УДК 577.24

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГЕПАТОЦИТОВ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ПРИ СОДЕРЖАНИИ ЖИВОТНЫХ НА СТАНДАРТНОЙ СУХОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИЕТЕ*

© 2020 В.Б. Вайс¹, И.М. Вангели¹, О.А. Аверина¹, М.Л. Ловать², Л.Е. Бакеева^{1**}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bakeeva@belozersky.msu.ru
² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

> Поступила в редакцию 07.07.2020 После доработки 07.07.2020 Принята к публикации 18.07.2020

Исследование ультраструктуры гепатоцитов печени, проведенное методом трансмиссионной электронной микроскопии, показало, что у лабораторных мышей, содержавшихся в различных вивариях в г. Москва и получавших питание в виде сухой лабораторной диеты отечественных производителей, не имеющей стандартизации по исходным продуктам, развиваются значительные деструктивные изменения гепатоцитов. При этом нарушения в ультраструктуре паренхимных клеток печени происходят вне зависимости от статуса животного (SPF или конвенциональные), условий различных вивариев, а также производителя корма. В то же время ультраструктурное исследование гепатоцитов печени мышей, содержавшихся в питомнике «Charles River» (Германия) и получавших корм фирмы «Altromin Spezialfutter» («GmbH&Co», Германия), использующих входной контроль качества ингредиентов, не выявило деструктивных нарушений во внутрененей ультраструктуры слднако если эти мыши в дальнейшем получали корм, произведенный в России, нарушения структуры клеток печени развивались уже через 2 месяца. Таким образом, питание сухими кормами отечественных производителей неуказанного состава вызывает у контрольных животных значительные изменения в ультраструктуре гепатоцитов, отражающие развитие патологических процессов в организме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, гепатоциты, ультраструктура, мыши, стандартная лабораторная диета. **DOI:** 10.31857/S0320972520090092

введение

Печень — самая крупная железа пищеварительной системы, выполняющая множество важнейших функций. Ткани печени стали одними из первых для широкого изучения методом электронной микроскопии. Благодаря быстрому прогрессу этого метода был накоплен огромный материал, касающийся ультратонкого строения ткани печени. Ультраструктура гепатоцитов была подробно изучена в ряде классических работ 50—60 гг. XX века. Впервые ультраструктура клеток печени была описана Dalton et al. [1] и Fawcett et al. [2], однако классической считается работа Bruni и Porter [3], в которой, используя различные методы фиксации ткани печени, авторами были показаны особенности ультраструктуры гепатоцитов, остающиеся мировым стандартом до настоящего времени. В печени различают строму и паренхиму, представленную эпителиальными клетками – гепатоцитами. Паренхимные клетки печени млекопитающих полигональной формы, на срезах они имеют неправильно-гексагональную форму с нечетко выраженными углами. Цитоплазматическая мембрана гепатоцита образует многочисленные выросты – микроворсинки, которые увеличивают функционально-активную площадь клетки. На рис. 1, а и б представлена ультраструктура гепатоцитов в норме. Они характеризуются округлыми ядрами, окруженными двумембранной оболочкой и прерывающими ее непрерывность ядерными порами. Ядра имеют ядрышки и зоны гетеро- и эухроматина. Цитоплазма содержит большое количество отдельных митохондрий,

Принятые сокращения: ВЭК – испытательный центр «Виварно-Экспериментальный Комплекс» ООО «НИИ Митоинженерии МГУ»; ИВК – индивидуально вентилируемая клетка; НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени; SPF статус – животные, свободные от специфических патогенов; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; агЭПР – агранулярный ЭПР; грЭПР – гранулярный ЭПР.

^{*} Статья представлена главным редактором акад. В.П. Скулачёвым.

^{**} Адресат для корреспонденции.



Рис. 1. Ультраструктура гепатоцитов, являющаяся общепринятым мировым стандартом (по Bruni и Porter [3]). *а* – Обзорная картина. (Nu) – ядро с ядерной порой (Po). В цитоплазме видны комплексы грЭПР (RER₁–RER₇), митохондрии (Mt), мембраны аппарата Гольджи (Go₁, Go₂, Go₃, Go₄), частицы гликогена (Gl), лизосомы (Ly), липидные включения (L), микротельца (Mi), желчные протоки (BC) и синусоид (S). Увеличение 10 200 ×; δ – участок паренхимной клетки печени крысы при большем увеличении. Стрелками показаны цистерны грЭПР. (Go) – аппарат Гольджи. Увеличение 22 000 × (по Bruni и Porter [3])

много рибосом, гранулы гликогена и цистерны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), простирающиеся по всей цитоплазме. Мембраны ЭПР всегда окружают митохондрии, которыми изобилует цитоплазма гепатоцитов (их число в одной клетки превышает 1000), а также контактируют с мембранами аппарата Гольджи [3]. ЭПР состоит из двух частей: зернистой (гранулярной) и гладкой (агранулярной). В норме гранулярная часть ЭПР гораздо более развита, чем агранулярная. Гранулярный ЭПР (грЭПР) имеет вид стопок (до 20) уплощенных цистерн, которые по отдельности имеют слегка изогнутую форму и расположены параллельно друг другу. ГрЭПР в клетках печени крысы непрерывен с агранулярным ЭПР (агЭПР). Мембраны агЭПР расположены вблизи цитоплазматической мембраны гепатоцитов.

Одна из важнейших функций гепатоцитов – детоксикация токсичных веществ – связана с агЭПР. Метаболизм углеводов также связан с агЭПР. В цистернах грЭПР синтезируются альбумины, фибриноген и глобулины плазмы крови; аппарат Гольджи отвечает за завершение синтетических процессов [4].

Известно, что любые изменения в работе гепатоцитов, в том числе вызванные развитием патологических процессов в организме, отражаются на состоянии ультраструктуры гепатоцитов. Так, при детоксикации токсических веществ, согласно литературным данным, агЭПР сильно разрастается, заполняя собой всю цитоплазму [4–8]. При этом после удаления токсических веществ избыток сети агЭПР уничтожается путем аутофагии [7]. При внепеченочном холестазе [6] после введения гепатотоксических

и канцерогенных веществ, таких как фенобарбитал [4], этионин [7] и дубильная кислота [8], наблюдается различная степень гипертрофии агЭПР. Многие из перечисленных соединений вызывают такие деструктивные изменения гепатоцитов, как увеличение просвета цистерн, потеря взаимнопараллельного расположения мембран грЭПР, набухание митохондрий. Показано, что гепатит С, вирусное инфекционное заболевание, поражающее печень, может развиваться бессимптомно годами, пока поражение печени не достигнет критического уровня [9]. При этом вирус гепатита С вызывает значительные изменения ультраструктуры гепатоцитов. В клетках развивается «цитоплазматическая диссоциация» - дистрофические изменения гепатоцитов: набухание клеток с разрежением цитоплазмы, набухание митохондрий, гиперплазия агЭПР, гипертрофия аппарата Гольджи и деструктивные изменения ядер [9, 10].

Одним из самых широко распространенных заболеваний печени в мире в настоящее время признан жировой гепатоз (стеатоз) или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – это состояние, при котором более 5% массы печени составляет жир, преимущественно триглицериды. НАЖБП прогрессирует до фиброза и цирроза печени [11]. Предполагают, что патогенез НАЖБП может быть связан с инсулинорезистентностью [12, 13]; развитие патологии возможно в результате использования неправильного рациона питания, в котором наблюдается преобладание жиров и углеводов. При НАЖБП в клетках паренхимы печени происходят значительные нарушения ультраструктуры гепатоцитов: накопление липидных включений, набухание митохондрий, нарушение структуры ЭПР [14 - 16].В экспериментальных условиях НАЖБП вызывается при кормлении лабораторных животных сухими кормами с измененным составом - увеличенным содержанием холестерола и (или) фруктозы [14–16].

В настоящее время в отечественных вивариях лабораторные животные получают стандартную лабораторную диету в виде сухих кормов преимущественно российских производителей. Состав кормов регламентируется госстандартом «ГОСТ Р 50258-92 от 1992 г.» [17]. В то время как в зарубежных кормах полностью регламентируется белковый, углеводный, жировой, микроэлементный и витаминный состав, включая состав аминокислот, российские производители указывают только сырье, из которого изготавливают корма. Это допускает наличие в корме неконтролируемых, не подлежащих мониторингу компонентов. При этом данных о детальных исследованиях состояния тканей контрольных лабораторных животных, потребляющих корма российских производителей, в том числе об ультраструктуре гепатоцитов, в литературе нет. Мы провели исследование ультраструктуры гепатоцитов лабораторных животных, питавшихся сухими кормами различных российских производителей в условиях различных вивариев, а также сравнение с ультраструктурой клеток печени мышей, получавших корм европейского производителя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых мышах самцах, потреблявших различные виды кормов. В работе были использованы следующие животные:

— мыши гибриды F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса (животные свободные от специфических патогенов) в возрасте 3 мес. (n = 5), получавшие автоклавированный корм «Чара» (ООО «Ассортимент-АГРО», Россия), содержались в индивидуально вентилируемых клетках (ИВК) по 5—8 голов в каждой в условиях испытательного центра виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (ВЭК);

— мыши гибриды F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 1 мес. (n = 5), получавшие автоклавированный корм «ЛБК-120_106104» («Тосненский комбикормовый завод», Россия), содержались в ИВК по 5—8 голов в каждой в условиях ВЭК;

— мыши C57Bl/6 SPF статуса в возрасте 3 мес. (n = 3), получавшие автоклавированный корм «Чара» (ООО «Ассортимент-АГРО», Россия), содержались в ИВК по 5—8 голов в каждой в условиях вивария в лаборатории Трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова;

– мыши C57Bl/6 в возрасте 1 мес. (n = 3); конвенциональные животные содержались в комнате для передержки животных кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и получали лабораторный корм ООО «Лабораторкорм», Россия;

— мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес. (n = 5), питомник «Charles River» (Германия), поставщик в Россию — ООО «ЛБИ», получавшие корм фирмы «Altromin Spezialfutter» («GmbH&Co», Германия);

— мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 3 мес. (n = 5). Первый месяц жизни животные содержались в условиях питомника «Charies River» (Германия) и получали корм фирмы «Altromin Spezialfutter» (GmbH&Co, Германия); второй и третий месяцы жизни мыши содержались в ИВК по 5—8 голов в каждой в условиях ВЭК, питались лабораторным кормом «ЛБК-120_106104» («Тосненский комбикормовый завод», Россия).

Корм и вода были предоставлены в свободном доступе, при световом режиме 12/12 и температуре воздуха 20–24 °С. В качестве подстила использовали деревянную щепу Safe BK 8/15 («JRS», Германия). Все материалы, поступавшие к животным, содержавшимся в ИВК, были стерилизованы. Эвтаназию мышей проводили декапитацией, отбор и фиксацию тканей проводили в течение 1 мин после декапитации.

Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировали раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (концентрация 3%), pH 7,4 в течение 2 ч при 4 °C; затем дофиксировали 1%-ным раствором четырёхокиси осмия в фосфатном буфере в течение 1,5 ч и обезвоживали в растворах спиртов с возрастающей концентрацией спирта — 50; 60; 70; 96 и 100%. Материал заливали в эпоксидную смолу Эпон-812. Серийные ультратонкие срезы делали алмазным ножом на ультрамикротоме Leica ULTRACUT UCT («Leica», Германия). Срезы контрастировали в цитрате свинца по методу Reynolds [18]. Исследование проводили на электронном микроскопе JEM-1400 («Jeol», Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлена обзорная картина ультраструктуры гепатоцитов мышей гибридов F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшихся в ИВК в условиях ВЭК и получавших автоклавированный корм «Чара». Можно видеть, что общая структура паренхимной ткани печени не нарушена. Отсутствуют признаки набухания, мембраны клеток гепатоцитов плотно прилегают друг к другу, видны желчные канальцы. В клетках присутствуют жировые капли, но их число невелико. Однако при отсутствии признаков нарушения общей структуры паренхимной ткани параметры внутренней ультраструктуры гепатоцитов значительно отличались от установленных в классических работах стандартов. На рис. 2 показаны обширные пространства внутри клеток, «свободные» от органелл, все клеточные органеллы оказываются зажаты между электронно-светлыми областями. На рис. 3 при большем увеличении видно, что



Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов мыши гибрида F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся в ИВК в условиях ВЭК и получавшей автоклавированный корм «Чара». На фотографии можно видеть 4 гепатоцита (показаны цифрами 1–4). Стрелками показаны жировые капли. В клетках видны обширные пространства внутри клеток, заполненные аморфным веществом (А); ЖК – желчный каналец



Рис. 3. Фрагмент паренхимной клетки печени мыши гибрида F1 (C57BI/6xCBA) SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся в ИВК в условиях ВЭК и получавшей автоклавированный корм «Чара». Митохондрии продолговатой или округлой формы (М), окруженные хаотично расположенными мембранами грЭПР, зажаты между электронно-светлыми областями, заполнены аморфным веществом (А). Стрелками показаны жировые капли



Рис. 4. Обзорная фотография гепатоцитов мыши C57Bl/6 SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся в условиях в лаборатории Трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и получавшей лабораторный корм «Чара». Видны 5 паренхимных клеток печени (показаны цифрами 1–5), расположенные между ними капилляры с эритроцитами (Э) внутри. Во всех гепатоцитах присутствуют свободные от клеточных органелл электронно-светлые области (А). Стрелками показаны жировые капли

эти участки заполнены аморфным веществом и не являются результатом набухания. При этом внутренняя ультраструктура цитоплазматических органелл соответствует норме: можно видеть многочисленные митохондрии продолговатой или округлой формы, окруженные мембранами грЭПР. Комплексы мембран грЭПР расположены хаотично и сконцентрированы вокруг митохондрий.

Кроме мышей, содержавшихся в условиях ВЭК, мы исследовали ультраструктуру гепатоцитов мышей C57Bl/6 SPF статуса, содержавшихся в условиях вивария в лаборатории Трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова и получавших тот же лабораторный корм «Чара». На рис. 4 видно, что у этой группы животных общая структура паренхимной ткани также не нарушена, хорошо видны границы соседних гепатоцитов, видны эндотелиальные клетки капилляров. Однако и у этих животных во всех гепатоцитах присутствуют свободные от клеточных органелл электронно-светлые области. Как и в предыдущей группе животных, все внутриклеточные органеллы оказываются зажаты в узких тяжах цитоплазмы, расположенных между этими обширными зонами, заполненными аморфным веществом. Таким образом, у мышей SPF статуса, потреблявших корм «Чара», вне зависимости от места содержания, внутренняя ультраструктура гепатоцитов печени была значительно нарушена.

В дальнейших исследованиях мы снизили возраст исследуемых мышей и изменили лабораторный корм, получаемый животными. Мы взяли образцы печени у мышей гибридов F1 (C57Bl/ 6xCBA) SPF статуса в возрасте не 3, а 1 мес., содержавшихся в ИВК в условиях ВЭК и получавших автоклавированный корм «ЛБК-120 106104». Также как и у предыдущих групп животных, у этих мышей на малом увеличении можно было видеть, что общая структура ткани печени не нарушена. Как и в предыдущих группах животных, в ткани печени отсутствовали признаки набухания. Однако на большем увеличении видно, что гепатоциты мышей, получавших корм «ЛБК-120 106104», также как и предыдущие группы мышей, имеют существенные отличия от классических представлений о структуре паренхимных клеток печени в норме (рис. 5). В гепатоцитах присутствуют свободные от органелл пространства, заполненные электронно-светлым аморфным содержимым. Митохондрии продолговатой и округлой формы с немногочисленными кристами окружены комплексами мембран грЭПР, не имеющими правильной упаковки.



Рис. 5. Особенности внутренней ультраструктуры гепатоцита мыши гибрида F1 (C57Bl/6xCBA) SPF статуса в возрасте 1 мес., содержавшейся в условиях ВЭК и получавшей автоклавированный корм «ЛБК-120_106104». Видны свободные от органелл пространства, заполненные электронно-светлым аморфным содержимым (А). Митохондрии продолговатой и округлой формы с немногочисленными кристами (М) окружены комплексами мембран грЭПР, на периферии клетки можно видеть мембраны агЭПР. ЖК – желчный каналец

У конвенциональных мышей C57Bl/6 в возрасте 1 мес., содержавшихся в комнате передержки биологического факультета МГУ и получавших лабораторный корм ООО «Лабораторкорм», выявлены значительные изменения внутренней ультраструктуры гепатоцитов, полностью совпадающие с описанными выше (рис. 6).

С целью проверки предположения о влиянии корма на структуру гепатоцитов мы исследовали образцы печени мышей стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес., полученных непосредственно из питомника «Charies River». Животные исследованной нами группы получали только корм фирмы «Altromin Spezialfutter». Ультраструктура гепатоцитов таких мышей соответствовала общепринятым электронно-микроскопическим данным. На рис. 7 представлена ультраструктура гепатоцитов этой группы мышей на малом увеличении. Видно, что гепатоциты имеют неправильно-гексагональную форму, равномерно заполнены цитоплазматическим содержимым. Округлые ядра расположены в центральной части гепатоцита, цитоплазма клеток изобилует органеллами. На рис. 8 – ультраструктура гепатоцита на большем увеличении. Многочисленные митохондрии овальной или округлой формы равномерно расположены по всей цитоплазме гепатоцита. Хорошо развит грЭПР: видны стопки параллельно расположенных мембран с находящимися на наружной мембране многочисленными осмиофильными гранулами диаметром 12-15 нм - рибосомами. Мембраны агЭПР находятся вблизи плазматической мембраны гепатоцита.

После прибытия из питомника «Charies River» в возрасте 1 мес. (статус SPF) оставшиеся мыши данной группы содержались в течение 2 мес. в ИВК в условиях ВЭК, где питались лабораторным кормом «ЛБК-120_106104». В возрасте 3 мес. нами были взяты образцы печени таких животных. Как видно из рис. 9, у таких животных за 2 мес. развивались значительные нарушения внутренней ультраструктуры гепатоцитов, соответствующие деструктивным изменениям, выявленным у других животных, содержавшихся на кормах отечественных производителей (рис. 2–6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, наше исследование показало, что у всех групп лабораторных мышей, содержавшихся в различных вивариях в г. Москва и получавших питание в виде сухого корма отечественных производителей, развиваются значительные патологические изменения во внутренней ультраструктуре гепатоцитов. При этом нарушения в ультраструктуре клеток печени наблюдаются вне зависимости от статуса животного (SPF или конвенциональные), вне зависимости от условий вивария, а также вне зависимости от производителя корма (аналогичные результаты были получены нами и для крыс Wistar). При этом ультраструктурное исследование гепатоцитов печени мышей, содержавшихся в питомнике «Charles River» и получавших корм «Altromin Spezialfutter», не выявило патологических нарушений во внутренней ультраструктуре клеток. Однако если этих мышей в дальнейшем переводили на корм, произведенный в России, нарушения структуры клеток печени развивались уже через 2 мес.

Следует отметить, что в настоящее время в достаточном числе работ по исследованию печени приводятся электронно-микроскопические фотографии. При этом на контрольных фотографиях гепатоцитов здоровых особей в отдельных работах можно видеть изменения, аналогичные найденным нами. Более того, картина гепатоцитов с деструктивными признаками приводится в качестве контроля не только в работах, выполненных на лабораторных животных, но и на человеке. Так, в работе Falconet et al. проводилось исследование ультраструктуры гепатоцитов людей с хроническим гепатитом С [10]. Видно, что на контрольной фотографии гепатоцита, полученного из материала биопсии здорового человека, присутствуют обширные пространства внутри клеток, «свободные» от органелл, заполненные аморфным веществом, грЭПР и митохондрии оказываются зажаты в узких тяжах цитоплазмы. В работе Silva et al. проводилось исследование изменений печени при развитии стеатоза у детей [19]. В качестве контрольной группы также были взяты дети в возрасте от 1 года до 14 лет с нормальным физическим развитием. Однако и в этом случае на представленных контрольных электронно-микроскопических фотографиях гепатоцитов можно видеть в клетках пространства свободные от органелл и значительные изменения цитоплазматического содержимого. Таким образом, даже у людей без явных признаков патологии выявляются аналогичные деструктивные изменения в печени. Можно предположить, что такие нарушения могут быть связаны с неправильным питанием.

Ультраструктурные нарушения гепатоцитов, соответствующие описанным нами, в литературе встречаются в работах по исследованию действия диет с высоким содержанием жиров и сахара на животных. Так, в статье Dallak et al. [14], выполненной на крысах Sprague-Dawley, показано, что диета с высоким содержанием хо-



Рис. 6. Обзорная фотография гепатоцитов конвенциональной мыши C57Bl/6 в возрасте 1 мес., содержавшейся в комнате передержки биологического факультета МГУ и получавшей лабораторный корм ООО «Лабораторкорм». Видны 7 паренхимных клеток печени (показаны цифрами 1–7) и расположенные между ними капилляры. Электронно-светлые области (А) присутствуют во внутреннем пространстве всех гепатоцитов



Рис. 7. Ультраструктура гепатоцитов печени мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес., содержавшейся в условиях питомника «Charies River» и получавшей корм фирмы «Altromin Spezialfutter». 5 гепатоцитов обозначены цифрами 1–5. Округлые ядра расположены в центральной части гепатоцита



Рис. 8. Внутренняя ультраструктура гепатоцита мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 1 мес., содержавшейся в условиях питомника «Charies River» и получавшей корм фирмы «Altromin Spezialfutter». Митохондрии овальной или округлой формы (М) равномерно расположены по всей цитоплазме гепатоцита. Видны стопки параллельно расположенных мембран грЭПР. Мембраны агЭПР находятся вблизи плазматической мембраны гепатоцита. ЖК – желчный каналец



Рис. 9. Ультраструктура гепатоцитов печени мыши стока CD-1 SPF статуса в возрасте 3 мес., содержавшейся первый месяц жизни в условиях питомника «Charies River» и получавшей корм фирмы «Altromin Spezialfutter» и далее в течение 2 мес. – в условиях ВЭК, получавшей корм «ЛБК -120_106104». На фотографии 6 гепатоцитов обозначены цифрами 1–6. Во всех гепатоцитах присутствуют свободные от клеточных органелл электронно-светлые области, заполненные аморфным веществом (А)

лестерола и глюкозы [20] в течение 15 недель приводила к значительным нарушениям в ультраструктуре гепатоцитов. Авторы интерпретируют появление в клетках пространств, свободных от органелл, как расширение (набухание) эндоплазматического ретикулума и «пузырение» (blebbing) мембран клетки. Однако в нашей работе при анализе внутренней ультраструктуры гепатоцитов на больших увеличениях (рис. 3), которые отсутствуют в работе Dallak et al., мы не видели никаких мембранных образований в участках клеток, свободных от органелл, а также набухания клеточных органелл.

В работе Silva-Veiga et al. у мышей C57Bl/6, получавших в течение 14 недель высококалорийную диету (5000 ккал/кг) [16], а также в работе Abo El-khair et al. [15] у крыс Sprague-Dawley, получавших высокожирную диету [21], на представленных в статьях фотографиях можно видеть изменения ультраструктуры гепатоцитов, сходные с описываемыми нами. При этом в контрольных группах животных, представленных в исследованиях Silva-Veiga et al. [16] и Abo El-khair et al. [15], ультраструктура паренхимных клеток печени соответствует классическим представлениям [3]. Следует отметить, что при развитии жирового стеатоза у животных, получавших высокожирную диету, авторы описывали увеличение гепатоцитов в размерах, значительные повреждения ядра и митохондрий, появление многочисленных жировых капель. Ни одного из этих признаков в нашей работе не найдено. Анализ имеющейся литературы позволяет предположить, что у контрольных мышей, исследованных в нашей работе и получавших корма российских производителей, жировой гепатоз не развивается, однако патологические изменения в печени, связанные с кормом, присутствуют. Одним из основных направлений лечения жирового гепатоза у людей является назначение предложенной Мануилом Певзнером диеты № 5 с содержанием животных белков до 100–120 г/сут, ограниченным количеством жиров, обогащенной лиотропными питательными веществами (творог, гречневая, пшеничная мука), витаминами и микроэлементами [22]. До повсеместного введения сухих кормов в рацион лабораторных животных именно эта диета и ле-

1. Dalton, A. J., Kahler, H., Striebich, M. J., and Lloyd, B. (1950) Finer structure of hepatic, intestinal and renal cells of the mouse as revealed by the electron microscope, *J. Natl. Cancer Inst.*, **11**, 439-461.

 Fawcett, D. W. (1955) Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, 15, 1475-1503.

БИОХИМИЯ том 85 вып. 9 2020

жала в основе питания крыс и мышей. Shichali-Belouic et al. проведено исследование, в котором дневные песчанки (Psammomys obesus), отловленные в дикой природе в полупустыне Алжира, были переведены на стандартную лабораторную диету [23]. Авторами показано, что через 9 мес. у таких животных развивается стеатоз, сопровождающийся значительными деструктивными изменениями в ультраструктуре гепатоцитов. Полученные авторами результаты заставляют задуматься об общепринятых стандартах в отношении сухих кормов, поскольку некоторые стандартные лабораторные диеты могут не соответствовать потребностям организма конкретного вида животных. Таким образом, нами показано, что при кормлении лабораторных животных (мышей и крыс) сухими кормами отечественных производителей, широко используемыми в нашей стране, в клетках печени развиваются значительные деструктивные изменения.

Полученный результат выявляет необходимость подробного и полного исследования состава кормов (при параллельном контроле цитологических, физиологических, биохимических и других параметров тканей лабораторных животных, потребляющих эти корма) с целью определения корректной диеты, необходимой для полноценного содержания животных в вивариях. Представляется, что эти данные имеют особое значение при экспериментальных исследованиях функциональных характеристик клеточных органелл гепатоцитов лабораторных животных, так как ультраструктурные перестройки, как известно, отражают изменения в метаболических процессах в клетке, в ткани и в целом организме.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-00578) и выполнена при поддержке ЦИТИС (грант № АААА-А19-119012490166-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bruni, C., and Porter, K. R. (1965) The Fine structure of the parenchymal cell of the normal rat liver: I. general observations, *Am. J. Pathol.*, 46, 691-755.
 Jones, A. L., and Fawcett, D. W. (1966) Hypertrophy of the
- 4. Jones, A. L., and Fawcett, D. W. (1966) Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a review on the functions of this organelle in liver), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 215-232.

- 5. Remmer, H., and Merker, H. J. (1965) Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drugmetabolizing enzymes, *Ann. NY Acad. Sci.*, **123**, 79-97. Steiner, J. W., Carruthers, J. S., and Kalifat, S. R. (1962)
- 6. Observations on the fine structure of rat liver cells in extra-hepatic cholestasis, Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 58, 141-159.
 Wood, R. L. (1965) The fine structure of hepatic cells in
- chronic ethionine poisoning and during recovery, Am. J. Pathol., 46, 307-330.
- Arhelger, R. B., Broom, J. S., and Boler, R. K. (1965) 8. Ultrastructural hepatic alterations following tannic acid administration to rabbits, Am. J. Pathol., 46, 409-434.
- Wieczorek, A., Stępień, P. M., Zarębska-Michaluk, D., Kryczka, W., Pabjan, P., and Król, T. (2017) Megamito-9 chondria formation in hepatocytes of patient with chronic
- hepatitis C a case report, *Clin. Exp. Hepatol.*, 3, 169-175. 10. Falcón, V., Acosta-Rivero, N., Chinea, G., Gavilondo, J., de la Rosa, M. C., Menéndez, I., Dueñas-Carrera, S., Viña, A., García, W., Gra, B., Noa, M., Reytor, E., Barceló, M. T., Alvarez, F., and Morales-Grillo, J. (2003) Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients, Biochem. Biophys.
- *Res. Commun.*, **305**, 1085-1090. 11. Zhang, X. Q., Xu, C. F., Yu, C. H., Chen, W. X., and Li, Y. M. (2014) Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 1768-1776.
- Cali, A. M., Zern, T. L., Taksali, S. E., de Oliveira, A. M., Dufour, S., Otvos, J. D., and Caprio, S. (2007) 12 Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proathero-genic state, *Diabetes Care*, **30**, 3093-3098.
- 13 FonTacer, K., and Rozman, D. (2011) Nonalcoholic fatty liver disease: focus on lipoprotein and lipid deregulation, J. Lipids, 2011, 783976.
- 14. Dallak, M. A., Bin-Jaliah, I., Albawardi, A., Haidara, M. A., Sakr, H. F., Eid, R. A., Hassan, W. N., and Al-Ani, B. (2018) Swim exercise training ameliorates hepatocyte ultrastructural alterations in rats fed on a high fat and sugar diet, Ultrastruct. Pathol., 42, 155-161.

- 15. Abo El-Khair, S. M., Ghoneim, F. M., Shabaan, D. A., and Elsamanoudy, A. Z. (2020) Molecular and ultrastructure study of endoplasmic reticulum stress in hepatic steatosis: role of hepatocyte nuclear factor 4α and inflam-
- matory mediators, *Histochem. Cell Biol.*, **153**, 49-62. Silva-Veiga, F. M., Rachid, T. L., de Oliveira, L., Graus-Nunes, F., Mandarim-de-Lacerda, C. A., and Souza-Mello, V. (2018) GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice, *Mol. Cell Endocrinol.*, **474**, 227-237.
- 17. ГОСТ Р 50258-92 (1992) Комбикорма полнорационные для лабораторных животных, Технические условия, Изд. стандартов, с. 8
- 18. Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell Biol., 17, 208-212.
- 19. Silva, G. H., Hessel, G., Coelho, K. I., and Escanhoela, C. A. (2011) Steatosis of indeterminate cause in a pediatric
- (2011) Statistis of indeterminate cause in a pediatric group: is it a primary mitochondrial hepatopathy? Sao Paulo Med J., 129, 217-223.
 Aragno, M., Tomasinelli, C. E., Vercellinatto, I., Catalano, M. G., Collino, M., Fantozzi, R., Danni, O., and Boccuzzi, G. (2009) SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver
- disease induced by Western-type high-fat diet plus fructo-sein rats, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1067-1074.
 Meli, R., MattaceRaso, G., Irace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., Pagano, T. B., Calignano, A., Colonna, A., and Santamaria, R. (2013) High fat diet induced liver attaction and active disconsisting of inerinduces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats, *PLoS One*, **8**, е66570. 22. Певзнер М. И. (1958) *Основы лечебного питания* (под
- ред. Ачаркана А. И. и Маршака М. С.). Медгиз, Москва, с 582
- Sihali-Beloui, O., Aroune, D., Benazouz, F., Hadji, A., El-23. Aoufi, S., and Marco, S. A. (2019) A hypercaloric diet induces hepatic oxidative stress, infiltration of lymphocytes, and mitochondrial reshuffle in Psammomys obesus, a murine model of insulin resistance, C R Biol., 342, 209-219, doi: 10.1016/j.crvi.2019.04.003.

ULTRASTRUCTURE OF HEPATOCYTES IN LABORATORY MICE WHEN KEEPING ANIMALS ON A STANDARD DRY LABORATORY DIET*

V. B. Vays¹, I. M. Vangeli¹, O. A. Averina¹, M. L. Lovat², and L. E. Bakeyeva^{1**}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bakeeva@belozersky.msu.ru

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia

Received July 7, 2020 Revised July 7, 2020 Accepted July 18, 2020

The significant destructive changes in ultrastructure of hepatocytes from laboratory mice kept in different vivariums in Moscow and fed with dry laboratory animal diets acquired from different domestic manufacturers that were not standardized for initial products were demonstrated using electron microscopy. Furthermore, disruption in the ultrastructure of liver parenchymal cells occurred regardless of the animal status (SPF or conventional), conditions of various vivariums, as well as the feed manufacturer. At the same time, studies on ultrastructure of liver hepatocytes from mice kept in the Charles River Laboratory facilities in Germany and fed with the Altromin Spezialfutter laboratory animal diet (GmbH & Co, Germany) that was produced using quality control of ingredients did not reveal destructive changes in the internal ultrastructure of hepatocytes. However, if these mice were later fed with the food produced in local manufactures, changes in the structure of liver cells developed after 2 months. Thus, feeding with dry diet from the domestic producers of an unspecified composition causes significant changes in the ultrastructure of hepatocytes in control animals, reflecting the development of some pathological processes in the body.

Keywords: mitochondria, hepatocytes, ultrastructure, mice, standard laboratory diet