

## **ВПЛИВ ТРИПТОФАНУ НА ГІСТОМОРФОМЕТРИЧНІ ЗМІНИ БУРОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ**

**Р. Янко**

*Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України  
вул. Богомольця, 4, Київ 01024, Україна  
e-mail: biolag@ukr.net*

Літературні дані про вплив триптофану на буру жирову тканину (БЖТ) неоднозначні. Переважно досліджували його роль на БЖТ за наявної патології в організмі, насамперед – за ожиріння. Проте ефект використання триптофану на функціонування здорової БЖТ є мало дослідженим. **Мета** цієї роботи – вивчити вплив L-триптофану на гістоморфометричні показники БЖТ здорових щурів. Дослідження проводили на самцях щурів лінії Wistar, вік яких на початку експерименту становив 3 міс. Щурів розподілили на дві групи по 12 тварин у кожній: I група – контроль, II група – дослідні тварини, які щодня перорально отримували L-триптофан у дозі 80 мг/кг маси тіла. Роботу зі щурами проводили відповідно до принципів Гельсінської декларації. З міжлопаткових тіл БЖТ виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою. З мікропрепаратів БЖТ робили фотознімки за допомогою цифрової камери. Гістоморфометрію здійснювали на цифрових зображеннях за допомогою комп'ютерної програми «Image J». Під час гістоморфометричного аналізу БЖТ щурів, які отримували L-триптофан, виявлено зростання кількості адипоцитів з однією великою ліпідною краплею (у 12 разів) та меншу кількість власне бурих адипоцитів (у 1,5 рази). Зростали розміри адипоцитів за рахунок збільшення площі ліпідних крапель (на 174 %), розташованих у цитоплазмі. Зниження площі ядра, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, кількості ядерців вказує на пригнічення синтетичної активності адипоцитів. Також у БЖТ цих щурів виявили зростання відносної площі сполучної тканини (на 13 %) та зменшення площі судин (на 27 %), що свідчить про гіршу перфузію, пригнічення транспорту кисню до паренхіматозних елементів, погіршення умов для перебігу процесів метаболізму. Отже, 28-добовий вплив L-триптофану має морфологічні ознаки зниження функціональної активності БЖТ у здорових щурів і призводить до процесу її «відбілювання» – переродження у білу жирову тканину. Тому, незважаючи на досліджений позитивний ефект триптофану на більшість органів, його слід вживати обережно, щоб не зашкодити функціонуванню БЖТ.

*Ключові слова:* триптофан, бурий жир, морфометрія

Триптофан є незамінною амінокислотою, яка надходить до організму виключно з харчовими продуктами. Він відіграє вирішальну роль у біосинтезі білків і є попередником для синтезу багатьох важливих біоактивних сполук. Триптофан впливає на різні патофізіологічні процеси, включаючи функцію нейронів, метаболізм, запальні й імунні реакції, окиснювальний стрес і гомеостаз кишківника [18]. Триптофан використовують у лікуванні депресії та розладів сну, головним чином завдяки його зв'язку зі синтезом серотоніну і мелатоніну. Недостатнє надходження триптофану з їжею може призводити до розладів аутистичного спектру, ожиріння, анорексії та нервової булімії [4, 9, 19].

Бура жирова тканина (БЖТ) спеціалізується на витрачання енергії за допомогою тер-

могенезу [12]. Окрім цього, є багато доказів того, що БЖТ має ендокринну функцію [10]. Дослідження на гризунах вказують на життєво важливу роль БЖТ у гомеостазі глюкози та ліпідів, що робить її важливою терапевтичною мішенню для лікування метаболічних розладів, пов'язаних із такими захворюваннями, як ожиріння та діабет 2 типу [14].

Проте, незважаючи на добре вивчену роль триптофану в організмі й на те, як він впливає на стан БЖТ, енергетичний потенціал бурих адипоцитів досліджено мало. Переважно вивчали ефект триптофану на БЖТ за тієї чи іншої патології в організмі, насамперед – за ожиріння. А отримані дані часто мають неоднозначний характер., що може бути пов'язано з використанням в експериментах різного дозування L-триптофану, тривалості проведення досліджень тощо. На сьогодні залишається відкритим питання, наскільки доцільне використання триптофану для підвищення функціонування БЖТ у відносно здоровому організмі. Адже ефект від впливу триптофану на БЖТ у здоровому організмі чи, навпаки, в організмі з наявною патологією може бути різним. І вживання надлишку продуктів, які містять цю незамінну амінокислоту, може навіть зашкодити здоров'ю. Все це потребує більш детального вивчення ролі та механізмів впливу триптофану на БЖТ.

Мета роботи – дослідити гістоморфометричні зміни паренхіми БЖТ у відносно здорових щурів після введення L-триптофану та визначити доцільність його застосування для підвищення функціонування бурого жиру за потреби.

#### Матеріали та методи

Дослідження проведено на 24 щурах-самцях лінії Wistar 3-місячного віку. Тварини обох груп перебували в уніфікованих умовах, на стандартному раціоні харчування. Щурів розподілили на дві групи по 12 тварин у кожній: I група – контроль, II група – дослідні тварини, які щодня перорально, з додаванням до стандартного корму, отримували L-триптофан (Ajinomoto Eurolysine S.A.S, Франція) у дозі 80 мг/кг маси тіла тварин. Ця доза триптофану підібрана на основі літературних даних і є середньою серед доз, застосовуваних іншими дослідниками для вивчення його ефекту на різні органи. Добова норма вживання триптофану в складі стандартного комбікорму (Резон-1 «Рецепт К 120-1», Україна) для щура становила 56 мг/кг. Доступ до води був вільним. Тривалість експерименту – 28 днів. Щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під ізофлурановою анестезією відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986).

Для гістоморфометричних досліджень випадково відбирали зразки тканини з міжлопаткових тіл БЖТ, з яких виготовляли гістологічні препарати за стандартною методикою [11]. Фіксували зразки тканини в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації та проводили заливання в парафін. Парафінові зрізи завтовшки 6 мкм виготовляли на санному мікротомі (MC-2, Reichert, Австрія). Забарвлення отриманих зрізів здійснювали гематоксиліном Бемера та еозином і за методом Ван-Гізона. Мікрофотографії проводили за допомогою світлооптичного мікроскопа «Nikon Eclipse E100» (Японія) з цифровою камерою («Levenhuk», США). Морфометричний аналіз фотографій серійних зрізів здійснювали за допомогою програми «ImageJ 1.34» [13].

На гістологічних зрізах БЖТ визначали відносну площу паренхіми, стромы та судин. Розраховували стромально-паренхіматозний індекс (відношення відносної площі сполучної тканини до площі паренхіми) і трофічний індекс (відношення відносної площі судин до площі паренхіми та стромы) [1]. Вимірювали середній діаметр і площу поперечного перерізу адипоцитів, їхніх ядер та цитоплазми. Підраховували кількість і визначали щільність розміщення адипоцитів на 1000 мкм<sup>2</sup>. Рахували кількість ядерців на 100 ядер адипоцитів. Підраховували кількість і визначали площу ліпідних крапель в адипоцитах. За кількістю ліпідних крапель проводили розподіл адипоцитів у БЖТ на три

типи: А1 – містять 1 велику ліпідну краплю (білий адипоцит); А2 – містять 1 велику ліпідну краплю та кілька малих (бежевий адипоцит); А3 – містять багато дрібних крапель (бурий адипоцит). Підраховували 100 адипоцитів на різних зрізах. Кількість адипоцитів кожного типу виражали у відсотках від загальної кількості порахованих клітин. Для полегшення підрахунку клітин ділянку досліджуваного зрізу розділяли на сектори. 10 полів зору БЖТ кожного щура аналізували за допомогою сліпого кількісного аналізу.

Отримані дані опрацьовували методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення «Statistica 6.0». Нормальність розподілу цифрових масивів перевіряли, застосовуючи критерій Пірсона. Усі результати досліджень підпорядковувалися закону нормального розподілу. Достовірність відмінностей між контрольною та дослідною групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Відмінності вважали достовірними за значенням  $P < 0,05$ .

### Результати і їхнє обговорення

Маса тіла як контрольних, так і дослідних щурів за час експерименту мала незначну тенденцію до зростання. У щурів, які отримували L-триптофан, маса міжлопаткової БЖТ була вірогідно більшою від контролю на 19 %.

Виявлено, що міжлопаткова БЖТ щурів складається зі спеціалізованих адипоцитів, які відрізняються від клітин білої жирової тканини. Адипоцити містять середніх розмірів ядро з кількома ядрцями, зазвичай розміщене по центру. Ядро оточене багатьма ліпідними краплями, добре відмежованими одна від одної. Завдяки цьому клітини мають багатокамерний вигляд. Такі клітини власне і є функціонально-активними бурими адипоцитами (тип А3). У щурів, які отримували L-триптофан, спостерігали наявність адипоцитів з однією великою ліпідною краплею і зміщеним до мембрани ядром. Такий тип клітин ми позначили як адипоцит 1 типу (А1). За структурою та функціонуванням такі клітини набувають властивостей білих адипоцитів. У контрольних тварин білі адипоцити були поодинокими. Також трапляються адипоцити з однією великою ліпідною краплею, яка оточена кількома малими (адипоцити 2 типу, А2) (рис. 1). Такі клітини називають бежевими, і вони є перехідним типом між білими та бурими адипоцитами [7].

Під час гістоморфометричного аналізу БЖТ щурів, які отримували L-триптофан, виявлено вірогідне зростання кількості білих адипоцитів у 12 разів. У цих щурів спостерігали меншу кількість власне бурих адипоцитів (А3) у 1,5 рази та більшу кількість бежевих клітин (А2) у 1,7 рази, порівняно з контролем (рис. 2).

Площа адипоцитів і площа їхньої цитоплазми у дослідних тварин були вірогідно більшими на 36 % і 40 % відповідно. При цьому площа ядра, навпаки, була меншою на 12 % ( $P < 0,05$ ), що призвело до зниження ядерно-цитоплазматичного співвідношення на 37 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Зростання розмірів адипоцитів пов'язане зі збільшенням площі розташованих у них ліпідних крапель на 174 % ( $P < 0,05$ ). Кількість ліпідних крапель у клітинах була меншою на 54 % ( $P < 0,05$ ), порівняно з контролем. Кількість адипоцитів і щільність їхнього розміщення на одиницю площі мали тенденцію до зниження. Кількість ядерцець у ядрах адипоцитів щурів II групи також мала тенденцію до зменшення, що вказує на пригнічення синтетичної активності [2]. Також у БЖТ щурів, які отримували L-триптофан, виявили зростання відносної площі сполучної тканини на 13 % ( $P < 0,05$ ) та зменшення площі судин на 27 % ( $P < 0,05$ ). Трофічний індекс був вірогідно меншим на 28 %, порівняно з контролем (див. таблицю). Зміни цих показників свідчать про меншу функціональну активність адипоцитів, гіршу перфузію, пригнічення транспорту кисню до паренхіматозних елементів, погіршення умов для перебігу процесів метаболізму. Тобто отримані морфометричні дані вказують, що введення L-триптофану знижує функціональну активність БЖТ і призводить до переродження її в білу жирову тканину.

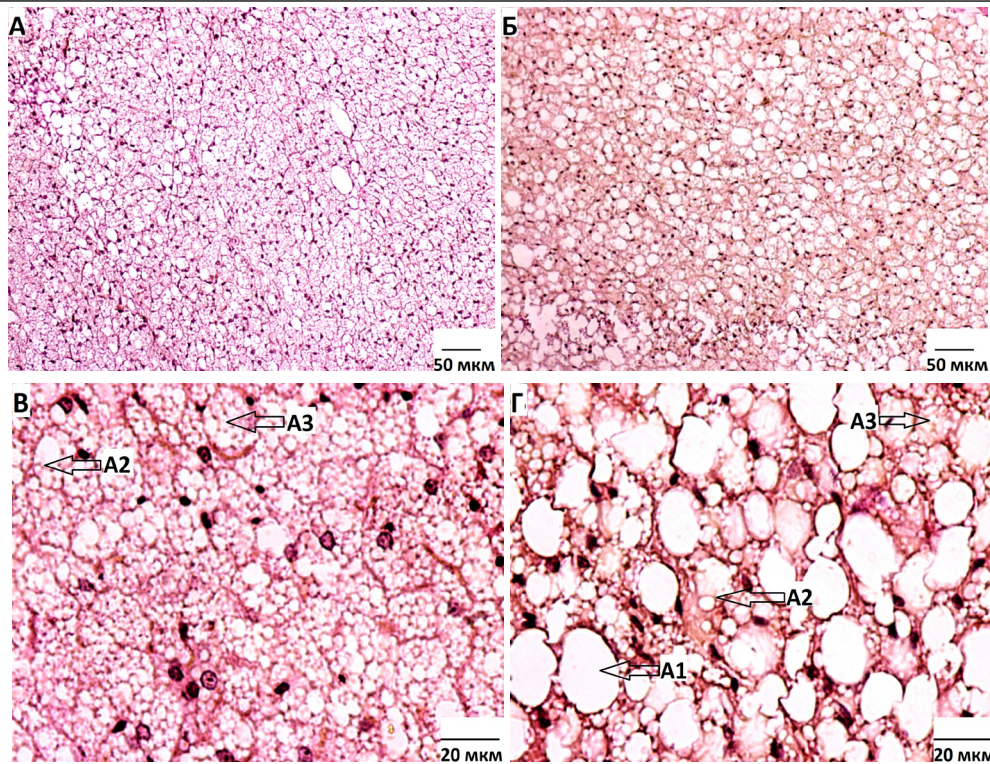


Рис. 1. Мікрофотографія бруної жирової тканини контрольного щура (А –  $\times 200$ , В –  $\times 800$ ) та щура, який отримував L-триптофан (Б –  $\times 200$ , Г –  $\times 800$ ); забарвлення за Ван-Гізоном: А1 – адипоцит з 1 великою ліпідною краплею (білий адипоцит); А2 – адипоцит з однією великою та кількома дрібними краплями (бежевий адипоцит); А3 – адипоцит із великою кількістю дрібних ліпідних крапель (бурий адипоцит)

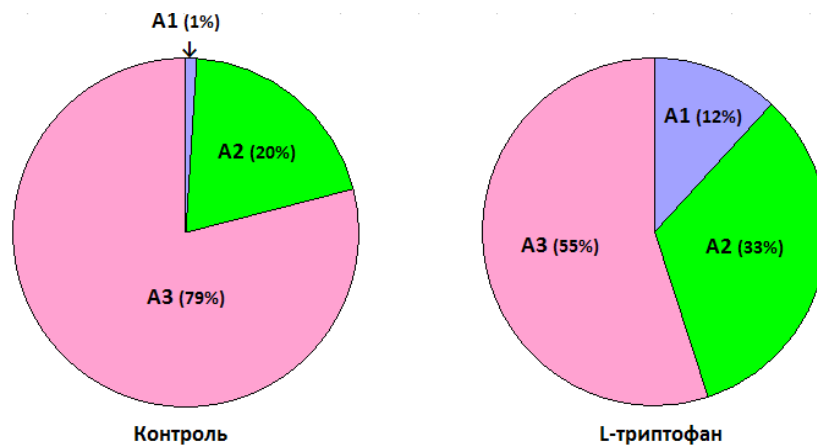


Рис. 2. Кількість адипоцитів різних типів у бруній жировій тканині щурів: А1 – містять 1 велику ліпідну краплю (білі адипоцити), А2 – містять 1 велику ліпідну краплю і кілька малих (бежеві адипоцити), А3 – містять багато дрібних крапель (бурі адипоцити). Кількість клітин кожного типу представлено у відсотках від загальної кількості порохваних адипоцитів

Гістоморфометричні показники бурої жирової тканини (M±m; n=12)

| Показники  | Контроль    | L-триптофан  |
|--|-------------|--------------|
| Діаметр адипоцита, мкм                                     | 18,6±0,7    | 20,1±0,7     |
| Площа, мкм <sup>2</sup> :                                  |             |              |
| адипоцита  | 300,2±18,0  | 409,4±19,8*  |
| ядра   | 23,1±0,4    | 20,4±0,5*    |
| цитоплазми   | 277,1±15,6  | 389,0±17,1*  |
| Ядерно-цитоплазматичне співвідношення                      | 0,083±0,008 | 0,052±0,001* |
| Щільність розміщення адипоцитів, шт./1000 мкм <sup>2</sup> | 2,57±0,11   | 2,30±0,15    |
| Кількість ядерць у ядрі, шт.                               | 1,60±0,07   | 1,46±0,04    |
| Кількість ліпідних крапель в адипоциті, шт.                | 17,8±0,6    | 8,2±0,6*     |
| Площа ліпідних крапель, мкм <sup>2</sup>                   | 11,5±0,7    | 31,5±1,2*    |
| Відносна площа, %:   |             |              |
| паренхіми  | 92,1±1,1    | 92,4±1,3     |
| сполучної тканини  | 4,6±0,1     | 5,2±0,2*     |
| судин  | 3,3±0,1     | 2,4±0,1*     |
| Стромально-паренхіматозний індекс                          | 0,086±0,008 | 0,082±0,006  |
| Трофічний індекс   | 0,036±0,005 | 0,026±0,003* |

**Примітка:** \*P<0,05 – вірогідність порівняно з контролем

Інші автори переважно досліджували вплив триптофану та його похідних (серотоніну і мелатоніну) на БЖТ під час ожиріння. Адже відомо, що підвищення активності БЖТ може мати велике значення у витраті калорій і сприяти контролю вісцерального ожиріння [6]. Досліджено, що центральний і периферичний пули серотоніну діють протилежно. Так, серотонін центральної дії, синтезований у мозку, активує БЖТ і зменшує споживання їжі, тоді як периферичний серотонін, що надходить головним чином із кишківника, стимулює розвиток ожиріння [5]. Виявлено, що мелатонін у більшості досліджень пригнічує розвиток ожиріння за висококалорійного раціону, посилюючи активність БЖТ і витрати енергії [3, 16].

Механізм, через який триптофан впливає на БЖТ, досліджено не повністю. Його ефект на дану тканину може безпосередньо проявлятися через його похідні, насамперед через мелатонін. Мелатонін впливає на БЖТ чотирма ймовірними шляхами:

1) мелатонін стимулює рецептор MT<sub>1</sub>, розташований на нейронах гіпоталамуса і діє на SCN для збільшення обміну норадреналіну, експресії генів UCP1, PPAR $\gamma$ , PGC1 у БЖТ та сприяє її функціонуванню [15];

2) мелатонін впливає безпосередньо на БЖТ, а саме через зниження внутрішньоклітинного цАМФ, посилюючи експресію UCP1 через активацію рецепторів MT<sub>1</sub> і MT<sub>2</sub> в БЖТ [17];

3) мелатонін покращує функціонування БЖТ на мітохондріальному рівні [8];

4) мелатонін взаємодіє з глюкокортикоїдом, пролактином, інсуліном, глюкагоном, лептином і щитоподібною залозою, що також має важливе значення для функціонування БЖТ [15].

Отже, згідно з нашими даними, є підстави зробити висновок, що 28-добовий вплив L-триптофану (в дозі 80 мг/кг) має морфологічні ознаки зниження функціональної активності БЖТ у здорових щурів і призводить до процесу її «відбілювання» – переродження у білу жирову тканину за рахунок інтенсифікації розвитку білих адипоцитів. Тому, незважаючи на досліджений позитивний ефект триптофану на більшість органів, його слід вживати обережно, щоб не зашкодити функціонуванню БЖТ. Дослідження ефекту триптофану за наявної патології в організмі, насамперед за ожиріння, та вивчення механізмів його впливу на БЖТ перебуватиме в центрі уваги наших майбутніх досліджень.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Cinti S., Zingaretti M. C., Cancellato R.* et al. Morphologic techniques for the study of brown adipose tissue and white adipose tissue // *Methods Mol. Biol.* 2001. Vol. 155. P. 21–51. DOI: 10.1385/1-59259-231-7:021.
2. *Dubois M. L., Boisvert F. M.* The nucleolus: structure and function // *The Functional Nucleus.* 2016. Vol. 23. P. 29–49. DOI: 10.1007/978-3-319-38882-3\_2.
3. *Halpern B., Mancini M. C., Bueno C.* et al. Melatonin increases brown adipose tissue volume and activity in patients with melatonin deficiency: A proof-of-concept study // *Diabetes.* 2019. Vol. 68. N 5. P. 947–952. DOI: 10.2337/db18-0956.
4. *Kaluźna-Czaplińska J., Gątarek P., Chirumbolo S.* et al. How important is tryptophan in human health? // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019. Vol. 59. N 1. P. 72–88. DOI: 10.1080/10408398.2017.1357534.
5. *Kesić M., Baković P., Farkaš V.* et al. Constitutive serotonin tone as a modulator of brown adipose tissue thermogenesis: A rat study // *Life.* 2023. Vol. 13. N 7. P. 1436. DOI: 10.3390/life13071436.
6. *Kulterer O. C., Herz C. T., Prager M.* et al. Brown adipose tissue prevalence is lower in obesity but its metabolic activity is intact // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2022. Vol. 31. N 13. P. 858417. DOI: 10.3389/fendo.2022.858417.
7. *Lizcano F.* The beige adipocyte as a therapy for metabolic diseases // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. N 20. P. 5058. DOI: 10.3390/ijms20205058.
8. *Navarro-Alarcón M., Ruiz-Ojeda F., Blanca-Herrera R.* et al. Melatonin and metabolic regulation: A review. *Food Funct.* 2014. Vol. 5. N 11. P. 2806–2832. DOI: 10.1039/c4fo00317a.
9. *Platten M., Nollen E. A., Rohrig U. F.* et al. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019. Vol. 18. N 5. P. 379–401. DOI: 10.1038/s41573-019-0016-5.
10. *Reddy N. L., Tan B. K., Barber T. M.* et al. Brown adipose tissue: endocrine determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity // *BMC Obes.* 2014. N 1. P. 13. DOI: 10.1186/s40608-014-0013-5.
11. *Rehfeld A., Nylander M., Karnov K.* Histological Methods. In: *Compendium of Histology.* Springer, Cham. 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-41873-5\_2.
12. *Saito M., Okamatsu-Ogura Y.* Thermogenic brown fat in humans: implications in energy homeostasis, obesity and metabolic disorders // *World J. Mens Health.* 2023. Vol. 41. N 3. P. 489–507. DOI: 10.5534/wjmh.220224.
13. *Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.* NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis // *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9. N 7. P. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
14. *Shinde A.B., Song A., Wang Q.A.* Brown adipose tissue heterogeneity, energy metabolism, and beyond // *Front. Endocrinol.* 2021. N 12. P. 651763. DOI: 10.3389/fendo.2021.651763.
15. *Tan D.X., Manchester L.C., Fuentes-Broto L.* et al. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: Relation to human obesity // *Obes. Rev.* 2011. Vol. 12. N 3. P. 167–188. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2010.00756.x.
16. *Xu L., Li D., Li H.* et al. Suppression of obesity by melatonin through increasing energy expenditure and accelerating lipolysis in mice fed a high-fat diet // *Nutr. Diabetes.* 2022. Vol. 12. N 1. P. 42. DOI: 10.1038/s41387-022-00222-2.
17. *Xu Z., You W., Liu J.* et al. Elucidating the regulatory role of melatonin in brown, white, and beige adipocytes // *Adv. Nutr.* 2020. Vol. 11. N 2. P. 447–460. DOI: 10.1093/advances/nmz070.

18. Xue C., Li G., Zheng Q. et al. Tryptophan metabolism in health and disease // *Cell Metab.* 2023. Vol. 35. N 8. P. 1304–1326. DOI: 10.1016/j.cmet.2023.06.004.
19. Yanko R., Levashov M., Chaka O.G. et al. Tryptophan prevents the development of non-alcoholic fatty liver disease // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2023. Vol. 16. P. 4195–4204. DOI: 10.2147/DMSO.S444278.

*Стаття надійшла до редакції 16.05.24*

*доопрацьована 02.10.24*

*прийнята до друку 03.10.24*

## **INFLUENCE OF TRYPTOPHAN ON HISTOMORPHOMETRIC CHANGES OF THE BROWN ADIPOSE TISSUE IN RATS**

**R. Yanko**

*Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine  
4, Bogomoletz St., Kyiv 01024, Ukraine  
e-mail: biolag@ukr.net*

Literature data on the effects of tryptophan on brown adipose tissue (BAT) are ambiguous. Its role in BAT with existing pathology in the body, primarily obesity, was mainly studied. However, the effect of the use of tryptophan on the functioning of a healthy BAT is little studied. The aim of this work was to study the effect of L-tryptophan on the histomorphometric parameters of the BAT in healthy rats. The study was conducted on male Wistar rats, whose age at the beginning of the experiment was 3 months. Rats were divided into 2 groups (12 animals in each): I group – control, II group – experimental animals, which received daily oral L-tryptophan at a dose of 80 mg/kg body weight. Work with rats was carried out in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. Histological preparations were made from the interscapular bodies of the BAT according to the standard method. Micropreparations of the BAT were photographed using a digital camera. Morphometry of the BAT was carried out on digital images using the computer program “Image J”. Histomorphometric analysis of the BAT of rats treated with L-tryptophan revealed an increase in the number of adipocytes with one large lipid droplet (12 times more) and a smaller number of brown adipocytes (1.5 times less). The size of adipocytes increased due to an increase in the area of lipid droplets (by 174 %) located in the cytoplasm. A decrease in the area of the nucleus, the nuclear-cytoplasmic ratio, and the number of nucleolus indicates inhibition of the synthetic activity of adipocytes. An increase in the relative area of connective tissue (by 13 %) and a decrease in the area of blood vessels (by 27 %) were also found in the BAT of these rats, which indicates worse perfusion, inhibition of oxygen transport to parenchymal elements, deterioration of conditions for metabolic processes. Therefore, a 28-day exposure to L-tryptophan has morphological signs of a decrease in the functional activity of BAT in healthy rats and leads to the process of its «whitening» – transformation into white adipose tissue. Therefore, despite the researched positive effect of tryptophan on many organs, it should be taken carefully so as not to harm the functioning of the BAT.

*Keywords:* tryptophan, brown fat, morphometry