

УДК 615:9

DOI 10.34014/2227-1848-2025-3-154-164

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПИЩЕВЫХ КОНСЕРВАНТОВ НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

Д.О. Каримов^{1,2}, Ю.В. Рябова¹, Д.Д. Каримов¹, А.А. Гизатуллина¹,
Д.А. Смолянкин¹, А.О. Хмель¹

¹ ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия;

² ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко», г. Москва, Россия

Последствия одновременного воздействия пищевых консервантов и хронического стресса на печень остаются малоизученными, хотя оба фактора широко распространены в современном мире.

Цель. Определить характер и степень морфологических изменений в печени крыс после 28-дневного воздействия сорбиновой и бензойной кислот и выяснить, усиливает ли хронический психологический стресс токсический эффект указанных пищевых консервантов.

Материалы и методы. Эксперимент проводился in vivo в течение 28 сут. Крысы-самцы (n=24) были разделены на 4 равные группы: контроль, хронический стресс, пищевые консерванты и совместное действие упомянутых факторов. После эвтаназии выполняли гистологическое исследование и морфометрию (оценивали площадь ядра и цитоплазмы гепатоцита, ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), число дву- и безъядерных клеток). Статистический анализ осуществляли методом Bootstrap с поправкой Холма – Бонферрони ($p < 0,05$).

Результаты. Хронический стресс снизил площадь ядра (-20 %, $p < 0,0001$) и цитоплазмы (-16 %, $p < 0,0001$), увеличил число двуядерных гепатоцитов (+71 %, $p = 0,006$). Некротические изменения не зафиксированы. Консерванты вызвали умеренную гипертрофию гепатоцитов (площадь ядра +11 %, $p = 0,0004$) без роста ЯЦО и в отсутствие цитолиза. При совместном действии факторов площадь цитоплазмы снижалась (-10 %, $p = 0,0060$), ЯЦО возрастало (+18 %, $p = 0,0005$) при сохраненной архитектуре и неизменном числе двуядерных клеток.

Выводы. Хронический стресс модифицирует ранние гепатотоксические эффекты сорбиновой и бензойной кислот. Процесс сопровождается ростом ядерно-цитоплазматического индекса. Окончательные выводы о характере взаимодействия требуют разработки математических подходов к анализу токсического действия химического агента на фоне хронического психоэмоционального стресса.

Ключевые слова: печень, гистология, хронический стресс, сорбиновая кислота, бензойная кислота, крысы, эксперимент, морфометрия.

Введение. Хронический психологический стресс представляет собой распространенную проблему, имеющую далеко идущие последствия как на индивидуальном, так и на популяционном уровне [1–3].

Длительная активация систем реагирования на стресс создает постоянную нагрузку на адаптационные возможности организма, приводя к стойким биохимическим, физиологическим и часто структурным изменениям. Одной из основных мишеней хронического стресса является печень – центральный орган метабо-

лизма и детоксикации. Активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси в условиях стресса приводит к повышению уровня циркулирующих глюкокортикоидов, которые преимущественно метаболизируются в печени путем окисления, восстановления и конъюгации. Хронический стресс нарушает микроциркуляцию в печени, что приводит к снижению перфузии тканей и регуляторных функций сосудов [4]. Эти гемодинамические нарушения способствуют гипоксии, активации купферовских клеток и усилению лейкоцитарной инфильтра-

ции, усугубляя локальное воспаление и нарушая гомеостаз печени [5]. Более того, хронический стресс в настоящее время признан фактором, влияющим на прогрессирование гепатита, фиброза печени, цирроза и даже гепатоцеллюлярной карциномы [6].

Консерванты в пищевых продуктах, будучи необходимыми для продления срока годности и предотвращения микробной порчи, могут представлять токсикологическую опасность. Так, широко применяемый сорбат калия связан с окислительным повреждением благодаря своему прооксидантному потенциалу [7], а сорбиновая кислота может нарушать метаболизм липидов в печени [8]. Бензойная кислота при недоказанности ее способности вызывать окислительный стресс связана с метаболическими каскадами, сопровождающими окислительный дисбаланс; повышенный уровень бензойной кислоты в тканях ассоциирован с последствиями окислительного стресса, хотя прямых доказательств образования активных форм кислорода нет [9].

Мы предположили, что комбинированное воздействие сорбиновой и бензойной кислот в условиях хронического стресса вызовет более выраженные структурные изменения в печени, чем воздействие каждого из этих факторов по отдельности.

Цель исследования. Определить характер и степень морфологических изменений в печени крыс после 28-дневного воздействия сорбиновой и бензойной кислот и выяснить, усиливает ли хронический психологический стресс токсический эффект указанных пищевых консервантов.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование было проведено на 24 аутобредных половозрелых белых крысах-самцах (*Rattus norvegicus*) массой 190–210 г. На начало работы возраст животных составил 10–12 нед. Крысы содержались в условиях специально оборудованного вивария без ограничения доступа к корму и питьевой воде, если иного не требовал экспериментальный протокол. Все процедуры по содержанию, кормлению, уходу и эвтаназии осуществлялись в соответствии с законодательством Российской Федерации об обращении с лабораторными

животными, в т.ч. ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», а также Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (ETS № 123) и Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета по защите животных, используемых в научных целях. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» (протокол № 01-02 от 8 февраля 2024 г.).

Крысы случайным образом подразделялись на 4 группы по 6 особей в каждой.

Одна группа подвергалась воздействию стрессоров на протяжении всего эксперимента (ХС, хронический стресс) Другой группе ежедневно в одно и то же время внутрижелудочно вводили водные растворы пищевых консервантов – сорбиновой кислоты (500 мг/кг массы тела, 100 мг/мл) и бензойной кислоты (100 мг/кг массы тела, 20 мг/мл) (ПК, пищевые консерванты). Третья группа подвергалась комбинированному воздействию хронического стресса и пищевых консервантов (ПК+ХС). Последняя группа служила контролем (К): этим животным ежедневно внутрижелудочно вводили эквивалентный объем дистиллированной воды.

Дозы сорбиновой и бензойной кислот десятикратно превышали среднюю суточную норму потребления, установленную для взрослого человека перечнем пищевых продуктов, утвержденным Р2.1.10.3968-23, и ТР ТС 029/2012, утвержденным решением Совета Евразийской экономической комиссии от 20 июля 2012 г. № 58). Важно отметить, что данное исследование не ставило целью воспроизведение реальных моделей потребления сорбиновой или бензойной кислот какой-либо конкретной группой населения; интерес представляло выявление потенциального токсического влияния на печень в условиях хронического стресса при воздействии высоких доз этих широко используемых пищевых консервантов.

Для моделирования у крыс-самцов хронического стресса использовали протокол непредсказуемого умеренного стресса [10] с

двумя-тремя случайно выбранными факторами в сутки: социальная изоляция, иммобилизация, воздействие шума, постоянное освещение в темное время суток и ограниченный доступ к пище и воде в течение ограниченного периода времени. Каждая комбинация стрессоров применялась в случайное время в течение дня, один и тот же стрессорный фактор не повторялся дважды в течение одного дня.

Признаки хронического стресса у животных подтверждались рядом поведенческих и физиологических признаков, включая снижение набора веса по сравнению с контрольной группой, изменения локомоторной активности и тенденцию к снижению исследовательского поведения [11, 12], что согласуется с изменениями, вызванными стрессом, описанными в смежных исследованиях [13]. Измерения биохимических маркеров стресса, таких как кортикостерон или кортизол, были намеренно исключены из исследования из-за существенного влияния циркадных ритмов и процедурных вмешательств, например забора крови из хвоста у опытных животных, на уровень гормонов, что снижает специфичность таких оценок [14, 15]. Более того, если у человека кортизол является основным гормоном стресса, то у крыс эту роль выполняет кортикостерон, что затрудняет прямое сравнение полученных результатов с клиническими данными, посвященными физиологии человека [16].

На 29-е сут эксперимента животных умерщвляли декапитацией по AVMA (2020). Брюшную полость вскрывали, печень извлекали в течение 2 мин после гибели крысы. Фрагмент органа фиксировали в 10 % нейтральном формалине (ООО «Biovitrum», Россия) 24 ч при 4 °С. После дегидратации в возрастающей серии изопропанола ткани заливали в парафин на гистопротессоре Excelsior ES (Thermo Scientific, США). Срезы 5–7 мкм получали на микротоме HM 340E (Thermo Scientific) и окрашивали гематоксилином и эозином (BioVitrum, Россия).

Цифровые изображения (ув. $\times 200$) регистрировали с помощью камеры Celena X (Logos Biosystems, Республика Корея). Анализ осуществлялся в QuPath v0.5.1 (Queen's

University Belfast, Великобритания) оператором, «ослепленным» к групповой принадлежности образцов. Оценивали площадь ядра и цитоплазмы (мкм^2), вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение, подсчитывали количество двуядерных и безъядерных гепатоцитов на 10 полей зрения.

Статистический анализ проводился с помощью пакета SciPy на языке Python 3.10 с при выполнении бутстрап-теста (10 000 ресэмплов) с поправкой Холма – Бонферрони на множественные сравнения. Подобная методология широко применяется в биомедицинских исследованиях [17–19]. Различия признавали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В ходе визуального осмотра печени крыс на этапе препарирования были установлены ее типичная анатомическая форма и размеры. У крыс опытных групп видимых патологических отклонений (изменения цвета капсулы, узловатость, очаги некроза, кровоизлияния) не обнаружено.

На рис. 1 представлены микрофотографии типичных фрагментов печени животных контрольной и опытных групп. При анализе гистологических срезов печени контрольной группы было установлено, что структура паренхимы соответствовала норме. У крыс, подвергшихся хроническому стрессу, наблюдались многочисленные мелкие незрелые гепатоциты с двойными ядрами, а также визуально обнаруживаемые безъядерные гепатоциты. В группе ПК печень сохраняла типичное радиальное расположение тяжей гепатоцитов относительно центральной вены, которая выглядела слегка полнокровной. Ядра гепатоцитов были четко очерченными и округлыми, а цитоплазма – однородной, без признаков дегенерации. Отмечались умеренная васкуляризация портальных трактов и единичные очаги лейкоцитарной инфильтрации без некроза и кровоизлияний. В группе ХС+ПК гистоархитектура печени оставалась интактной. Центральные вены и синусоиды были умеренно полнокровными, желчные протоки не были обструктивированы. В полях зрения отмечались скопления мелких незрелых гепатоцитов наряду с

участками, содержащими безъядерные гепатоциты. Признаков воспалительной инфильтрации, некроза или атипичной пролиферации

клеток не обнаружено. Визуальное описательное сравнение не выявило выраженных морфологических различий между группами.

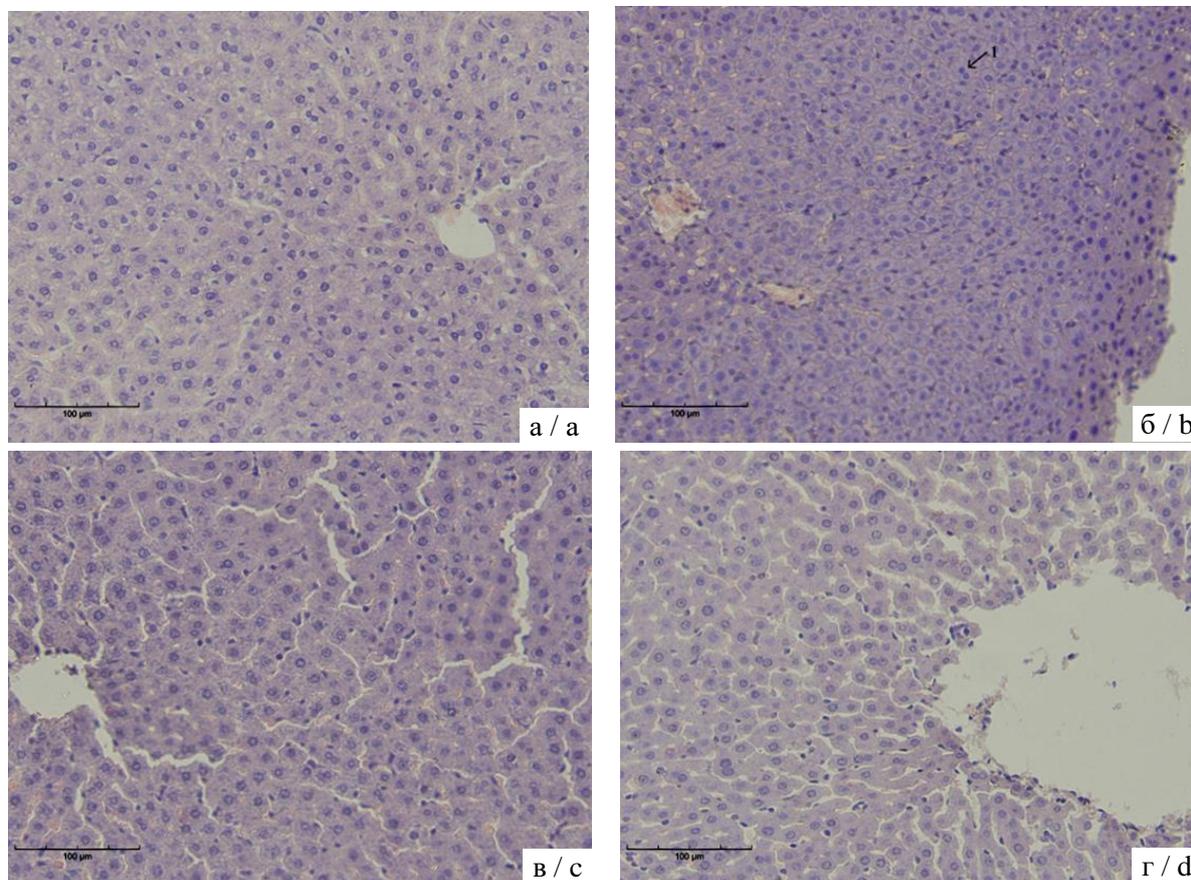


Рис. 1. Микрофотографии срезов ткани печени животных контрольной группы (а) и животных, подвергшихся хроническому стрессу (б), воздействию пищевых консервантов (в) или их комбинации (г). Окраска гематоксилином и эозином; исходное увеличение $\times 200$

Fig. 1. Micrographs of liver sections from control rats (a) and animals subjected to chronic stress (b), food preservatives (sorbic + benzoic acids) (c) or their combination (d). H&E staining; original magnification $\times 200$

Морфометрические показатели гепатоцитов представлены на рис. 2. Площадь ядер в контрольной группе составила $33,42 \pm 0,52$ μm^2 , в группе хронического стресса она достоверно снизилась до $26,53 \pm 0,54$ μm^2 , ($p < 0,0001$), тогда как в группе, получавшей сорбиновую и бензойную кислоты, наблюдалось, напротив, увеличение до $37,12 \pm 0,80$ μm^2 ($p = 0,0004$). Примеча-

тельно, что в группе комбинированного воздействия площадь ядра оставалась сопоставимой с контрольными значениями, хотя была выявлена тенденция к увеличению ($35,25 \pm 0,78$ μm^2 , $p = 0,0542$). Существенных различий между группами ПК и ПК+ХС не обнаружено ($p = 0,0971$), тогда как статистически значимая разница наблюдалась между группами ХС и ПК+ХС ($p < 0,0001$).

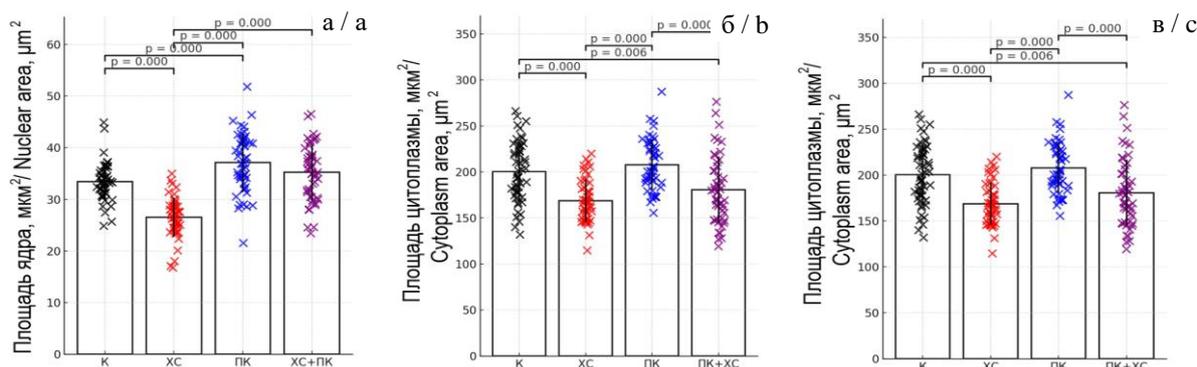


Рис. 2. Морфометрические показатели гепатоцитов: площадь ядра, $\mu\text{м}^2$ (а), площадь цитоплазмы, $\mu\text{м}^2$ (б) и ядерно-цитоплазматическое отношение, % (в). Столбцы отражают средние значения (Mean \pm SE), крестики – индивидуальные наблюдения. Горизонтальные линии указывают на статистически значимые различия, выявленные методом бутстрэпа (10 000 перестановок, $p < 0,05$)

Fig. 2. Morphometric parameters of hepatocytes: nuclear area, μm^2 (a), cytoplasm area, μm^2 (b), and nuclear-to-cytoplasmic ratio, % (c). Columns denote Mean \pm SE; coloured crosses represent individual observations. Horizontal lines indicate statistically significant differences detected by the bootstrap method (10,000 permutations; $p < 0,05$)

Площадь цитоплазмы гепатоцитов в контрольной группе составляла $200,57 \pm 4,67 \mu\text{м}^2$. В группе ХС этот показатель был значительно снижен ($168,83 \pm 3,29 \mu\text{м}^2$, $p < 0,0001$). В группе ПК его значения не отличались от контрольных ($207,96 \pm 3,93 \mu\text{м}^2$, $p = 0,2285$), тогда как в группе ПК+ХС они были значительно ниже ($180,84 \pm 5,14 \mu\text{м}^2$, $p = 0,0060$). Существенная разница была обнаружена между группами ПК и ПК+ХС ($p = 0,0001$), но не между группами ХС и ПК+ХС ($p = 0,0511$).

В контрольной группе ЯЦО составляло $0,17 \pm 0,01$, что значимо не отличалось от значений в группе ХС – $0,16 \pm 0,01$ ($p = 0,102$). В группе ПК показатель был несколько выше, но статистически незначимо ($0,18 \pm 0,01$, $p = 0,157$). В группе ПК+ХС значения параметра были выше контроля ($0,20 \pm 0,01$, $p = 0,0005$), а также отличались от группы ПК ($p = 0,029$) и группы ХС ($p < 0,0001$).

Количество двуядерных гепатоцитов было достоверно увеличено в группе, подвергнутой воздействию хронического стресса ($15,90 \pm 1,67$ против $9,30 \pm 1,14$ в контроле, $p = 0,006$), но не отличалось от контрольной группы ни в группе ПК ($8,70 \pm 0,50$, $p = 0,595$), ни в группе ПК+ХС ($9,00 \pm 0,70$, $p = 0,822$) (рис. 3 а). В группе ПК двуядерных гепатоцитов было меньше в сравнении с группой ХС

($p = 0,001$), равно как и в группе ПК+ХС ($p = 0,003$). Количество безъядерных гепатоцитов в контроле составило $3,30 \pm 0,37$ ед., в экспериментальных группах значения были сопоставимы: $3,00 \pm 0,39$ в группах ХС и ПК ($p = 0,633$ в сравнении с К) и $3,60 \pm 0,34$ в группе ПК+ХС ($p = 0,521$ в сравнении с К) (рис. 3 б).

В совокупности у крыс, подвергшихся воздействию хронического стресса, уменьшение площади ядра и цитоплазмы при росте числа двуядерных клеток отражает раннюю регенеративную реакцию на стресс-индуцированное повреждение, что согласуется с данными литературы. Хи и соавт. показали, что четырехнедельное воздействие хронического психологического стресса само по себе может инициировать воспалительный ответ и ухудшать функции печени у крыс, вплоть до некроза гепатоцитов [20]. Однако выявленные в нашем исследовании изменения носили скорее компенсаторный характер. Некроз не выявлен, но присутствуют двуядерные гепатоциты, что может отражать развитие компенсаторной регенерации или защитной реакции на стресс [21]. Двуядерные клетки, как известно, составляют основную пролиферативную популяцию при регенерации печени, в т.ч. после токсического повреждения [22].

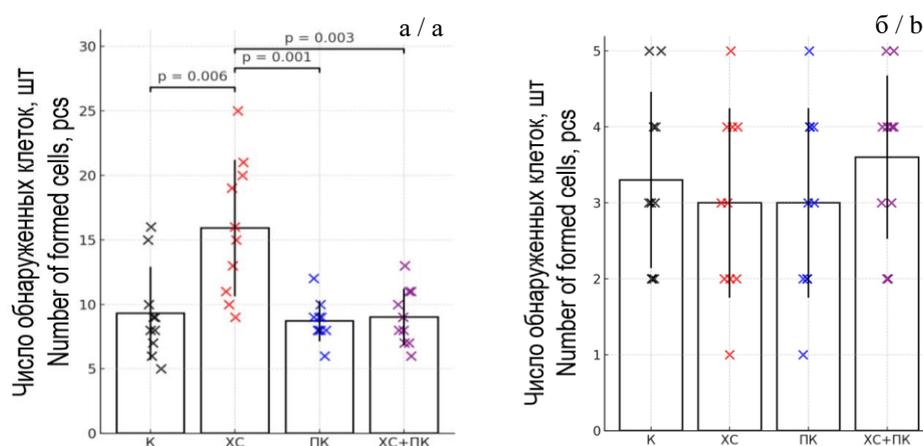


Рис. 3. Количество двуядерных (а) и безъядерных (б) гепатоцитов в группах исследования. Столбцы отражают средние значения (Mean±SE), крестики – индивидуальные наблюдения. Горизонтальные линии указывают на статистически значимые различия, выявленные методом бутстрепа (10 000 перестановок, $p < 0,05$)

Fig. 3. Counts of binucleated (a) and anucleated (b) hepatocytes in the study groups. Columns denote Mean±SE; coloured crosses represent individual observations. Horizontal lines indicate statistically significant differences detected by the bootstrap method (10,000 permutations; $p < 0.05$)

При воздействии консервантов наблюдались гипертрофия гепатоцитов без цитолиза и сниженное число двуядерных клеток, что указывает на функциональную перегрузку зрелых клеток при сохранении их структуры и согласуется с известными нам работами других исследовательских коллективов [7, 8].

В группе ПК+XC сохранялась архитектоника и не изменялось число двуядерных клеток при значимом уменьшении цитоплазматической площади и росте ЯЦО. Это свидетельствует о раннем клеточном стрессе и энергетическом дефиците без явного цитолиза. Вероятно, хронизация стресса усиливает или трансформирует эффект пищевых консервантов на морфологическом уровне даже при отсутствии выраженной деструкции ткани. Для количественного уточнения типа взаимодействия (аддитивность, синергизм, антагонизм) необходим дальнейший математический анализ.

Заключение. Установлено, что хронический стресс вызывает уменьшение размеров гепатоцитов и компенсаторное увеличение

числа двуядерных клеток без некротических изменений. Пероральное подострое поступление сорбиновой и бензойной кислот в изученных дозах приводит к умеренной гипертрофии гепатоцитов без признаков острой цитотоксичности. При сочетании стресса и консервантов наблюдается сокращение цитоплазматической площади и рост ядерно-цитоплазматического отношения на фоне сохранной архитектоники, что, вероятно, отражает раннюю фазу клеточного стресса и потенциальную угрозу функциональной декомпенсации. Полученные данные свидетельствуют о способности хронического стресса модифицировать гепатотоксический эффект пищевых консервантов. Однако окончательные выводы о характере взаимодействия – аддитивном, синергичном или антагонистическом – требуют разработки математических подходов к анализу токсического действия химического агента на фоне стресса, что представляет собой перспективное направление дальнейших исследований.

Исследование было выполнено в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2021–2025 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования: Каримов Д.О., Рябова Ю.В.

Литературный поиск, участие в исследовании, обработка материала: Каримов Д.Д.,

Гизатуллина А.А., Смолянкин Д.А., Хмель А.О.

Статистическая обработка данных: Каримов Д.О.

Анализ и интерпретация данных: Каримов Д.О., Рябова Ю.В., Каримов Д.Д.

Написание и редактирование текста: Каримов Д.О., Рябова Ю.В.

Литература

1. *Ceccato S., Kettner S.E., Kudielka B.M., Schwieren C., Voss A.* Social preferences under chronic stress. *PLoS One.* 2018; 13 (7): e0199528.
2. *Bird W., Adamo G., Pitini E., Gray M., Jani A.* Reducing chronic stress to promote health in adults: the role of social prescriptions and social movements. *J R Soc Med.* 2020; 113 (3): 105–109.
3. *Girotti M., Bulin S.E., Carreno F.R.* Effects of chronic stress on cognitive function – From neurobiology to intervention. *Neurobiol Stress.* 2024; 33: 100670.
4. *Андреева И.В., Виноградов А.А., Симаков Р.Ю.* Влияние хронического предаторного стресса на микроциркуляцию печени крыс. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2024; 23 (4): 124–130.
5. *Joung J.Y., Cho J.H., Kim Y.H., Choi S.H., Son C.G.* (2019) A literature review for the mechanisms of stress-induced liver injury. *Brain Behav.* 2019; 9 (3): e01235.
6. *Reichel M., Rhein C., Hofmann L. M., Monti J., Japtok L., Langgartner D., Fuchsl A. M., Kleuser B., Gulbins E., Hellerbrand C., Reber S. O., Kornhuber J.* Chronic psychosocial stress in mice is associated with increased acid sphingomyelinase activity in liver and serum and with hepatic C 16:0-ceramide accumulation. *Frontiers in psychiatry.* 2018; 9: 496.
7. *Taghavi F., Habibi-Rezaei M., Bohlooli M., Farhadi M., Goodarzi M., Movaghati S., Maghami P., Taghibiglou C., Amanlou M., Haertlé T., Moosavi-Movahedi A.A.* Antiamyloidogenic Effects of Ellagic Acid on Human Serum Albumin Fibril Formation Induced by Potassium Sorbate and Glucose. *Journal of molecular recognition: JMR.* 2016; 29 (12): 611–618.
8. *Chen C.H., Ho S.N., Hu P.A., Kou Y.R., Lee T.S.* Food preservative sorbic acid deregulates hepatic fatty acid metabolism. *J Food Drug Anal.* 2020; 28 (2): 206–216.
9. *López-González D., Ferradás Y., Araniti F., Graña E., Hermida-Ramón J.M., González M.V., Teijeira M., Rey M., Reigosa M.J., Sánchez-Moreiras A.M.* Trans-cinnamaldehyde-related overproduction of benzoic acid and oxidative stress on *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science.* 2023; 14: 1157309.
10. *Matisz C.E., Badenhorst C.A., Gruber A.J.* Chronic unpredictable stress shifts rat behavior from exploration to exploitation. *Stress.* 2021; 24 (5): 635–644.
11. *Гизатуллина А.А., Хуснутдинова Н.Ю., Каримов Д.Д., Смолянкин Д.А., Валова Я.В., Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Репина Э.Ф., Ахмадеев А.Р.* Влияние хронического стресса на степень токсичности акриламида у крыс. *Гигиена и санитария.* 2024; 103 (3): 258–265.
12. *Репина Э.Ф., Каримов Д.О., Якупова Т.Г., Хуснутдинова Н.Ю., Бакиров А.Б., Афанасьева А.А., Валова Я.В., Гизатуллина А.А.* Экспрессия генов антиоксидантной защиты при хроническом воздействии акриламида и медикаментозной коррекции. *Медицина труда и экология человека.* 2024; 3 (39): 163–175.
13. *Alexa A.I., Zamfir C.L., Bogdănici C.M., Oancea A., Maștaleru A., Abdulan I.M., Brănișteanu D.C., Ciobîcă A., Balmuș M., Stratulat-Alexa T., Ciuntu R.E., Severin F., Mocanu M., Leon M.M.* The impact of chronic stress on behavior and body mass in new animal models. *Brain Sciences.* 2023; 13 (10): 1492.
14. *Kim M., Jeong M.* Analysis of changes in stress hormone concentration by stress and diet in rats. *Alternative & Integrative Medicine.* 2018; 7: 054.
15. *Perhonen M., Takala T., Huttunen P., Leppäluoto J.* Stress hormones after prolonged physical training in normo- and hypobaric conditions in rats. *International Journal of Sports Medicine.* 2025; 16 (2): 73–77.
16. *Joëls M., Karst H., Sarabdjitsingh R. A.* The stressed brain of humans and rodents. *Acta Physiologica (Oxf).* 2018; 223 (2): e13066.

17. *Eichstaedt K.E., Kovatch K., Maroof D.A.* A less conservative method to adjust for familywise error rate in neuropsychological research: the Holm's sequential Bonferroni procedure. *Neurorehabilitation*. 2013; 32: 693–696.
18. *Iba K., Shinozaki T., Maruo K., Noma H.* Re-evaluation of the comparative effectiveness of bootstrap-based optimism correction methods in the development of multivariable clinical prediction models. *BMC Medical Research Methodology*. 2021; 21: 9.
19. *Pang J., Ju W., Welch M., Gauger P., Liu P., Zhang Q., Wang C.* Nonparametric bootstrap methods for interval estimation of the area under the ROC curve with correlated diagnostic test data: application to whole-virus ELISA testing in swine. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023; 10: 1274786.
20. *Xu M.Y., Guo C.C., Li M.Y., Lou Y.H., Chen Z.R., Liu B.W., Lan L.* Brain-gut-liver axis: Chronic psychological stress promotes liver injury and fibrosis via gut in rats. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 1040749.
21. *Darmasaputra G.S., Geerlings C.C., Chuva de Sousa Lopes S.M., Clevers H., Galli M.* Binucleated human hepatocytes arise through late cytokinetic regression during endomitosis M phase. *J Cell Biol*. 2024; 5: 223 (8): e202403020.
22. *Hammad S., Friebel A., Begher-Tibbe B., Amnah O., Vartak A., Hoehme S., Edlund K., Vonrecklinghausen I., Drasdo D., Hengstler J.G.* Role of binucleated hepatocytes in hepatotoxicity and liver regeneration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2014; 387: S46–S47.

Поступила в редакцию 17.05.2025; принята 31.08.2025.

Авторский коллектив

Каримов Денис Олегович – кандидат медицинских наук, заведующий отделом токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека». 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94; старший научный сотрудник отдела исследований общественного здоровья, ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н.А. Семашко». 105064, Россия, г. Москва, ул. Воронцово поле, 12, стр. 1; e-mail: karimovdo@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0039-6757>.

Рябова Юлия Владимировна – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией токсикологии отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека». 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94; e-mail: ryabovayuvl@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>

Каримов Денис Дмитриевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека». 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94; e-mail: karriden@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1962-2323>.

Газитуллина Алина Анваровна – младший научный сотрудник лаборатории генетики отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека». 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94; e-mail: alinagisa@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7321-0864>.

Смолянкин Денис Анатольевич – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека». 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94; e-mail: smolyankin.denis@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7957-2399>.

Хмель Александра Олеговна – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека». 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94; e-mail: khmel.al01@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0008-3068-3961>.

Образец цитирования

Каримов Д.О., Рябова Ю.В., Каримов Д.Д., Гизатуллина А.А., Смолянкин Д.А., Хмель А.О. Гистологические изменения печени крыс при воздействии пищевых консервантов на фоне хронического стресса. Ульяновский медико-биологический журнал. 2025; 3: 154–164. DOI: 10.34014/2227-1848-2025-3-154-164.

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER OF RATS EXPOSED TO FOOD PRESERVATIVES UNDER CHRONIC STRESS

D.O. Karimov ^{1,2}, Yu.V. Ryabova ¹, D.D. Karimov ¹, A.A. Gizatullina ¹,
D.A. Smolyankin ¹, A.O. Khmel' ¹

¹ Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia;

² N.A. Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

The effects of the combined exposure to food preservatives and chronic stress on the liver remain poorly understood, although both factors are widespread in the modern world.

Objective. The aim of the study is to determine the nature and degree of morphological changes in rat liver after 28-day exposure to sorbic and benzoic acids and to find out whether chronic psychological stress enhances the toxic effect of the above-mentioned food preservatives.

Materials and Methods. The authors conducted a 28-day in vivo experiment. Male rats (n=24) were divided into 4 equal groups: control, chronic stress, food preservatives, and combined effect of the above-mentioned factors. After euthanasia, histological examination and morphometry were performed. We assessed the area of hepatocyte nucleus and cytoplasm, the nuclear-cytoplasmic ratio (NCR), and the number of binucleated and anucleate cells. Statistical analysis was performed using the bootstrap method with Holm-Bonferroni correction ($p < 0.05$).

Results. Chronic stress decreased the nuclear area (-20 %, $p < 0.0001$) and the cytoplasm area (-16 %, $p < 0.0001$), but increased the number of binucleated hepatocytes (+71 %, $p = 0.006$). Necrotic changes were not recorded. Preservatives caused moderate hepatocyte hypertrophy (nuclear area +11 %, $p = 0.0004$) without increase in NCR and cytolysis. Under the collective effect of factors, the cytoplasm area decreased (-10 %, $p = 0.0060$), and NCR increased (+18 %, $p = 0.0005$) with preserved architecture and an unchanged number of binucleated cells.

Conclusion. Chronic stress modifies early hepatotoxic effects of sorbic and benzoic acids. The process is accompanied by an increase in the nuclear-cytoplasmic ratio. Final conclusions on the problem under consideration require further development of mathematical approaches to the analysis of the toxic effect of a chemical agent under chronic psycho-emotional stress.

Key words: liver, histology, chronic stress, sorbic acid, benzoic acid, rats, experiment, morphometry.

The study was carried out as part of the industry research program, Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare of the Russian Federation, 2021–2025.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Research concept and design: Karimov D.O., Ryabova Yu.V.

Literature search, participation in the study, data processing: Karimov D.D.,

Gizatullina A.A., Smolyankin D.A., Khmel' A.O.

Statistical data processing: Karimov D.O.

Data analysis and interpretation: Karimov D.O., Ryabova Yu.V., Karimov D.D.

Text writing and editing: Karimov D.O., Ryabova Yu.V.

References

1. Ceccato S., Kettner S.E., Kudielka B.M., Schwieren C., Voss A. Social preferences under chronic stress. *PLoS One*. 2018; 13 (7): e0199528.

2. Bird W., Adamo G., Pitini E., Gray M., Jani A. Reducing chronic stress to promote health in adults: the role of social prescriptions and social movements. *J R Soc Med.* 2020; 113 (3): 105–109.
3. Girotti M., Bulin S.E., Carreno F.R. Effects of chronic stress on cognitive function – From neurobiology to intervention. *Neurobiol Stress.* 2024; 33: 100670.
4. Andreeva I.V., Vinogradov A.A., Simakov R.Yu. Vliyanie khronicheskogo predatornogo stressa na mikrotsirkulyatsiyu pecheni krysa [Effect of chronic predatory stress on rat liver microcirculation]. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2024; 23 (4): 124–130 (in Russian).
5. Joung J.Y., Cho J.H., Kim Y.H., Choi S.H., Son C.G. (2019) A literature review for the mechanisms of stress-induced liver injury. *Brain Behav.* 2019; 9 (3): e01235.
6. Reichel M., Rhein C., Hofmann L. M., Monti J., Japtok L., Langgartner D., Fuchsl A. M., Kleuser B., Gulbins E., Hellerbrand C., Reber S. O., Kornhuber J. Chronic psychosocial stress in mice is associated with increased acid sphingomyelinase activity in liver and serum and with hepatic C 16:0-ceramide accumulation. *Frontiers in psychiatry.* 2018; 9: 496.
7. Taghavi F., Habibi-Rezaei M., Bohlooli M., Farhadi M., Goodarzi M., Movaghati S., Maghami P., Taghibiglou C., Amanlou M., Haertlé T., Moosavi-Movahedi A.A. Antiamyloidogenic Effects of Ellagic Acid on Human Serum Albumin Fibril Formation Induced by Potassium Sorbate and Glucose. *Journal of molecular recognition: JMR.* 2016; 29 (12): 611–618.
8. Chen C.H., Ho S.N., Hu P.A., Kou Y.R., Lee T.S. Food preservative sorbic acid deregulates hepatic fatty acid metabolism. *J Food Drug Anal.* 2020; 28 (2): 206–216.
9. López-González D., Ferradás Y., Araniti F., Graña E., Hermida-Ramón J.M., González M.V., Teijeira M., Rey M., Reigosa M.J., Sánchez-Moreiras A.M. Trans-cinnamaldehyde-related overproduction of benzoic acid and oxidative stress on *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science.* 2023; 14: 1157309.
10. Matisz C.E., Badenhorst C.A., Gruber A.J. Chronic unpredictable stress shifts rat behavior from exploration to exploitation. *Stress.* 2021; 24 (5): 635–644.
11. Gizatullina A.A., Khusnutdinova N.Yu., Karimov D.D., Smolyankin D.A., Valova Ya.V., Karimov D.O., Mukhammadieva G.F., Repina E.F., Akhmadeev A.R. Vliyanie khronicheskogo stressa na stepen' toksichnosti akrilamida u krysa [Effect of chronic stress on the degree of acrylamide toxicity in rats]. *Gigiena i sanitariya.* 2024; 103 (3): 258–265 (in Russian).
12. Repina E.F., Karimov D.O., Yakupova T.G., Khusnutdinova N.Yu., Bakirov A.B., Afanas'eva A.A., Valova Ya.V., Gizatullina A.A. Ekspressiya genov antioksidantnoy zashchity pri khronicheskom vozdeystvii akrilamida i medikamentoznoy korrektsii [Expression of antioxidant defense genes under chronic acrylamide exposure and drug correction]. *Meditsina truda i ekologiya cheloveka.* 2024; 3 (39): 163–175 (in Russian).
13. Alexa A.I., Zamfir C.L. Bogdănici C.M., Oancea A., Maștaleru A., Abdulan I.M., Brănișteanu D.C., Ciobîcă A., Balmuș M., Stratulat-Alexa T., Ciuntu R.E., Severin F., Mocanu M., Leon M.M. The impact of chronic stress on behavior and body mass in new animal models. *Brain Sciences.* 2023; 13 (10): 1492.
14. Kim M., Jeong M. Analysis of changes in stress hormone concentration by stress and diet in rats. *Alternative & Integrative Medicine.* 2018; 7: 054.
15. Perhonen M., Takala T., Huttunen P., Leppäluoto J. Stress hormones after prolonged physical training in normo- and hypobaric conditions in rats. *International Journal of Sports Medicine.* 2025; 16 (2): 73–77.
16. Joëls M., Karst H., Sarabdjitsingh R. A. The stressed brain of humans and rodents. *Acta Physiologica (Oxf).* 2018; 223 (2): e13066.
17. Eichstaedt K.E., Kovatch K., Maroof D.A. A less conservative method to adjust for familywise error rate in neuropsychological research: the Holm's sequential Bonferroni procedure. *Neurorehabilitation.* 2013; 32: 693–696.
18. Iba K., Shinozaki T., Maruo K., Noma H. Re-evaluation of the comparative effectiveness of bootstrap-based optimism correction methods in the development of multivariable clinical prediction models. *BMC Medical Research Methodology.* 2021; 21: 9.
19. Pang J., Ju W., Welch M., Gauger P., Liu P., Zhang Q., Wang C. Nonparametric bootstrap methods for interval estimation of the area under the ROC curve with correlated diagnostic test data: application to whole-virus ELISA testing in swine. *Frontiers in Veterinary Science.* 2023; 10: 1274786.
20. Xu M.Y., Guo C.C., Li M.Y., Lou Y.H., Chen Z.R., Liu B.W., Lan L. Brain-gut-liver axis: Chronic psychological stress promotes liver injury and fibrosis via gut in rats. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12: 1040749.

21. Darmasaputra G.S., Geerlings C.C., Chuva de Sousa Lopes S.M., Clevers H., Galli M. Binucleated human hepatocytes arise through late cytokinetic regression during endomitosis M phase. *J Cell Biol.* 2024; 5: 223 (8): e202403020.
22. Hammad S., Friebel A., Begher-Tibbe B., Amnah O., Vartak A., Hoehme S., Edlund K., Vonrecklinghausen I., Drasdo D., Hengstler J.G. Role of binucleated hepatocytes in hepatotoxicity and liver regeneration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2014; 387: S46–S47.

Received May 17, 2025; accepted August 31, 2025.

Information about the authors

Karimov Denis Olegovich, Candidate of Sciences (Medicine), Head of the Department of Toxicology and Genetics with the Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology. 450106, Russia, Ufa, Stepan Kuvykin St., 94; Senior Researcher, Public Health Research Department, N.A. Semashko National Research Institute of Public Health. 105064, Russia, Moscow, Vorontsovo Pole St., 12, Bldg. 1; e-mail: karimovdo@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0039-6757>.

Ryabova Yuliya Vladimirovna, Candidate of Sciences (Medicine), Head of the Toxicology Laboratory, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology. 450106, Russia, Ufa, Stepan Kuvykin St., 94; e-mail: ryabovayuvl@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>

Karimov Denis Dmitrievich, Candidate of Sciences (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetics, Department of Toxicology and Genetics with Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology. 450106, Russia, Ufa, Stepan Kuvykin St., 94; e-mail: karriden@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1962-2323>.

Gazitullina Alina Anvarovna, Junior Researcher, Laboratory of Genetics, Department of Toxicology and Genetics with Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology. 450106, Russia, Ufa, Stepan Kuvykin St., 94; e-mail: alinagisa@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7321-0864>.

Smolyankin Denis Anatol'evich, Junior Researcher, Toxicology Laboratory, Toxicology and Genetics Department with Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology. 450106, Russia, Ufa, Stepan Kuvykin St., 94; e-mail: smolyankin.denis@yandex.ru, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7957-2399>.

Khmel' Aleksandra Olegovna, Junior Researcher, Toxicology Laboratory, Toxicology and Genetics Department with Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology. 450106, Russia, Ufa, Stepan Kuvykin St., 94; e-mail: khmel.al01@gmail.com, ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0008-3068-3961>.

For citation

Karimov D.O., Ryabova Yu.V., Karimov D.D., Gizatullina A.A., Smolyankin D.A., Khmel' A.O. Gistologicheskie izmeneniya pecheni krysa pri vozdeystvii pishchevykh konservantov na fone khronicheskogo stressa [Histological changes in the liver of rats exposed to food preservatives under chronic stress]. *Ulyanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal.* 2025; 3: 154–164. DOI: 10.34014/2227-1848-2025-3-154-164 (in Russian).