которого требует создания идеальных условий содержания и кормления. Это требует компенсации нехватки субстратов для обмена веществ в кормах введением добавок в избытке

представленных на рынке. Разработка премикса ActiveMix - это попытка создания добавки с максимально сбалансированным по совместимости составом и разведением по времени поступления в организм антагонистических компонентов. Этот подход применяется в гуманной медицине, однако до сих пор не нашел распространения в ветеринарной практике [1].

Новизна исследования. По сравнению с другими продуктами подобного назначения и достаточно близкими по набору компонентов, добавка ActiveMix имеет ряд принципиальных отличий. Добавка не содержит пропиленгликоль. Для исключения протекания нежелательных химических реакций между компонентами, устранения биохимического антагонизма витаминов и микроэлементов добавка состоит из двух компонентов (VMG-500 и VMG-600), используемых по отдельности (прием чередуется через день). Жирорастворимые витамины (А, D, Е) находятся в виде стабильной микроэмульсии, что обеспечивает их равномерное распределение по объему и способствует повышению их биодоступности за счет облегчения всасывания в ЖКТ животных.

Представляет интерес оценка эффективности решений используемых при создании такого премикса. В доступных публикациях не приводятся результатов исследований по оценке влияния премикса ActiveMix на структуру внутренних органов животных, что требует экспериментального исследования перед потенциальной экстраполяцией эффектов добавки на организм сельскохозяйственных животных. Актуальным представляется исключение потенциально возможных негативных эффектов новой разработки в отношении печени. Тем более по имеющимся данным, микроэлементы могут играть роль в патогенезе заболеваний печени, в том числе ее жировой инфильтрации [5]. В связи с вышесказанным, целью исследования явилась оценка микроскопической картины печени лабораторных мышей на фоне введения различных доз добавки ActiveMix.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведено на 92 половозрелых беспородных белых мышах - самцах, разделенных на шесть опытных и одну контрольную группы (таблица 1). Ежедневно мыши получали различные дозировки премикса. Введение премикса осуществлялось перорально ежедневно индивидуально каждому животному с чередованием смесей в соответствии с нашими рекомендациями. Для получения количества, удобного для введения мышам, заниженные дозировки дополнялись физиологическим раствором до объема, эквивалентного другим группам. Контрольные животные получали аналогичное количество физиологического раствора.

Животные выводились из эксперимента через 7, 14 и 30 суток после его начала. Убой осуществлялся в одно и то же время суток до очередного кормления путем декапитации под общей анестезией. Образы печени помещались в нейтральный забуференный формалин, после чего из них по общепринятой методике изготавливали гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином. Полученный материал подвергали микроскопии с описательным морфологическим анализом.

Для оценки потенциально негативных эффектов в отношении нервной системы и объективной оценки общего состояния, перед убоем через две недели от начала опыта проводили исследование ориентировочно-исследовательской активности животных в тесте «открытое поле» в соответствии с общепринятой методикой [3]. Животных взвешивали до начала эксперимента и перед убоем.

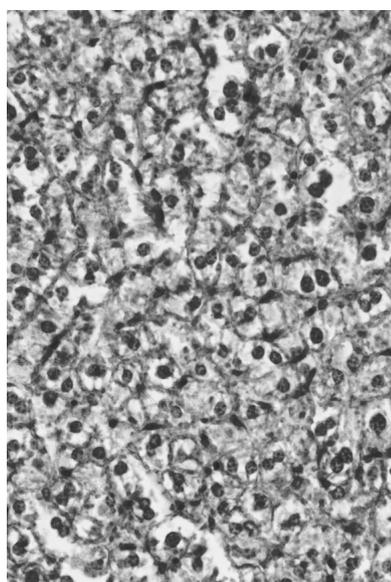
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 7 дней в препаратах печени животных контрольной группы выявлена картина типичная для микроскопической организации этого органа у мышей. В цитоплазме большинства гепатоцитов выявлены округлые светлые включения, представляющие диффузную микровезикулярную жировую инфильтрацию (рис.

Таблица 1

Распределение животных по группам и используемые в эксперименте дозировки

Группы животных	1-я опытная	2-я опытная	3-я опытная	4-я опытная	5-я опытная	6-я опытная	Контроль
дозировка, г/кг живой массы	0,06	0,12	0,3	0,6	1,2	3,0	Физ. р-р
Количество животных	15	15	15	15	15	5	12



Ри. 1. Печень животного контрольной группы. 1 неделя от начала эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином.

1). Цитоплазма при этом принимала ячеистый и сетчатый вид. Гепатоциты были представлены одноядерными и двухядерными клетками без признаков кариопикноза. Некоторые гепатоциты имели признаки гипертрофии. В опытных группах наблюдалась тенденция к уменьшению количества включений, однако при этом внутри каждой группы картина была неоднородной от практически полного отсутствия вышеуказанных изменений в цитоплазме гепатоцитов до картины близкой контролю. Наиболее выраженное уменьшение количества включений

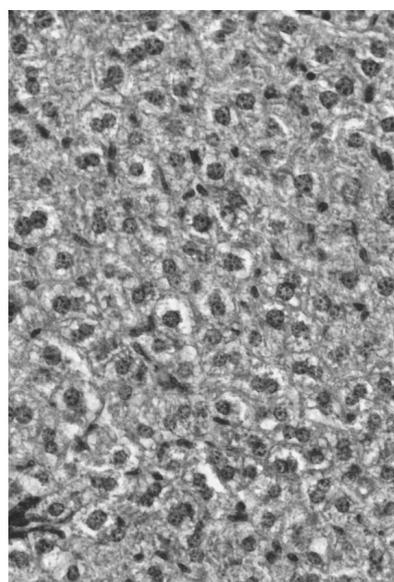


Рис. 2. Препарат печени, 2-я опытная группа, 2 недели от начала эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином.

наблюдалось у животных 3-й и 4-й опытных групп. В 4-й опытной группе также была отмечена тенденция к уменьшению размеров гепатоцитов, расположенных по периферии печеночных долек. Схожая картина наблюдалась у мышей 5-й опытной группы.

Через 14 суток после начала введения в контроле наблюдалась та же картина, что и в контрольной группе предыдущего срока. В опытных

группах сохранялась микроскопическая организация органа с тенденцией к уменьшению количества включений, од-

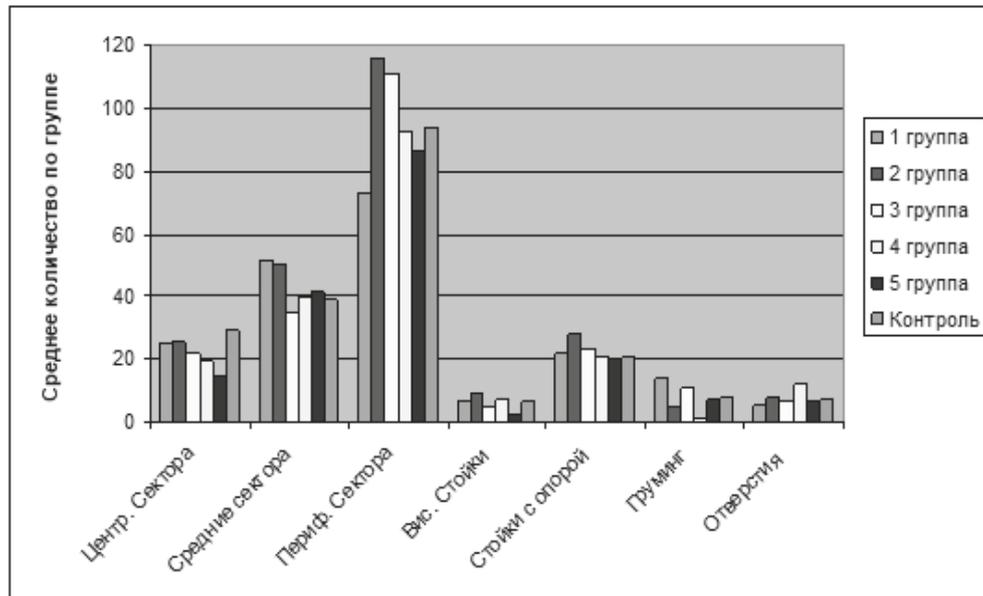


Рис. 3. Показатели теста «Открытое поле» через две недели после начала введения продукта.

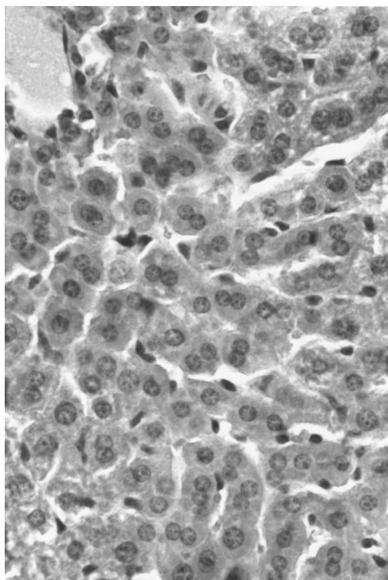


Рис. 4. Препарат печени, 4-я опытная группа, 1 месяц от начала эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином.

нако в отличие от предыдущего срока исследования, где даже слабовыраженные изменения носили диффузный характер, у многих животных инфильтрация проявлялась зонально. При этом наблюдались обширные регионы без каких-либо изменений. Кроме того, обнаруживалась тенденция к аналогичной картине и в опытных группах, получавшихкратно заниженные дозировки (1-я и 2-я опытные группы, рис. 2). В печени животных, получавших пятикратно завышенную дозировку выявлялись схожие изменения, видимых признаков негативного влияния на микроскопическую организацию органа завышенного количества компонентов добавки выявлено не было.

Тестирование животных через две недели от начала опыта в арене открытого поля показало, что ни в одной группе, даже на фоне введения завышенных доз препарата не наблюдалось значимых отличий от контроля (рис. 3), что говорит об отсутствии негативного влияния продукта на центральные механизмы, ответственные за реализацию поведенческих

программ, то есть об отсутствии выраженного негативного влияния на центральную нервную систему.

Через 30 суток в контрольной группе по-прежнему наблюдалась картина, аналогичная контролю предыдущих сроков. В препаратах печени мышей всех опытных групп, как и в предыдущем сроке, наблюдалась сохранность микроскопической организации органа с тенденцией к уменьшению количества включений в цитоплазме гепатоцитов по мере роста дозировки с наибольшим эффектом в 3-й и 4-й опытной группе (рис. 4). Часть образцов вообще не имела признаков изменений структуры гепатоцитов.

Динамичное исследование изменений веса животных выявило малую динамику изменений в течение всего периода наблюдения в контрольной группе, в 1-3, 6 опытной группах. В 3 и 4 опытной группах наблюдалась тенденция к повышению общей массы животных на 4,7 и 5,2% соответственно на 30-ые сутки наблюдения.

Обсуждение результатов. Несмотря на соблюдение сроков карантинирования животных, их могло оказаться недостаточно для адаптации к изменившимся условиям содержания и кормления, что привело к развитию описанных изменений в печени. По данным литературы, отмеченное просветление цитоплазмы гепатоцитов может являться как признаком жировой инфильтрации [4], так и накоплением гликогена [6]. Дифференцировка этих состояний требует специальных методов окрашивания, однако округлая каплевидная форма включений позволяет предполагать их липидную природу. Механизмом жировой инфильтрации возможно послужила мобилизация эндогенных триглицеридов. Кроме того, известно, что реакции окисления свободных жирных кислот и образование продуктов перекисного окисления также вносят вклад в нарушение межклеточного обмена липидов в печени мышей [2]. Применение добавки по указанной схеме, возможно, позволило компенсировать недостатки рациона и нормализовать межклеточный

липидный обмен в печени, что морфологически проявилось уменьшением количества светлых включений в цитоплазме гепатоцитов. Однако полного восстановления структуры клеток органа не произошло ни в одной группе, что говорит о невозможности полной нормализации промежуточных этапов обмена веществ только за счет введения в рацион премикса. Кроме того, применение разработанной добавки даже на протяжении месяца в завышенной до 3 г/кг живой массы дозировке не вызвало развития признаков поражения печеночной паренхимы, таких как нарушения балочной организации долек, повышения степени выраженности междольковой соединительной ткани, проявлений цирроза, изменения характера кровенаполнения, что может говорить об отсутствии признаков гепатотоксичности в диапазоне исследуемых доз.

ВЫВОДЫ

На фоне введения в рацион мышей премикса ActiveMix наблюдается уменьшение степени выраженности жировой инфильтрации печени экспериментальных животных.

Положительный эффект влияния премикса на микроскопическую картину печени отмечался уже на 7 сутки эксперимента.

Наиболее выраженное снижение проявления микровезикулярной жировой инфильтрации печени наблюдалось при введении добавки в дозах 0,3 и 0,6 г/кг живой массы.

Введение в рацион премикса ActiveMix не вызывает изменения ориентировочно-исследовательского поведения животных. В некоторых группах наблюдаются признаки повышения двигательной активности и уменьшаются косвенные признаки стресс-реакции.

Mice liver microstructure during different ActiveMix additive injection dosing.
1Berestov D.S. Candidate of Biological Sciences, docent, 1,2 Shishikin A.V. doctor of medicine, professor, 3Troshin E.I. Doctor of Biological Sciences, professor, 1Vasiliev Yu.G. doctor of medicine, professor, Krasnoperov D.I. Izhevsk State

Agricultural Academy, 2Udmurt State University, 3 St. Petersburg state Academy of veterinary medicine

ABSTRACT

A feed additive containing vitamins in the form of a microemulsion, microelements in chelate form has been developed. The principal difference is the absence of propylene glycol in its composition. To eliminate the occurrence of adverse chemical reactions and eliminate the biochemical antagonism of the components, the additive is divided into two mixtures for alternate daily oral administration. The aim of the work is to evaluate the effect on the microscopic organization of the liver of various doses of the components of the additive when administered daily for a month in an experiment on mice.

The study was conducted on 92 adult outbred white mice - males, divided into six experimental and one control group (table 1). Mice received various dosages of premix daily. The premix was administered orally daily, individually, to each animal with alternation of mixtures in accordance with our recommendations. To obtain an amount convenient for administration to mice, the reduced dosages were supplemented with saline to a volume equivalent to other groups. Control animals received a similar amount of saline.

The microstructure of the liver was assessed by analysis of histological preparations stained with hematoxylin-eosin on the 7th, 14th and 30th days of the experiment. Introduction to the diet premix ActiveMix does not cause changes orienting-research behavior of animals. In some groups, there are signs of increased motor activity and reduced indirect signs of a stress response. With the introduction of the ActiveMix premix into the diet of mice, a decrease in the severity of fatty liver infiltration of experimental animals is observed. The positive effect of the effect of the premix on the microscopic picture of the liver was noted already on the 7th day of the experiment.

The most effective in relation to this effect is the introduction of the additive in dosages of 0.3 and 0.6 g / kg body weight. The use of supplements in doses up to 3 g / kg of body

weight does not cause a violation of the microscopic organization of the liver.

ЛИТЕРАТУРА

1.Бабаян, М. Л. Эффективность витаминно-профилактики и выбор витаминно-минерального комплекса у детей / М.Л. Бабаян // Вопросы практической педиатрии. – 2011. – Т. 6. – № 4. – С. 85–89.

2.Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis / K. Yamaguchi [et al.] // *Hepatology*. – 2007. – № 45 (6). – P 1366–1374.

3.Jackson, H.F., (1982) The effects of parachlorophenylalanine and stimulus intensity on open-field test measures in rats / H.F. Jackson, P.L. Broadhurst // *Neuropharmacology*. – 1982. – № 21. – P. 1279–1282.

4.Hepatoprotective Effect and Synergism of Bisdemethoeycurcumin against MCD Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice / S.B. Kim [et al.] // *PLoS One*. – 2016. – Feb 16;11(2): e0147745. doi: 10.1371/journal.pone.0147745. eCollection 2016.

5.Pickett-Blakely, O. Micronutrients in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis / O. Pickett-Blakely, K. Young, R.M. Carr // *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. –2018. – Aug 23;6(4). – P 451–462

6.Sustained hepatic and renal glucose-6-phosphatase expression corrects glycogen storage disease type Ia in mice / M.S. Sun [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2002. – Sep 1;11(18). – P.55–64.