

# Влияние ограничения приема пищи дневными часами на структуру и функцию печени

**С**точки зрения эволюции циркадианные системы как механизм естественного отбора обеспечивали преимущества в выживании путем оптимизации поведенческой и физиологической адаптации к периодическим событиям, возникающим примерно каждые 24 ч. Конечной целью этой адаптации является увеличение репродуктивного успеха (количества копий генов, переданных следующему поколению, которое также способно к размножению) и продолжительности жизни благодаря более эффективному доступу к источникам пищи.

Циркадианные ритмы позвоночных являются результатом координированного действия светозависимого главного водителя ритма, расположенного в супрахиазматическом ядре (СХЯ) гипоталамуса, и субординированных биологических часов периферических органов. Суточные программы центрального и периферических осцилляторов основаны на подобных, но не идентичных молекулярных транскрипционно-трансляционных контурах обратной связи. Нормальная синхронизация между главными и периферическими часами может быть нарушена вследствие изменения режимов сна, бодрствования и кормления. В качестве примера можно привести ситуацию, когда кормление ограничивается короткими периодами времени, в частности в экспериментальных протоколах, в которых грызунам, ведущим ночной образ жизни, пища предлагается только в дневное время. В таких условиях периферические часы теряют зависимость от ритмичности СХЯ, а ключевую роль в работе циркадианной системы световой фактор уступает эффектам периодичности кормления. Главным механизмом такой адаптации является экспрессия осциллятора, руководимого пищей (FEO – food-entrainable oscillator), который следующий после СХЯ контролирует суточные ритмы поведенческой, физиологической и метаболической активности.

Экспрессия FEO происходит в случаях, когда животные имеют доступ к пище по ограниченному графику (2–4 ч в сутки на протяжении 2–3 нед). Ограниченное кормление по графику (ОКГ) увеличивает двигательную активность и мотивацию в часы, непосредственно предшествующие доступу к пище, создавая таким образом состояние, известное как активность, предшествующая приему пищи (АППП). АППП характеризуется разнообразными физиологическими и поведенческими изменениями в организме, в частности повышением скорости вращения беличьего колеса (лабораторными животными), потребления воды и температуры тела, а также пиковым уровнем кортикостерона сыворотки. До настоящего времени анатомическая локализация FEO остается неизвестной. Считается, что в физиологии этого осциллятора задействована двусторонняя связь между специфическими, чувствительными к энергии, участками головного мозга и периферическими органами, обрабатывающими нутриенты, в первую очередь печенью.

Печень состоит из паренхиматозных клеток – гепатоцитов (80% объема) и 4 типов непаренхиматозных клеток: эндотелиальных, клеток Купфера, Ито и ямочных клеток. Печеночная ткань является высокоспециализированной и функционирует как большой эффекторный орган, действующий как: главный центр метаболизма нутриентов, основной компонент защитного ответа организма, контрольная станция эндокринной системы и резервуар крови. Печень играет стратегическую роль в процессе пищеварения, получая нутриенты из пищи и осуществляя их трансформацию в полезные биомолекулы, которые затем доставляются к другим органам и тканям. Чтобы усвоить организм, белки, жиры, углеводы и другие соединения должны подвергнуться метаболизму в печени. Ядра в гипоталамусе и среднем мозге соединены блуждающим и чревным нервами с печенью, благодаря чему она принимает участие в контроле приема пищи, воспринимая и регулируя энергетический статус организма.

Экспрессия FEO вызывает значительные изменения физиологии и метаболизма печени. Во время АППП (перед доступом к пище) окислительно-восстановительный баланс в цитоплазме и митохондриях смещен в сторону окисления, уровни АМФ повышены, митохондрии могут синтезировать в больших

количествах АТФ, а в печени наблюдается локальное состояние, напоминающее гипотиреоз. После приема пищи окислительно-восстановительный статус в цитоплазматическом и митохондриальном компартментах становится восстановленным, уровни АТФ снижаются, а уровни трийодтиронина (Т<sub>3</sub>) в печени повышаются. В то же время не все адаптационные процессы в печени при ОКГ осуществляются до и после приема пищи. Экспрессия FEO сопровождается стойким снижением проокислительных реакций (образования диенов и перекисей жиров) в большинстве внутриклеточных фракциях гепатоцитов и стабильным повышением мембранного потенциала митохондрий (Δψ). Кроме того, по сравнению с другими органами печень способна быстрее всего изменять экспрессию генов и синтез молекул в ответ на ограниченный доступ к пище в дневные или ночные часы.

Цель настоящего экспериментального исследования состоит в более глубоком изучении структурных и гистохимических адаптационных изменений в печени во время экспрессии FEO, лежащих в основе метаболизма гликогена и триглицеридов.

## Материал и методы

В начале эксперимента крысы-самцы линии Wistar (средний вес 150 г) содержались при стабильном 12 ч/12 ч цикле чередования света и темноты (свет включался в 8:00) и постоянной температуре (22±1 °С). Интенсивность света на поверхности клеток составляла в среднем 350 люкс. Животные содержались в группах по 5 особей в прозрачных акриловых клетках (40×50×20 см) и имели свободный доступ в воде и пище (если не указано другое).

Животных случайным образом распределяли в одну из трех экспериментальных групп: 1) контрольные крысы, которые принимали пищу ad libitum (по желанию); 2) крысы, получавшие ОКГ (доступ к пище с 12:00 по 14:00 ежедневно в течение 3 нед); и 3) контрольные крысы, голодавшие на протяжении 24 ч. С целью получения образцов печени животных 1-й (кормление ad libitum) и 2-й (ОКГ) групп умерщвляли методом декапитации в 8:00 (до АППП), в 11:00 (во время АППП) или в 14:00 (после кормления в отсутствие АППП). Крысы, голодавшие на протяжении, 24 ч, умерщвляли в 11:00. 1-я и 2-я группы состояли из 18 крыс, 3-я группа – из 6 крыс (т. е. по 6 крыс в каждой экспериментальной группе на каждый временной период исследования). Перед умерщвлением животных погружали в состояние глубокой анестезии путем введения пентабарбитала натрия в дозе 1 мл/2,5 кг массы тела.

## Результаты

### Соматометрия

После 3 нед вес контрольных животных, кормившихся ad libitum, составлял от 320 до 340 г, что соответствовало увеличению веса в среднем на 120% по сравнению с изначальным (150 г). Существенных различий между тремя периодами времени исследования (в 8:00, 11:00 и 14:00) не обнаружено. В другой контрольной группе (24-часовое голодание) наблюдалось умеренное снижение массы тела на 10%. По сравнению с группой кормления ad libitum у крыс группы ОКГ показатели веса были значительно ниже – 180–195 г до кормления (в 8:00 и 11:00) и 242–251 г после кормления (в 14:00). Принимая во внимание изначальную массу тела 150 г, увеличение веса до и после кормления составило 25 и 64% соответственно. Таким образом, у животных, получавших ОКГ, наблюдались суточные колебания веса примерно на одну треть вследствие выраженной гиперфагии и питья воды в 2-часовой период, когда они имели доступ к пище. Результаты соматометрии показали,

что животные группы ОКГ весили достоверно меньше, чем крысы, кормившиеся ad libitum.

Масса печени животных, получавших кормление ad libitum, в исследованные периоды времени не различалась; соотношение «масса тела/масса печени» в этой группе было самым высоким. Голодание на протяжении 24 ч сопровождалось снижением массы печени примерно на 30%. Масса печени крыс группы ОКГ была значительно ниже: до кормления (в 8:00 и 14:00) этот показатель был ниже на 55% по сравнению с группой кормления ad libitum; после кормления (в 14:00) снижение массы печени составляло 41%. Во все три исследуемых периода независимо от приема пищи соотношение «масса тела/масса печени» у животных группы ОКГ было ниже, чем у крыс, кормившихся ad libitum, и достоверно не отличалось от показателя группы 24-часового голодания. Эти данные свидетельствуют о том, что ОКГ вызывает большее снижение массы печени, чем массы тела, которое соответствует эффекту 24-часового голодания. Интересно отметить, что через 2 ч после кормления масса печени и вес крыс группы ОКГ увеличивались на 30% (по сравнению с показателями в 11:00 и 14:00).

### Содержание воды в печени (СВП)

Процентное содержание воды в печеночной ткани колеблется в зависимости от циркадианного ритма и доступности пищи. СВП определяли путем взвешивания высушенной ткани печени. Значения, полученные у большинства животных основной и контрольных групп, варьировали в узком диапазоне (68–72%). Значительные изменения СВП наблюдались только у крыс группы ОКГ перед кормлением (в 11:00), т. е. в период АППП. Печень этих животных содержала лишь 56% воды, что на 20% ниже по сравнению с группой кормления ad libitum, группой 24-часового голодания и другими животными группы ОКГ, образцы печени которых получали в 8:00 и 14:00. Эти результаты указывают на то, что реакция печени на голодание при ОКГ качественно отличается от таковой во время однократного периода голодания на протяжении 24 ч.

### Морфометрия гепатоцитов

Ранее было установлено, что пищевой статус оказывает существенное воздействие на размеры гепатоцитов. Гистологическое исследование печеночной ткани показало выраженные изменения площади поперечного сечения (маркера объема клетки) клеток печени крыс контрольной группы, кормившихся ad libitum, и животных группы ОКГ. В морфометрический анализ включали только гепатоциты с отчетливым ядром и по крайней мере одним ядрышком. У крыс, получавших кормление ad libitum, происходило значительное увеличение размеров гепатоцитов в 8:00 (в конце периода кормления): увеличение площади поперечного сечения составило 100% по сравнению с показателями в этой же группе в 11:00 и 14:00. У крыс группы 24-часового голодания размеры гепатоцитов соответствовали таковым в группе кормления ad libitum в 11:00. Ограничение доступа к пище также вызывало явные изменения морфометрии гепатоцитов: во время АППП (в 11:00) площадь поперечного сечения гепатоцитов увеличивалась на 53% по сравнению с показателем в этой же группе до (в 8:00) и после АППП (в 14:00). Увеличение размеров гепатоцитов в период АППП было статистически значимым при сравнении с крысами, голодавшими на протяжении 24 ч. В отличие от группы кормления ad libitum, в которой гепатоциты увеличивались после кормления (в 8:00), печеночные клетки животных, экспрессирующих FEO, были больше до приема пищи (в 11:00).

### Гликоген печени

Наличие гликогена в цитоплазме гепатоцитов качественно и количественно оценивали при помощи PAS-реакции. У животных группы кормления ad libitum интенсивность окрашивания гранул гликогена оставалась практически стабильной с легкой

Продолжение на стр. 64.

# Влияние ограничения приема пищи дневными часами на структуру и функцию печени

Продолжение. Начало на стр. 63.

тенденцией к снижению в 14:00. В группе 24-часового голодания произошло глубокое (на 82%) снижение содержания гликогена. У крыс группы ОКГ наблюдалось достоверное, но менее выраженное снижение содержания гликогена в печени (на 30%) в период АППП (в 11:00). Однако у этих животных (экспрессирующих FEO) содержание гликогена снижалось меньше, чем у крыс, голодавших в течение 24 ч, несмотря на то что период голодания в обеих группах был практически идентичным (22 vs 24 ч). После употребления пищи (в 14:00) уровень гликогена в печени животных группы ОКГ возвращался к нормальному.

## Триглицериды печени

Содержание нейтральных липидов в печени (преимущественно триглицеридов) оценивали с помощью окраски замороженных срезов судановым красным. В группе кормления *ad libitum* содержание триглицеридов, как и гликогена, на протяжении суток существенно не изменялось. В отличие от гликогена уровни триглицеридов после 24-часового голодания оставались стабильными. Примечательно, что у животных группы ОКГ содержание триглицеридов в печени было значительно ниже перед доступом к пище (в 8:00 и 11:00). В эти периоды снижение уровней триглицеридов достигало 70% относительно животных обеих групп контроля. После кормления (в 14:00) содержание триглицеридов у крыс группы ОКГ возвращалось к контрольным значениям.

## Ультраструктура гепатоцитов

Электронно-микроскопическому исследованию подвергали образцы, полученные от крыс, умерщвленных в 11:00 (контрольных животных, кормившихся *ad libitum*; крыс группы ОКГ в период АППП; и животных второй контрольной группы после 24-часового голодания). Гепатоциты группы кормления *ad libitum* содержали много митохондрий, четко ограниченные эндоплазматический ретикулум и ядро, а также в большом количестве депозиты гликогена в форме электронноплотного вещества. После голодания на протяжении 24 ч все агрегаты гликогена исчезали, однако структура других органелл не изменялась. В гепатоцитах крыс группы ОКГ, напротив, происходили выраженные изменения, включая уменьшение прозрачности, вследствие чего кристы митохондрий становились малоразличимыми. Содержание гликогена в гепатоцитах было умеренным, что соответствует результатам, полученным при окрашивании методом PAS.

## Обсуждение

Печень является главным органом, обрабатывающим нутриенты и доставляющим их метаболиты к другим органам и тканям. У позвоночных она играет ключевую роль в регуляции энергетического баланса и, следовательно, в физиологическом контроле цикла голода и сытости. Так как питание определяет жизнеспособность особи, синхронность внутренних метаболических и клеточных механизмов, направленных на поиск и употребление пищи, четко регулируется циркадианными системами. Как следствие, под циркадианный контроль попадают различные функции печени, связанные с обработкой нутриентов. По этой причине вовлечение печени считается важной составляющей FEO. Экспрессия FEO также зависит от характеристики рациона и содержания калорий в пище, предлагаемой при ОКГ.

Многие механизмы адаптации биохимического ответа печени до и после кормления во время экспрессии FEO являются уникальными и не проявлялись в обеих контрольных группах (кормление *ad libitum* и 24-часовое голодание). В целом полученные данные указывают на то, что физиология FEO связана с ранее неизвестным гомеостатическим балансом функциональных и структурных свойств печени, которая адаптируется с целью оптимизации обработки нутриентов при ОКГ.

В печени ежедневно происходят колебания структурного и метаболического характера, которые, как правило, ассоциируются с употреблением и обработкой нутриентов, поступающих с пищей. Функция гепатоцитов изменяется на протяжении суток таким образом, чтобы достичь адекватного усвоения пищи, а затем — надлежащей обработки нутриентов. ОКГ вызывает выраженную гиперфагию, которая

сопровождается употреблением около 30 г пищи во время кормления. Когда желудок почти полностью освобождается от содержимого, начинается период АППП. В предыдущих исследованиях было установлено, что масса печени, следуя ритму опорожнения желудка, проявляет четкий циркадианный ритм с пиком в 8:00. В данном исследовании масса печени крыс группы *ad libitum* на протяжении суток достоверно не различалась, однако размер гепатоцитов был наибольшим в 8:00. Важно отметить, что у животных с экспрессией FEO соотношение «масса тела/масса печени» во все периоды времени было ниже, чем в контрольной группе кормления *ad libitum*, и не отличалось от показателей крыс, голодавших на протяжении 24 ч. Однако при ОКГ изменения массы тела и массы печени до и после кормления являются пропорциональными, а при голодании масса печени снижается более выраженно, чем масса тела.

По данным Tongiani и соавт., содержание воды в гепатоцитах крыс меняется согласно циркадианному ритму с пиком в ночное время, причем этот ритм регулируется не доступом к пище, а прежде всего режимом света и темноты. В нашем исследовании у крыс группы ОКГ отмечалось снижение содержания воды в гепатоцитах во время АППП (в 11:00). В этот период в печени происходит интенсивная метаболическая активность, характеризующаяся повышенным митохондриальным дыханием, ускоренным синтезом АТФ и переключением с углеводного обмена на жировой. Клеточный механизм, ответственный за увеличение сухой массы гепатоцитов в период АППП, остается неизвестным, однако можно исключить содержание гликогена, триглицеридов и белка, так как первые два обнаруживались в более низких уровнях во время АППП, а последний изменялся незначительно. Заслуживает внимания тот факт, что в это же время (в 11:00) площадь поперечного сечения гепатоцитов крыс группы ОКГ увеличивалась. Следовательно, во время АППП (т. е. подготовки к употреблению и обработке нутриентов на протяжении 2-часового приема пищи) гепатоциты увеличиваются в размере и содержат меньше воды.

Циркадианной цикличности содержания гликогена и триглицеридов в печени обнаружено не было, так как эти два параметра, как известно, изменяются исключительно в ответ на прием пищи и продолжительность голодания. В группе ОКГ перед доступом к пище (в 8:00 и 11:00) наблюдалось небольшое снижение гликогена и выраженное снижение триглицеридов. Наиболее вероятным объяснением меньшего снижения гликогена является длительный период времени, требуемый для опорожнения желудка (20-21 ч) у животных этой группы. В отношении более низких уровней триглицеридов, полученные экспериментальные данные говорят о том, что во время, предшествующее доступу к пище (в 11:00), печень активно метаболизирует липиды, о чем свидетельствуют высокие уровни циркулирующих свободных жирных кислот и кетонных тел, а также экспрессия пероксисомальных и митохондриальных ферментов, окисляющих жиры. Наиболее вероятно, что энергия, необходимая для активности печени перед доступом к пище, производится путем расщепления липидов, мобилизованных из висцеральной жировой ткани.

По данным Uhal и Roehrig, размеры и объем гепатоцитов в значительной мере зависят от пищевого статуса: голодание на протяжении 48 ч сопровождается двукратным уменьшением размеров гепатоцитов и содержания в них белка, в то время как возобновление кормления увеличивает эти показатели на 70-80%. Полученные нами результаты воспроизвели различие в площади поперечного сечения между гепатоцитами крыс, кормившихся *ad libitum* и голодавших 24 ч, но различие в содержании белка обнаружено не было, что, вероятно, обусловлено менее длительным периодом голодания. В группе ОКГ площадь поперечного сечения гепатоцитов увеличивалась во время АППП (в 11:00), что, однако, не сопровождалось активацией биосинтетической функции печени, так как в этот период наблюдалось уменьшение содержания воды в печени без изменений содержания белка.

Данные, полученные с помощью электронной микроскопии, подтвердили сделанное ранее предположение о том, что ультраструктура гепатоцитов также изменяется согласно циркадианному ритму.

## Выводы

Таким образом, что у крыс разобщение циркадианной активности печени и супрадиафрагматического ядра под действием кормления, ограниченного дневными часами, индуцирует адаптацию в размерах и ультраструктуре гепатоцитов, а также содержания в них гликогена и триглицеридов. Основные процессы адаптации, вызванные ограниченным кормлением по графику, проявляются во время активности, предшествующей приему пищи, и формируют «клеточное и метаболическое предчувствие» печени, которая готовится к более эффективной обработке употребляемых нутриентов. Уникальные характеристики ответа печени при ОКГ, не свойственные животным контрольных групп, поддерживают идею о существовании ранее не известного гомеостатического баланса в печени во время экспрессии FEO.

Список литературы находится в редакции.  
Статья печатается в сокращении.

D. Diaz-Munoz et al. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A biochemical, morphometric, and ultrastructural study. *Comparative Hepatology* 2010, 9: 5

Перевел с англ. Алексей Терещенко

## Комментарий редакции

Представленная вниманию читателей статья, опубликованная 23 февраля в онлайн-журнале с открытым доступом *Comparative Hepatology* (Сравнительная гепатология), сегодня занимает ведущие позиции среди наиболее часто просматриваемых материалов медицинских новостных сайтов в рубрике «Гастроэнтерология/гепатология». Используя соответствующие ключевые слова, в русско- и украиноязычном Интернете нам не удалось найти ни одной статьи, посвященной FEO, в то время как мировое медицинское сообщество уже несколько лет обсуждает привлекательные возможности, которые откроются после обнаружения локализации этого осциллятора в организме. Безусловно, результаты всех экспериментальных наблюдений следует переносить на человека с осторожностью. Тем не менее существует множество физиологических механизмов, общность которых доказана для целых классов животных. Экспрессия FEO, по-видимому, сопровождается примерно одинаковыми эффектами у всех млекопитающих, в том числе у человека.

В настоящем исследовании крысам, которые, как известно, в природных условиях ведут ночной образ жизни, ограничивали доступ к пище дневными часами. Такой режим кормления сопровождался умеренным увеличением массы тела животных и циклическими изменениями в гепатоцитах, характерными для экспрессии FEO. Достижение подобного разобщения центральных и периферических биологических часов у человека в реальных условиях представляется маловероятным, так для этого ему пришлось бы ограничиться единственным приемом пищи в период примерно с 1:00 до 3:00. Однако полученные авторами данные свидетельствуют также и о ключевой роли так называемой активности, предшествующей приему пищи, когда организм «предвкушает» скорую трапезу и готовится максимально эффективно усвоить содержащиеся в ней нутриенты. В этот период печень, а возможно, и другие органы для удовлетворения своих энергетических потребностей мобилизуют липиды из жировой ткани. Этот процесс, по крайней мере, частично объясняет значительную пользу режима питания, т. е. питания каждый день в одно и то же время, что давно используется в детских образовательных учреждениях, а также у взрослых в рамках санаторно-курортного лечения. В последние десятилетия доступ к пище западного человека стал практически безграничным. В школах и на рабочих местах устанавливаются автоматы с легкоусваиваемыми продуктами питания, а дома эту роль берет на себе холодильник, всегда готовый помочь «подкрепиться». Таким образом человек лишается важного эволюционного механизма адаптации, защищающего печень и весь организм от болезни, — активности, предшествующая приему пищи, сменяется пассивностью, сопровождающей постоянную доступность пищи. Возможно, в скором будущем будут полностью расшифрованы механизмы, лежащие в основе этого процесса, которые могут оказаться значительно более простыми, чем их описывают авторы исследования.