

Является ли использование стандартных сухих кормов гарантией воспроизводимости данных у грызунов?

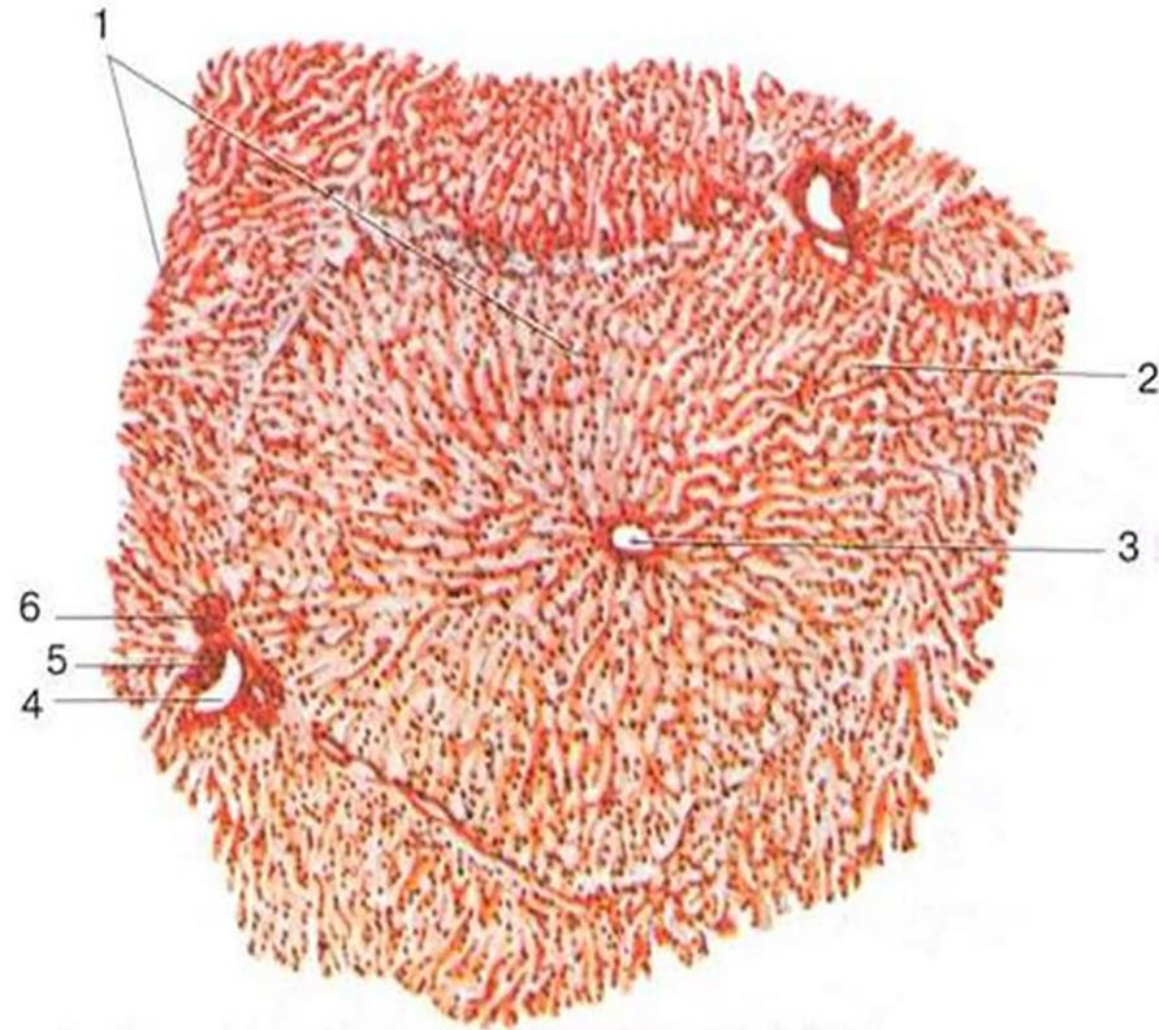
Ловать М.Л.,

*Вайс В.Б., Вангели И.М., Погорелая Е.К.,
Кушнир Е.А. Бакеева Л.Е.*

**Испытательный Центр «Виварно-экспериментальный
комплекс ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», Москва**

**НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского,
МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва,
Россия**

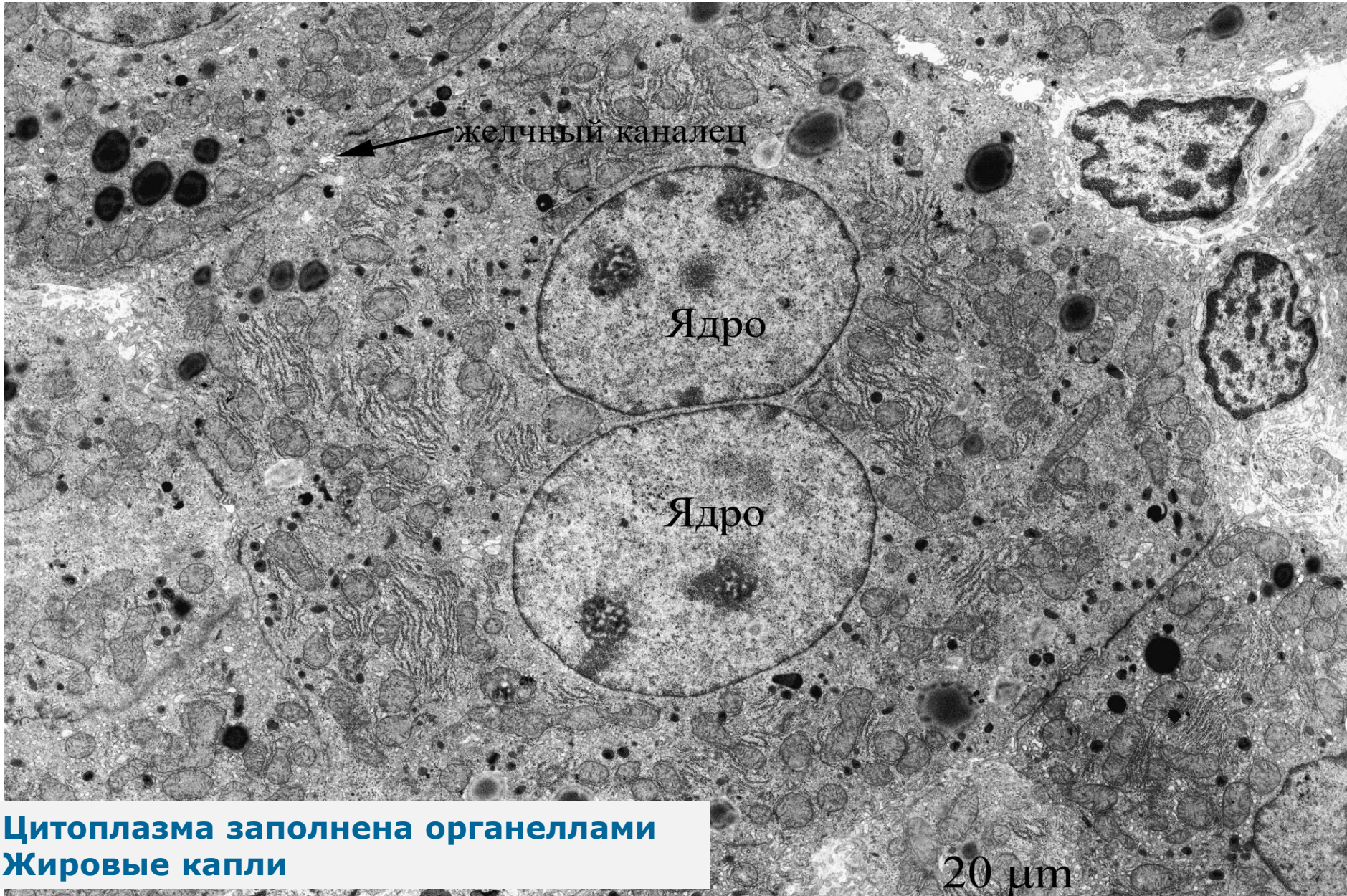
Гистологическое строение дольки печени



1. Дольки печени, *lobuli hepatis*.
2. Синусоид.
3. Центральная вена, *v. centralis*.
4. Междольковая портальная вена, *v. interlobularis*.
5. Междольковая артерия, *a. interlobularis*.
6. Междольковые протоки, *ductuli interlobulares*.

**Ультраструктура
отражает процессы,
идущие в клетке**

Ультраструктура гепатоцита мыши в возрасте 1 месяца. **Норма.**



Особенности внутренней ультраструктуры гепатоцита мыши в возрасте 1 месяца. Норма (большее увеличение).



Что мы видим при рутинных исследованиях?

5 μm

Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 1 месяца, конвенциональные животные, корм «Лабораторкорм»»

Аморфные структуры в цитоплазме

?

Плохой корм?

20 μ m



Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 3 месяцев, **конвенциональные** животные, корм «Чара»

Более половины цитоплазмы заняты аморфными структурами



Животные больны?

20 μm

Экспериментальные группы

Исследованные корма:

- Mucedola
- Altromin
- SSNIFF
- Лабораторкорм
- Чара
- Тосно
- Натуральный

Эвтаназия (10-11 утра):

- Сытые
- Лишенные корма за 12 часов

Режим кормления:

- в с возраста 6 месяцев, в течение полугода
- В течение 1-2 месяцев (с перехода к самостоятельному питанию)

Мыши:

- Конвенциональные
- SPF

Линия: C57Bl/6

Гибриды: F1 C57Bl/6/CBA

Сток: CD1

Питомники:

Charles River,

ИЦИГ (Новосибирск)

Собственное разведение

Состав комбикормов



Mucedola S.p.A.



via g. Galilei, 4 - Settimo Milanese (MI) Italy - Tel. +39 02 48915881 - fax +39 02 48915695

Certificate of analysis n° 211 of June 19, 2020

Update July 14, 2020

Standard Diet 4RF21 certificate

Complete feed for MICE and RATS Maintenance for short and middle period
Autoclavable

Shape: pellet 12 mm
SHELF-LIFE: Best Before 9 months from DOM (Date of Manufacture)

BROMATHOLOGICAL ANALYSIS	Method of analysis	Control	Batch
		3676	367601
		DOM	01/07/2020
		Value %	Value %
Moisture	MUC.UM	9.38	9.87
Crude protein	MUC.PR	16.71	16.20
Crude fat	MUC.GR	3.57	3.43
Crude fibre	MUC.CF	5.79	-
Ash	MUC.CN	6.87	-

IT COMPLIES TO THE ORIGINAL

PESTICIDES ANALYSIS	Value [µg/kg]	Method of analysis	D.L.
Organochlorine			
Esaclorobenzene	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
α-BHC	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
β-BHC	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
γ-BHC (Lindane)	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Keltane	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Eptaclor	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Eptacloroposside	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDE	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDD	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
DDT	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Dieldrin	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Endrin	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Thiodan	ND	EPA - 8081 A	5 µg/kg
Organophosphorus			
Phosdrin	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Diazinon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Disulfoton	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phyrimiphosmetyl	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Ronnel	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Dimetoate	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Fenthion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Metyparathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Malathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Fenitrothion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Parathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phosphamidon	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Methyathion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Phenamphos	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Ethion	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Diclorvos	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
Clorshyphosmetyl	ND	EPA - 8141 A	10 µg/kg
PCB	ND	EPA - 8382	20 µg/kg

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS	Value	Method of analysis
Total Viable Organism	14000	MUC.CBT
Total Coliforms	< 10	MUC.COL
Enterobacteriaceae	< 100	MUC.ENTBAT
Yeasts	< 50	MUC.ML
Molds	< 50	MUC.ML
Fecal indicators		
Enterococcus faecium	< 10	MUC.ENT
Enterococcus faecalis	< 10	MUC.ENT
E.coli	< 10	MUC.E.coli
Pathogens		
Staphylococcus aureus	< 10	MUC.STAPH
Clostridium perfringens	< 10	MUC.PFRF
Salmonella	absent in 25 g	MUC.SAL
PHYTOESTROGENS		
Genistein	148 mg/kg	HPLC-DAD 25.0 mg/kg
Daidzein	22.30 mg/kg	HPLC-DAD 25.0 mg/kg

Value	Method of analysis	D.L.
absent	MUC.INIB.	-
MYCOTOXINES		
Total Aflatoxines (B1, B2 + G1, G2)	ND µg/kg	MUC.AFLA2 5 µg/kg
HEAVY METALS AND MINERALS		
Lead (Pb)	0.77 mg/kg	EPA - 7420 0.05 mg/kg
Cadmium (Cd)	0.059 mg/kg	EPA - 7130 0.05 mg/kg
Selenium (Se)	ND mg/kg	EPA - 7740 0.05 mg/kg
Arsenic (As)	ND mg/kg	EPA - 7600 A 0.05 mg/kg
Mercury (Hg)	ND mg/kg	EPA - 7471 0.05 mg/kg
OTHERS		
Nitrite (NaNO ₂)	2.02 mg/kg	Colorimetric method 0.5 mg/kg
Nitrate (NaNO ₃)	23.66 mg/kg	Ionic chromatography 5 mg/kg
Fluoride (F)	ND mg/kg	Potentiometry 0.25 mg/kg
Nitrosodimethylamine	ND µg/kg	GC-MS 1 µg/kg
Nitrosodimethylamine	ND µg/kg	GC-MS 1 µg/kg

ND = not detectable D.L. = detection limit
Q.L. = quantification limit

Comply with PF1610A
The Quality Control
Dr Federico CARACCIOLO

Approved
The Technical Manager
Dr Elisabetta MUCCIOLO
MUCEDOLA S.p.A. - ALBI
N. 576
ALBO

The original certificates of analysis and the samples are kept in our archives
Reg. Imp. Univas 0033770106 - REA n° 1288866 - P. IVA 02038770106 - Coop. Soc. n° 76320601 +
Aut. M.I.C. n° M3 8308A 252 del 03/07/93 - Aut. Min. San. M31A del 25/07/99
Riconoscimento Regione Lombardia n° 1500010A - n° 0200020A - n° 0700030A - n° 0700040A

fortified (autoclavable / γ-irradiated)
Complete feed for rats & mice

Description

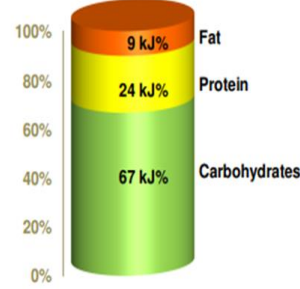
This diet has been designed rats and mice and is suitable for long term experiments (e.g. chronic toxicity studies), because of the moderate energy density and the very low nitrosamine contents. The diet is vitamin and amino acid fortified to compensate for the nutrient losses during the sterilization process.

The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water



Gross Energy (GE) 16.2 MJ/kg
Metabolizable Energy (ME) 13.5 MJ/kg

¹⁾ = Physiological fuel value (Atwater); correspond to 3,230 kcal/kg
ME - pig = 12.7 MJ/kg (old: 12.8 MJ/kg)

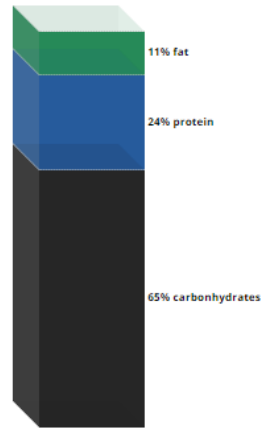


Minerals	[%]	Amino acids	[%]
Calcium	1.00	Lysine	1.10
Phosphorus	0.70	Methionine	0.38
Ca / P	1.43 : 1	Cystine	0.35
Sodium	0.24	Met+Cys	0.73
Magnesium	0.22	Threonine	0.72
Potassium	0.92	Tryptophan	0.25
		Arginine	1.19
		Histidine	0.49
Fatty acids	[%]	Valine	0.92
C 12:0	—	Isoleucine	0.79
C 14:0	0.01	Leucine	1.39
C 16:0	0.45	Phenylalanine	0.89
C 18:0	0.09	Phe+Tyr	1.50
C 20:0	0.01	Glycine	0.89
C 16:1	0.01	Glutamic acid	4.22
C 18:1	0.62	Aspartic acid	1.84
C 18:2	1.76	Proline	1.31
C 18:3	0.23	Serine	1.01
		Alanine	0.87

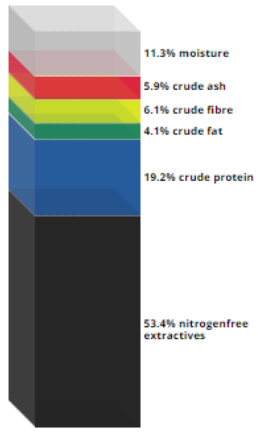
Crude Nutrients	[%]
Crude protein (N x 6.25)	19.0
Crude fat	3.3
Crude fibre	4.9
NDF	17.2
ADF	7.1
Crude ash	6.4
Starch	35.2
Sugar	5.3
N free extracts	54.2

Altromin: Входные ингредиенты синтетические

Metabolized energy ~ 3,227 kcal/kg



crude nutrients and moisture



Mucedola, SSNIFF: Входные ингредиенты Натуральные

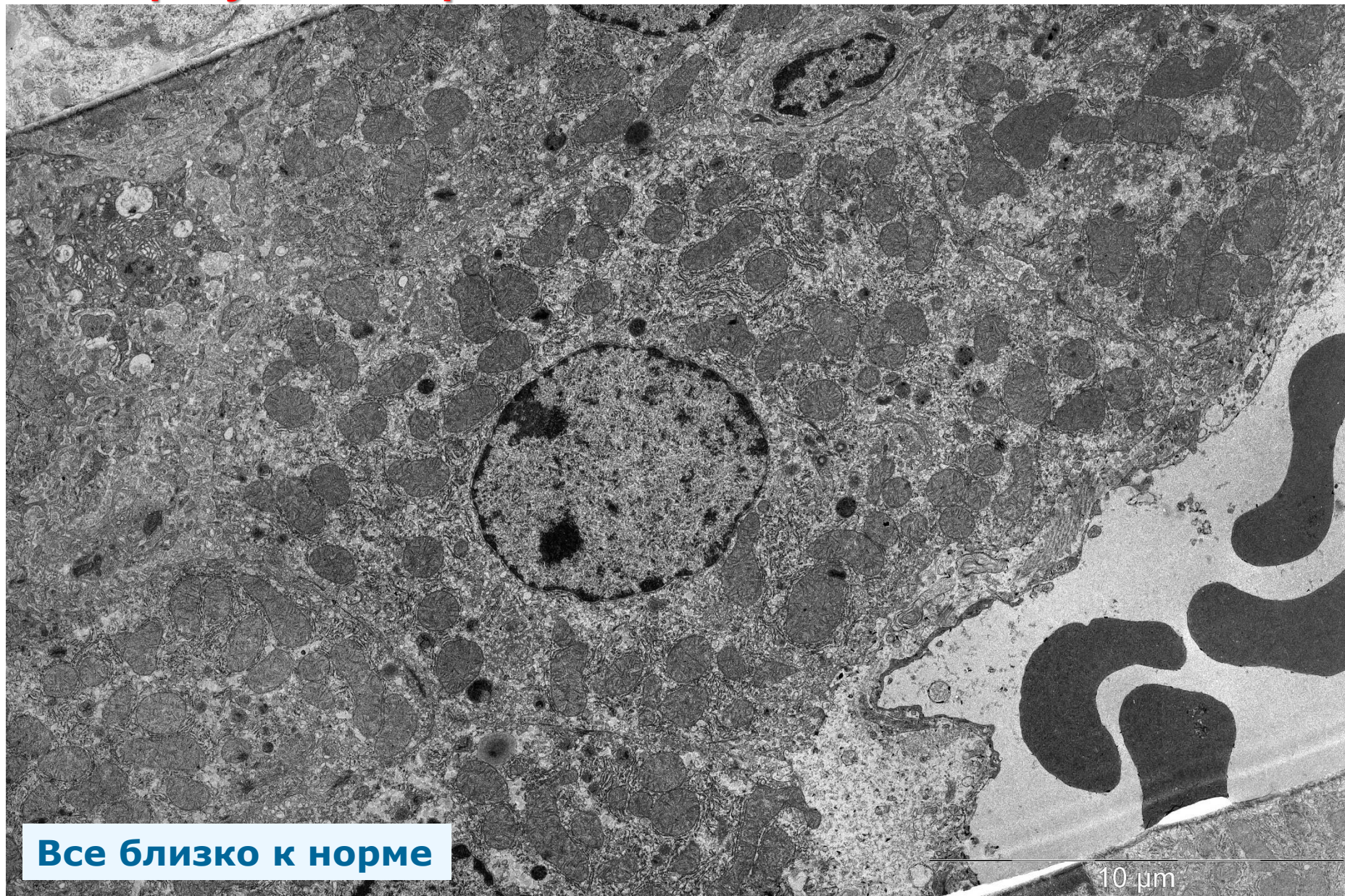
Dietary composition
Wheat and wheat products, soybean products, barley, minerals, oat hulls, sugar beet pulp, vitamins & trace elements, L-lysine HCl, DL-methionine.

Состав натурального корма Приказ № 163 МЗ СССР

Группа животных	Вес животного	Наименование кормов													
		зер- новая смесь	хлеб- пшени- ный из муки	кру- па овся- ная	бли- нная мука	мо- ло- ко	соч- ные кор- ма	се- но лу- го- вое	зе- лень	рыб- ная мука	дрож- жи кор- мовые	рыбий жир (ви- тами- низи- ро- ван.)	кост- ная мука	соль по- ва- рен- ная	
Взрослое		11	1,8	3	0,2	10	3	2	4	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	
производ- ственное поголовье															

- Состав зерновой смеси: овес - 70 проц., просо - 10 проц., пшеница - 10 проц., подсолнечник - 10 проц. (для линейных мышей: овес - 50 проц., просо - 10 проц., пшеница - 20 проц., подсолнечник - 20 проц.).
- Пшеница дается в проращенном виде.
- Для выращивания зелени используется семенное зерно из расчета: 1 г зерна для получения 5 г зелени вместе с промытыми корнями. Семенное зерно выделяется дополнительно к зерновой смеси.
- Молоко заменено равноценным по питательности количеством творога.
- Из сочных кормов – красная морковь (преимущественно).

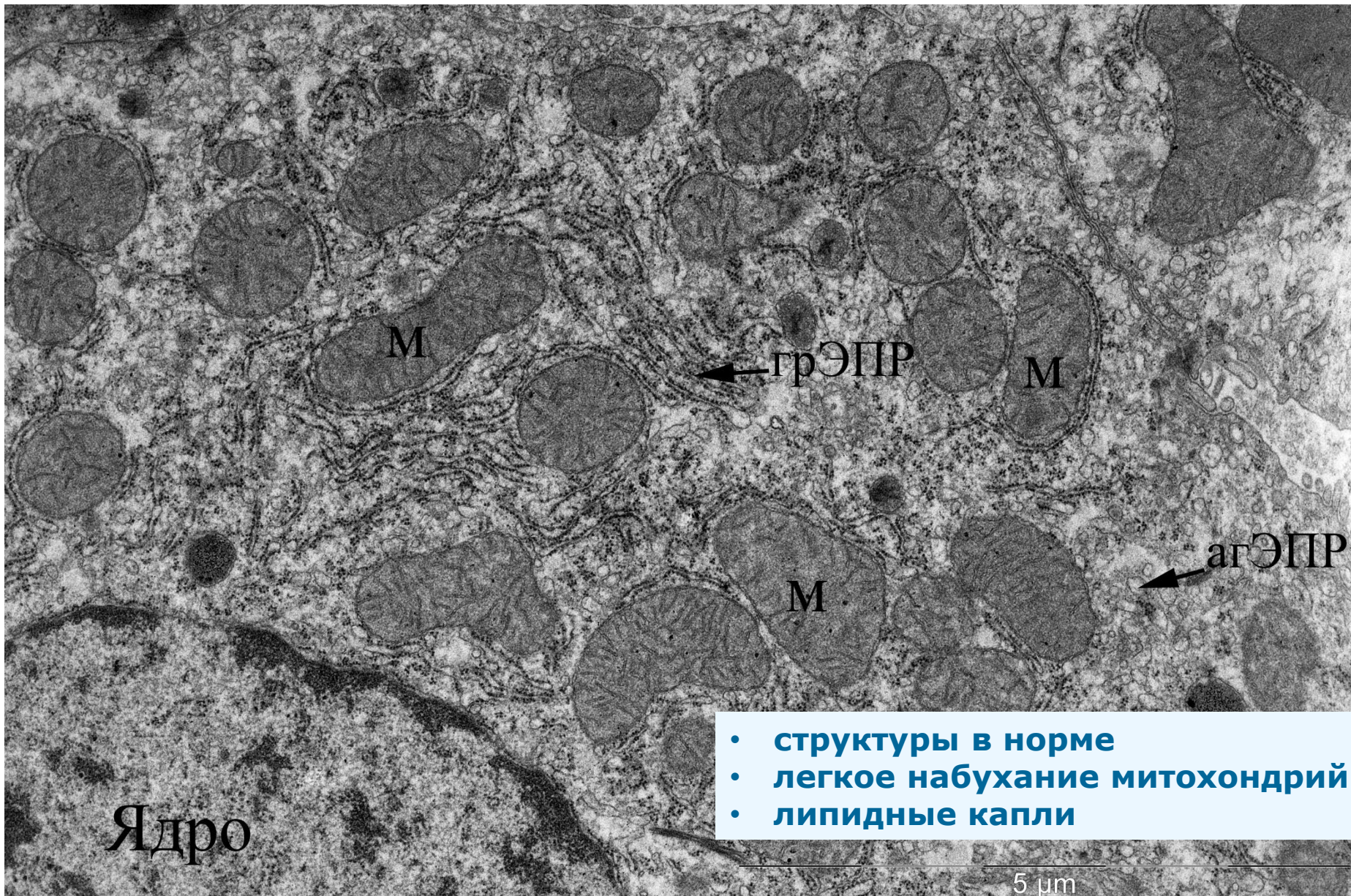
**Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 1 месяца,
животные SPF статуса,
сразу после привоза из питомника Charles River**



Все близко к норме

10 μ m

Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 1 месяца, животные SPF статуса, питомник Charles River (большее увеличение)



- структуры в норме
- легкое набухание митохондрий
- липидные капли

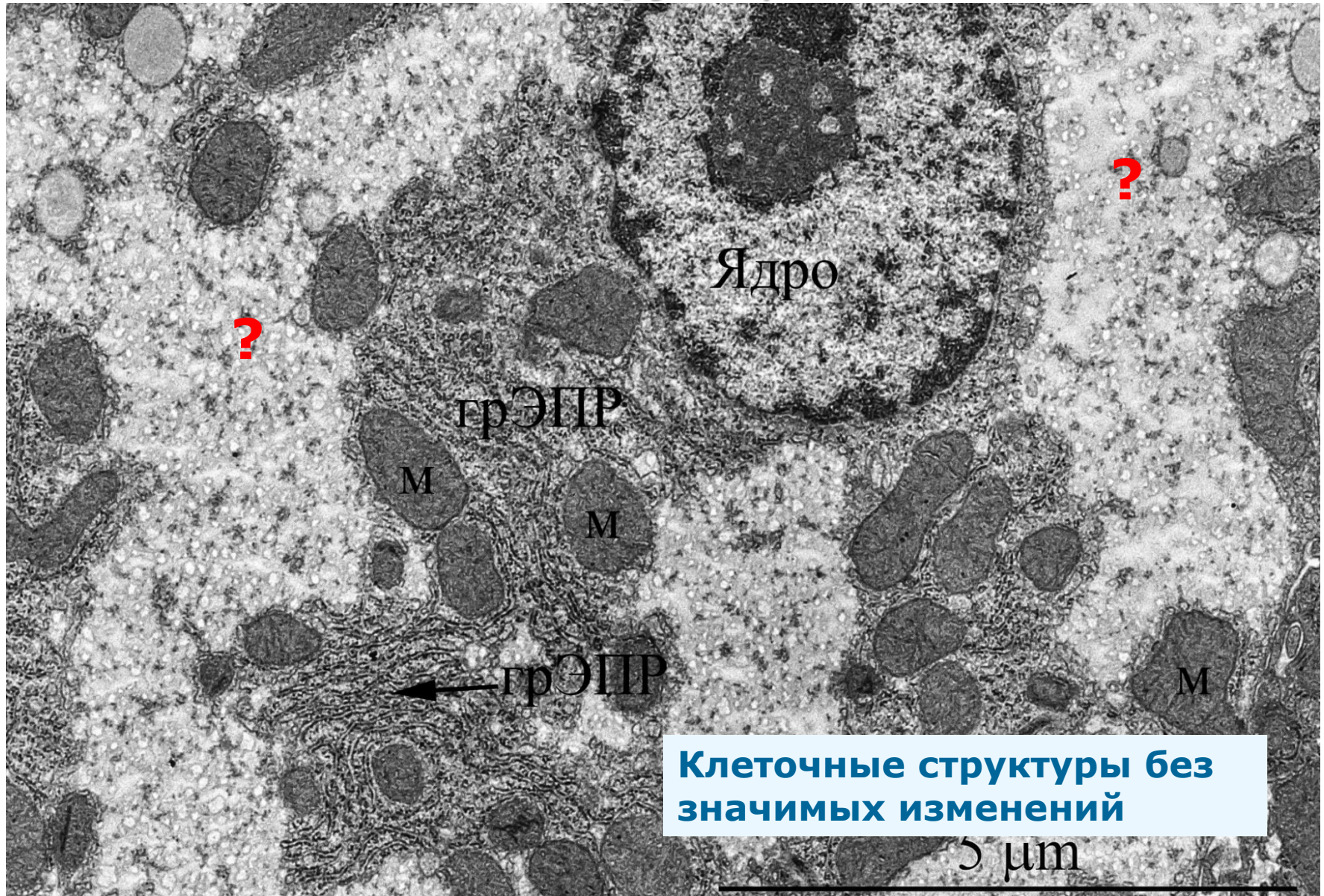
Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 3 месяцев, животные SPF статуса (ИБК), корм «Чара»



Клеточные структуры без значимых изменений

10 μ m

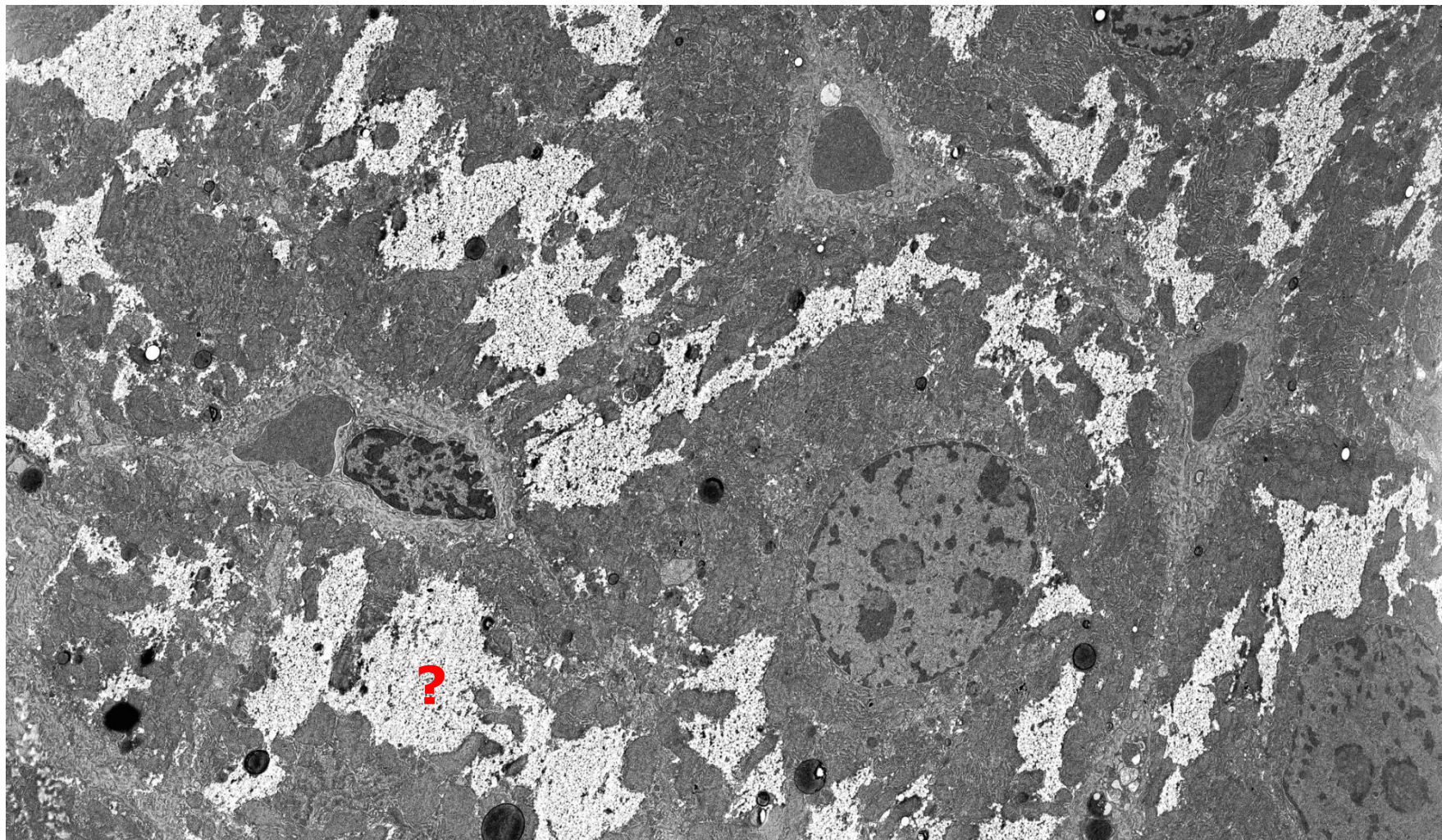
Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 3 месяцев, животные SPF статуса (ИВК), корм «Чара» (то же, более крупно)



Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 1 месяца, животные SPF статуса, ИЦ ВЭК, корм **Тосненского** завода «ЛБК -120_106104»



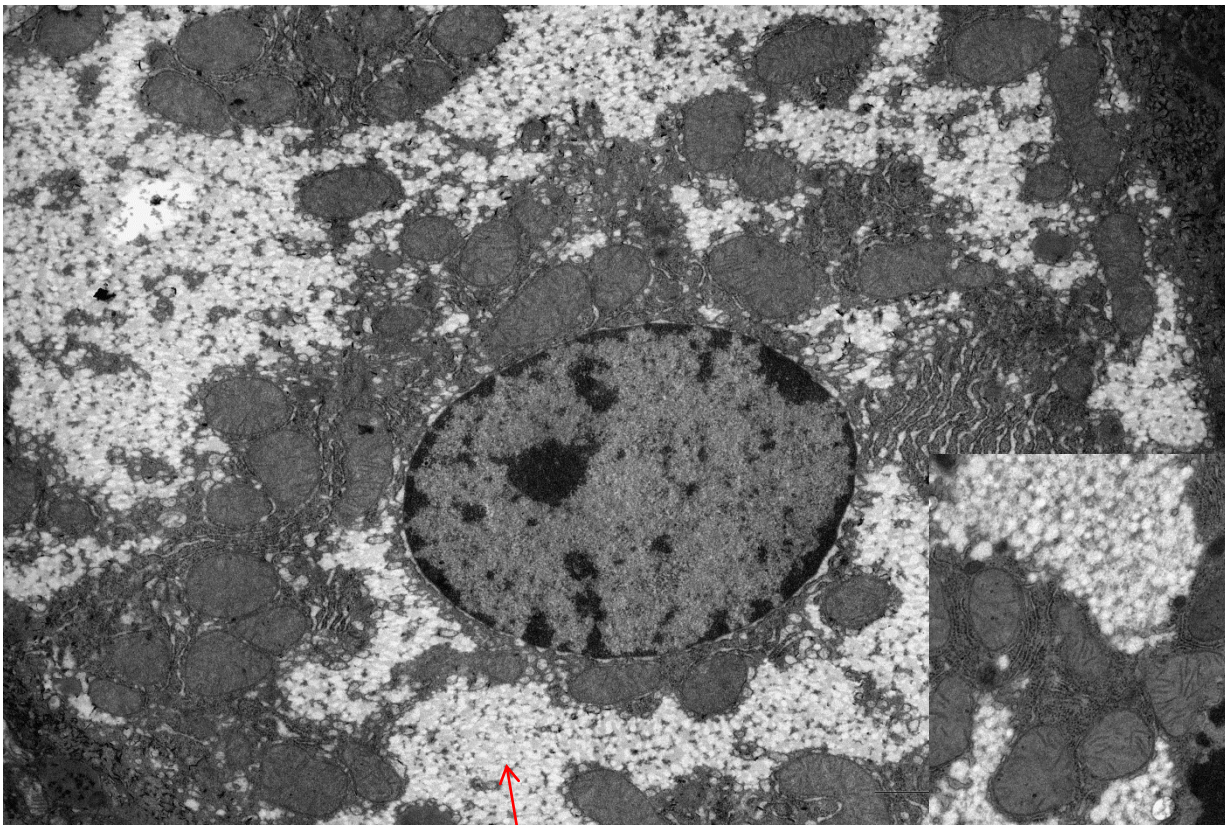
Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 3 месяцев,
1 месяц - SPF статус, питомник Charles River (корм **Altromin**),
Далее, 2 месяца корм «**Тосненского** завода «ЛБК -120_106104»



Значит ли, что аморфные зоны дают не очень стандартные корма?

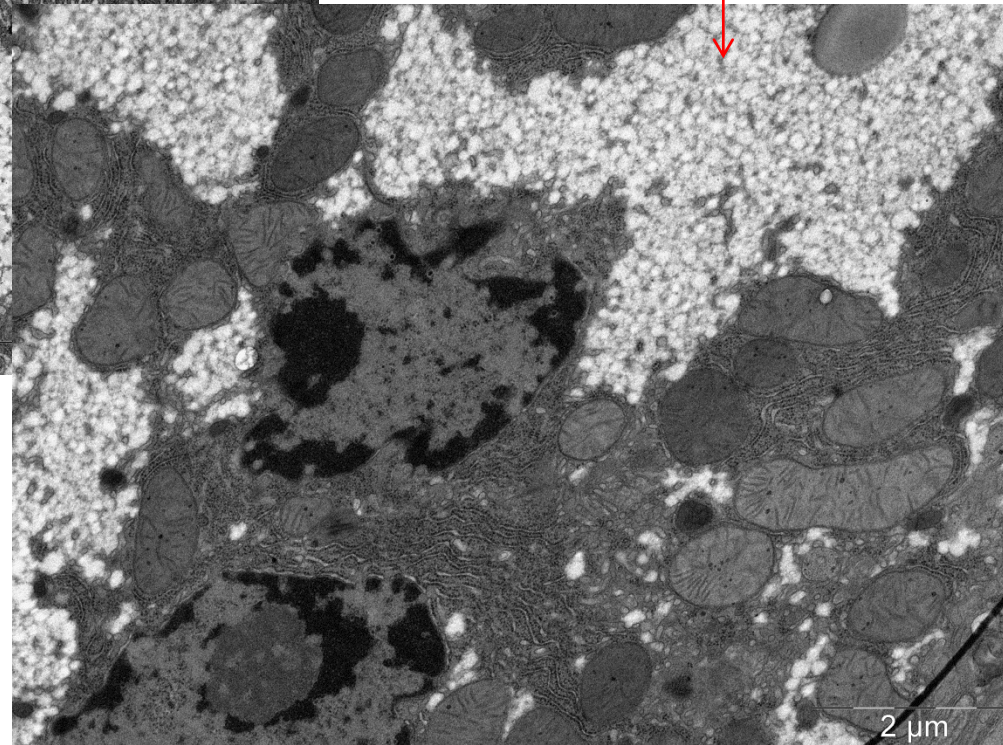
20 μm

Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 2 месяцев, SPF статус, собственное разведение, стандартные корма с рождения



корм **Mucedola** с рождения

корм **Altromin** с рождения



Корм принципиально картину не меняет

**Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 2 месяцев,
SPF статус, собственное разведение, корм SSNIF с рождения**

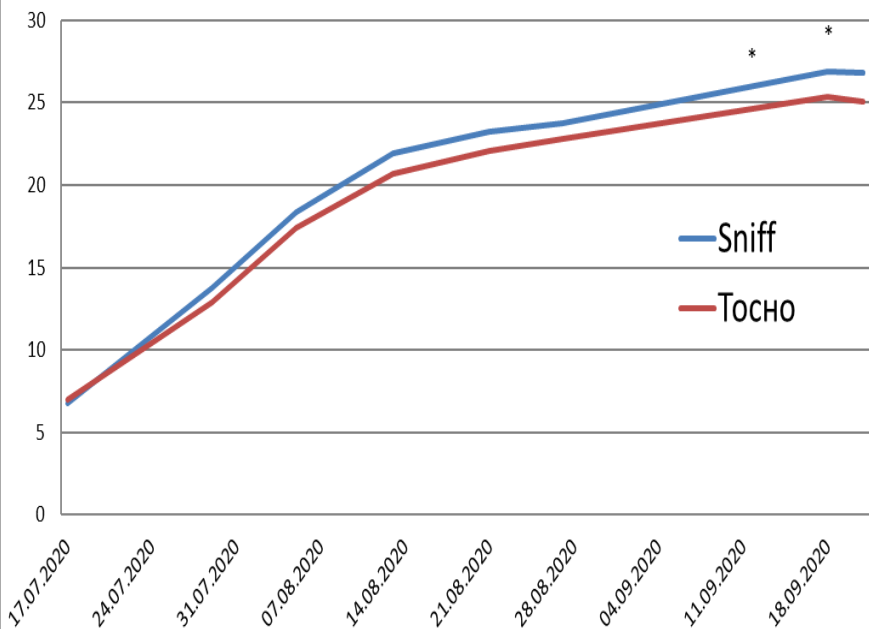


Может быть, различия есть только в микроструктурах?

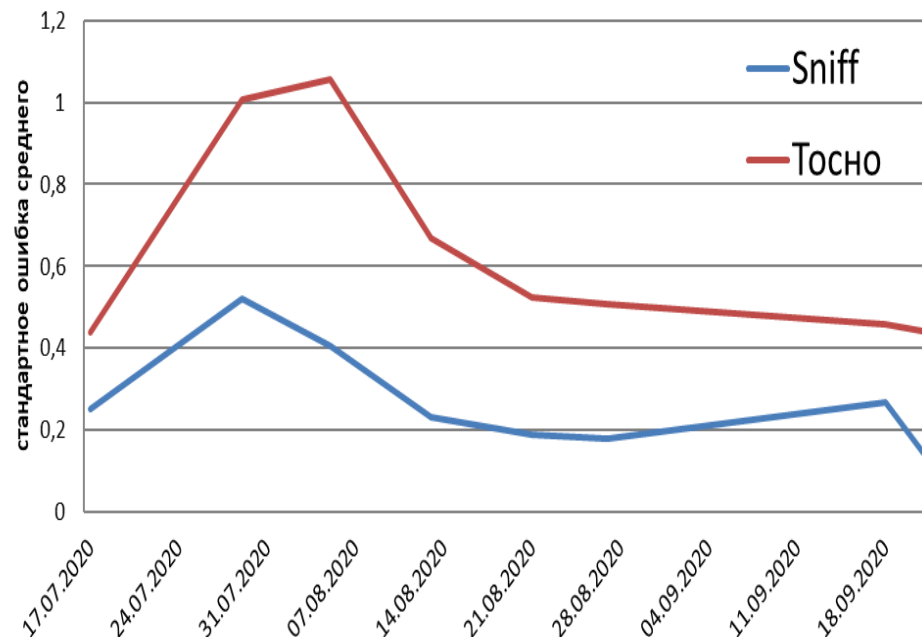
20 μ m

Набор веса, мышцы в возрасте 2 месяцев, SPF статус, собственное разведение (гибриды F1 C57Dl6/BALBc), корм SSNIFF или «Тосно» с рождения

Динамика массы тела, г



Разброс массы тела (COШ)



**Замедление набора веса,
Большой разброс**

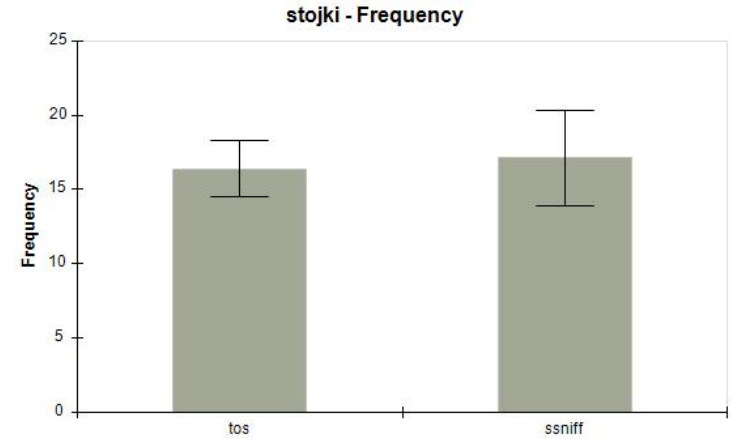
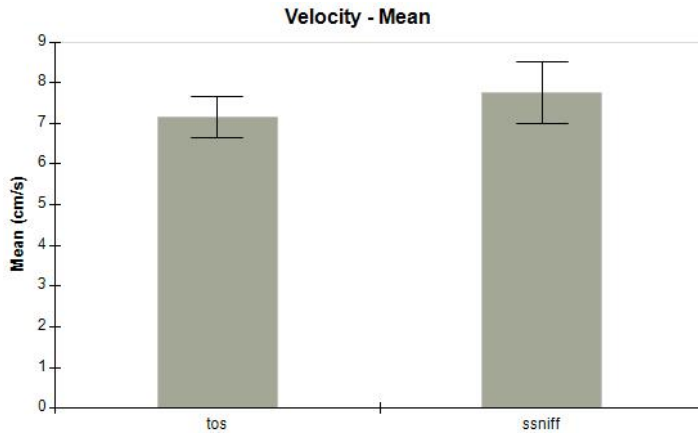
*

p < 0,05 по Манну-Уитни

Активность в тесте «Открытое поле», мыши в возрасте 1,5 месяцев, SPF статус, собственное разведение, корм **SSNIFF/ «Тосно» с рождения**

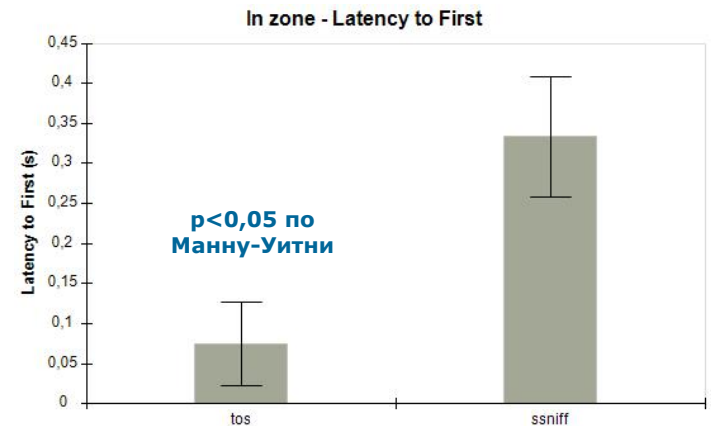
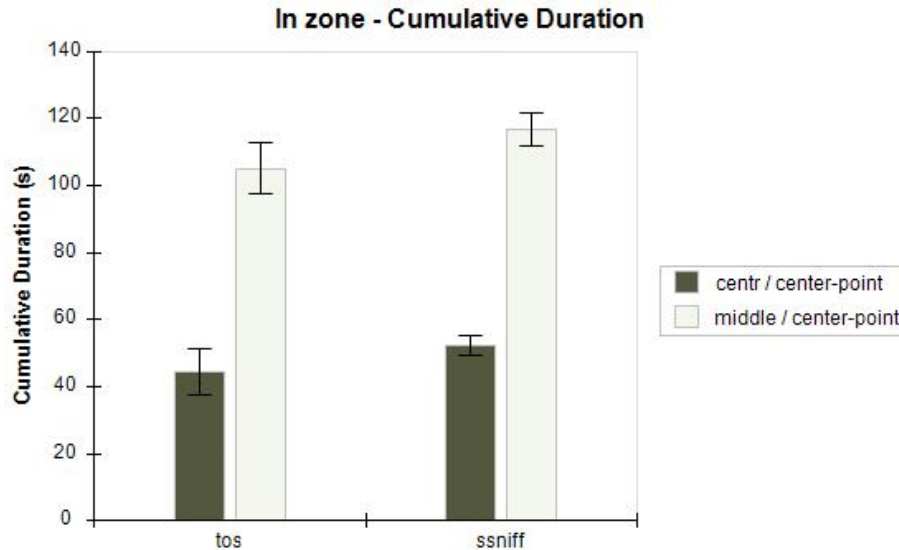
Скорость

Стойки



Время в центре

Латентный период
ухода из центра поля
(тревожность)



Ферменты печени

CLINICAL CHEMISTRY REFERENCE RANGES FOR ADULT MICE²⁹

Analyte	Units	CD-1		C57BL/6		BALB/cBy	
		M	F	M	F	M	F
Serum							
Glucose	mg/dl	112 ± 38.1	97 ± 39.9	121.7 ± 33.2	134.4 ± 20.3	171.6 ± 57.2	174.9 ± 31.0
Urea nitrogen	mg/dl	38 ± 20.1	37 ± 16	32.7 ± 3.5	23.6 ± 5.3		
Creatinine	mEq/l	1.10 ± 1.45		0.50 ± 0.08	0.84 ± 0.298	0.43 ± 0.14	0.45 ± 0.07
Sodium	mEq/l	166 ± 8.6	166 ± 4.1	166.7 ± 8.9	160.8 ± 4.40	157.8 ± 5.7	157 ± 6.70
Potassium	mEq/l	8.0 ± 0.85	7.8 ± 0.75				
Chloride	mg/dl	125 ± 7.2	130 ± 3.9				
Calcium	mg/dl	8.90 ± 2.06	10.30 ± 1.58			8.10 ± 0.80	
Phosphorus	mg/dl	8.30 ± 1.46	8.00 ± 1.85			5.95 ± 0.63	
Magnesium	mg/dl	3.11 ± 0.37	1.38 ± 0.28				
Iron	µg/dl	474 ± 44	473 ± 16				
Alanine aminotransferase	IU/l	99 ± 86.3	49 ± 22.6	41.4 ± 16.4	29.3 ± 7.1		
Aspartate aminotransferase	IU/l	196 ± 132.6	128 ± 60.6	99.5 ± 33.4	73.6 ± 15.3		
Alkaline phosphatase	IU/l	39 ± 25.7	51 ± 27.3	59 ± 11.4	118 ± 15.9		
Lactate dehydrogenase	IU/l					378 ± 269	
Protein, total	g/l	44 ± 11.0	48 ± 8.5	53.9 ± 7.5	63.5 ± 8.8	55.7 ± 8.9	54.6 ± 8.3
Albumin	g/l			36.7 ± 5.2	46.4 ± 7.0	31.7 ± 4.7	39.3 ± 5.4
Cholesterol	mg/dl	114 ± 56.3	72 ± 20.1	94.8 ± 16.9	92 ± 15.9	150.4 ± 29.9	118.2 ± 36.1
Triglycerides	mg/dl	91 ± 58.5	53 ± 23.6	97 ± 21.1	78 ± 12.2		
Bilirubin	mg/dl	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.35			0.7 ± 0.15	

**Мыши C57 Bl/6, SPF, корм Altromin
контроль, возраст 4 недели (наши данные)**

В норме:

**Холестерол,
триглицериды**

Повышено:

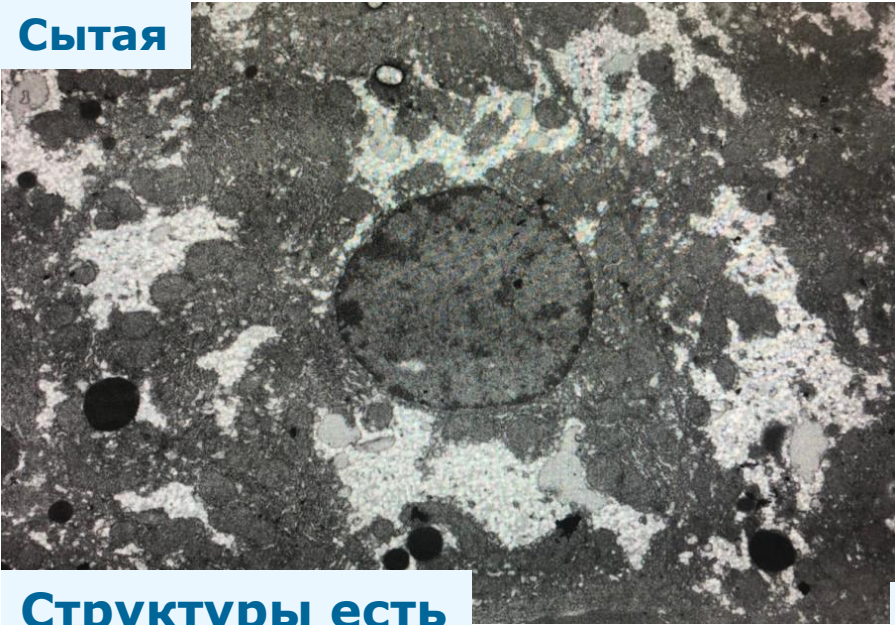
Средн

COШ

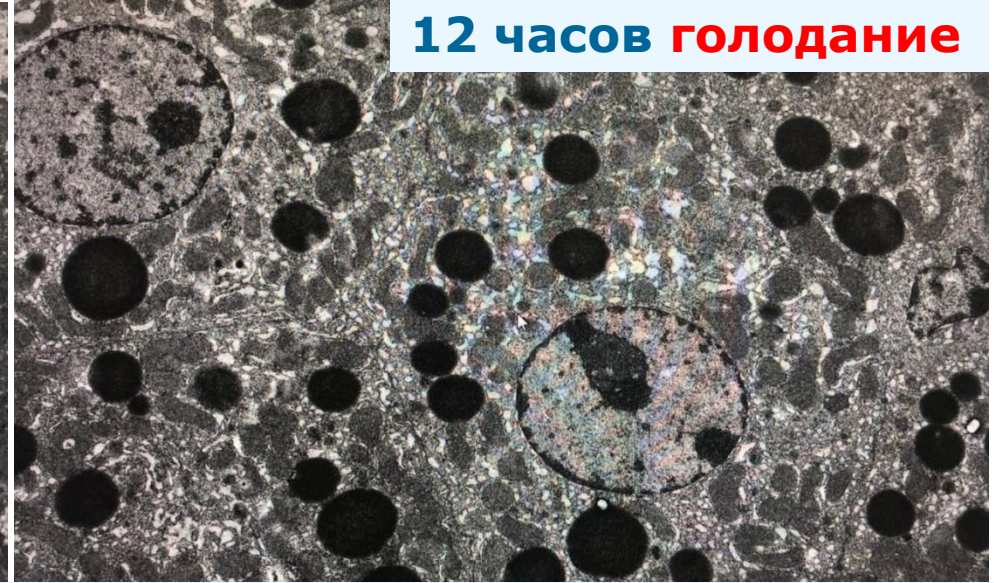
Glucose	M mg/dL	151,3	12,21
Glucose	F mg/dL	169,3	11,25
ALT, U/L	M	74,34	23,50
ALT, U/L	F	52,6	16,65
AST U/L	M	256	80,95
AST U/L	F	204,4	64,66

Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 3 месяцев, собственное разведение SPF статус, **Натуральный** корм

Сытая



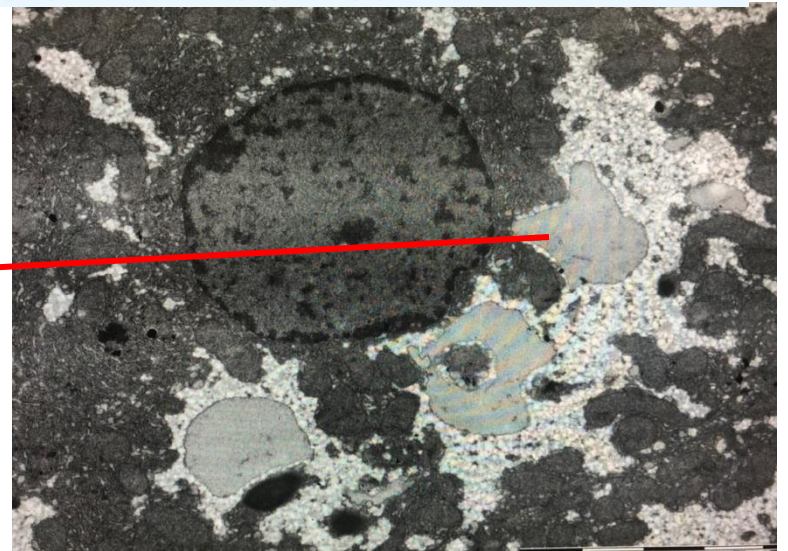
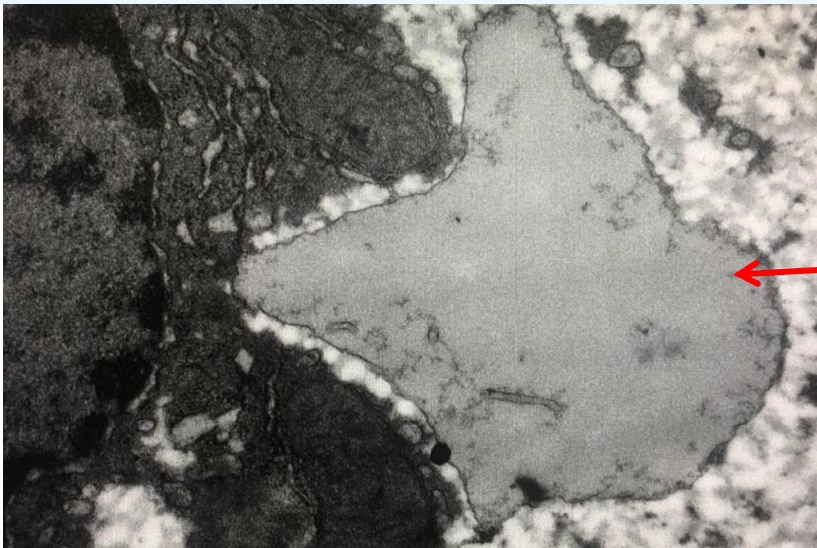
12 часов голодание



Структуры есть

Структур НЕТ. Есть жировые капли

Образование жировых капель из аморфных структур при голоде?



**Ультраструктура гепатоцитов мыши в возрасте 2 месяцев,
SPF статус, собственное разведение, корм *Mucedola* с рождения**

12 часов голодание

нет аморфных структур

Жировые капли,
набухание митохондрий



**Какова может быть природа аморфных образований?
Описаны ли они в литературе?**

10 μm

Данные литературы

Гепатостеатоз

Ультраструктура гепатоцитов крысы SD, конвенциональные, корм -? сытость -?

Fasting blood glucose
 Fasting insulin
 ALT
 AST
 Total cholesterol
 TG (mg/dl)
 HDL (mg/dl)
 LDL (mg/dl)
 LDL/HDL ratio mean

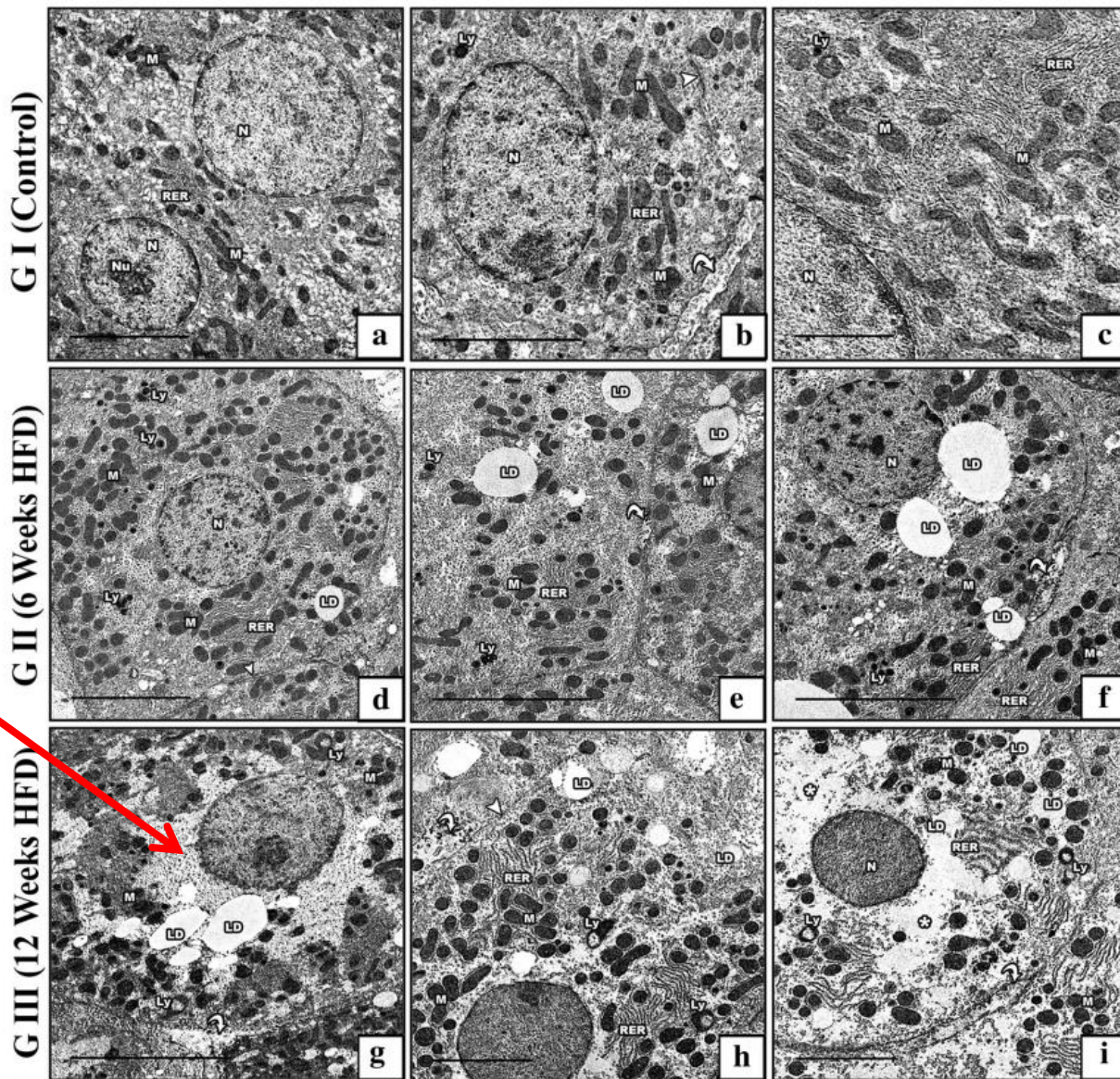
TNF- α gene expression
 CRP gene expression
 HNF4 α gene expression

Note that some areas of the cytoplasm are devoid of organelles (*).

Molecular and ultrastructure study of endoplasmic reticulum stress in hepatic steatosis: role of hepatocyte nuclear factor 4 α and inflammatory mediators

Salwa M. Abo El-khair1 · Fatma M. Ghoneim2
 · Dalia A. Shabaan2
 · Ayman Z. Elsamanouy1,3

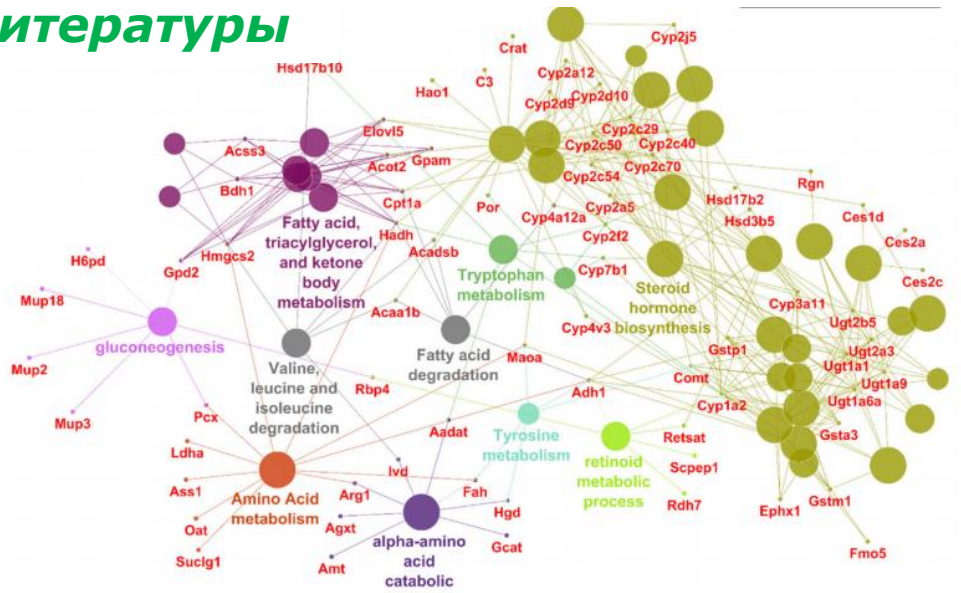
4 October 2019
 Histochemistry and Cell Biology
<https://doi.org/10.1007/s00418-019-01823-2>



Влияние глюкозы, фруктозы и жиров

Данные литературы

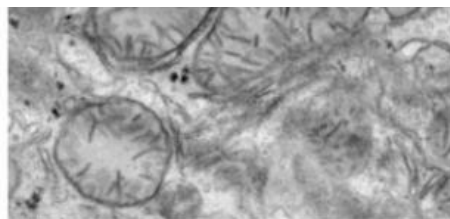
Мыши, корм Diet 9F (PharmaServ)



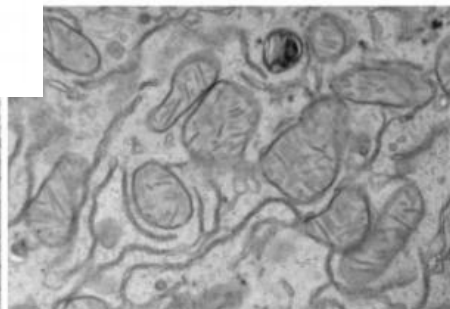
«Добавление в высокожировую диету фруктозы, но не глюкозы, уменьшает размер митохондрий, функции и ацетилирование белков, что приводит к снижению скорости окисления жирных кислот и развитию метаболической дисрегуляции.»

«Глюкоза и, особенно фруктоза провоцируют липогенез и оксидативный стресс»

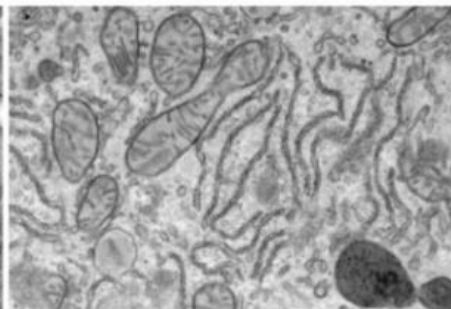
Cell Metab. 2019 October 01; 30(4): 735–753.e4. doi:10.1016/j.cmet.2019.09.003



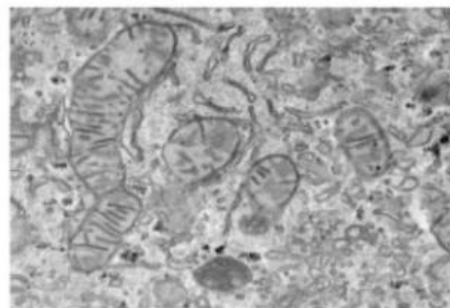
Chow



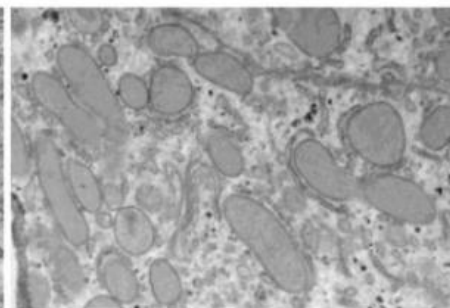
Chow+F



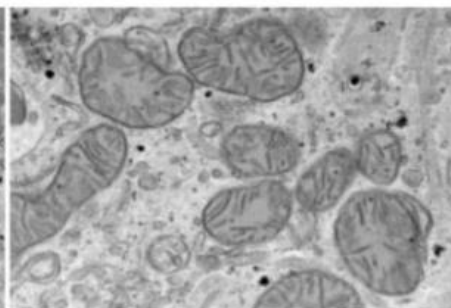
Chow+G



HFD



HFD+F

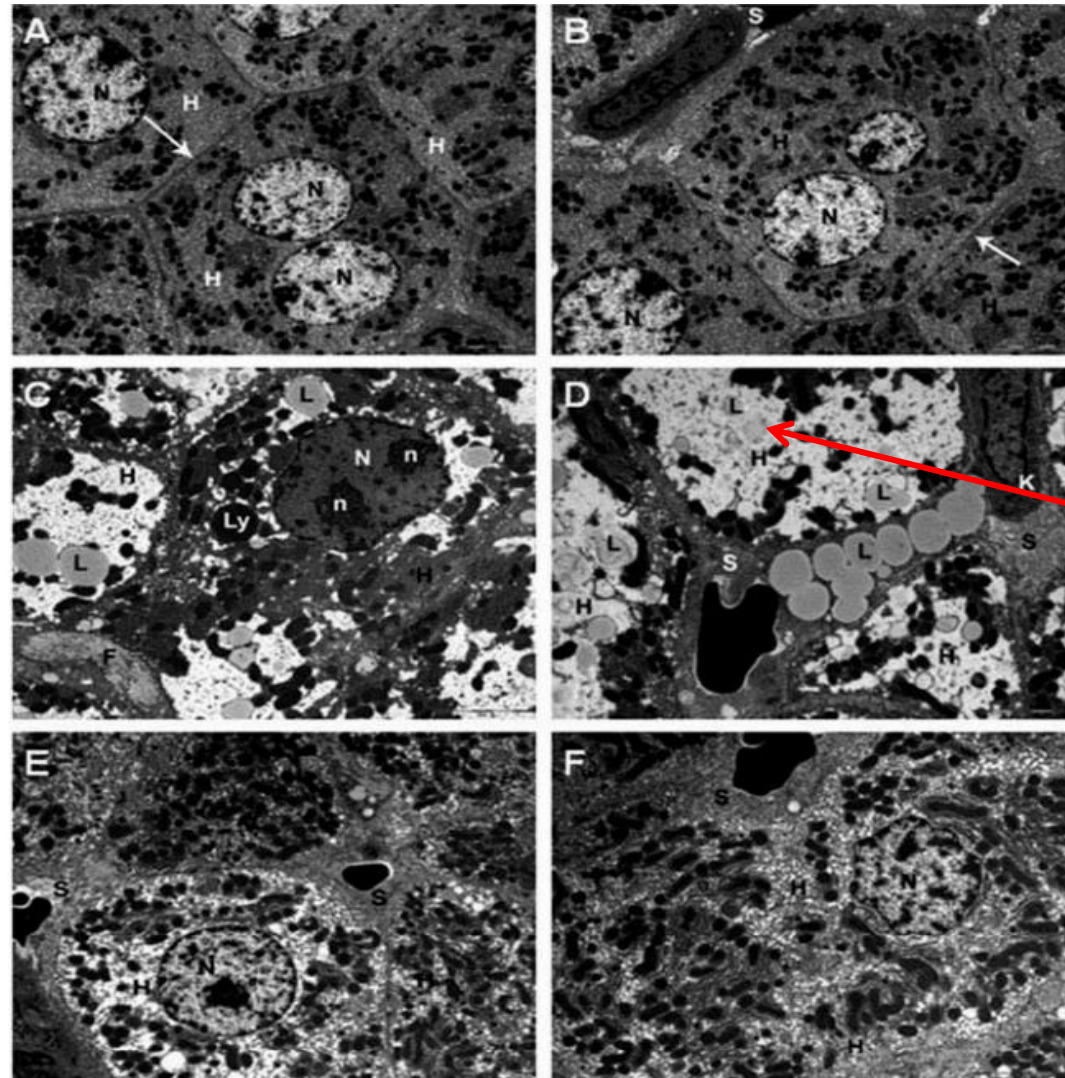


HFD+G

Диета с избытком сахара и жиров + плавание

Данные литературы

Swim exercise training ameliorates hepatocyte ultrastructural alterations in rats fed on a high fat and sugar diet Mohammed A. Dallak, (2018) Ultrastructural Pathology, DOI: 10.1080/01913123.2017.1422581



статус - ?,
корм -?
Сытость
перед
забоем -?

Аморфные
структуры
в
цитоплазме

Figure 2. Effects of swim exercise on the healing of hepatocytes ultrastructure in HCFD-induced steatosis and liver injury. TEM images (x5000) of harvested tissues obtained after 15 weeks from the liver in different groups of rats used in the study; Control group (A and B), HCFD fed group (C and D), and HCFD+exercise group (E and F). Note that arrows point to intercellular space between hepatocytes. Abbreviations: H, hepatocyte; N, nucleolus; L, lipid droplets; m, mitochondria; RER, rough endoplasmic reticulum; k, Kupffer cells; Ly, lysosome; S, blood sinusoid; n, nucleolus.



Спасибо за внимание

Таким образом:

- **состояние сытости играет существенную роль в распределении структур в клетках печени**
- **стандартные диеты могут быть избыточны по калорийности и оказывать провоспалительное действие**

2 μm