

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

МЕТАБОЛИЧЕСКИ АССОЦИИРОВАННАЯ ЖИРОВАЯ БОЛЕЗНЬ ПЕЧЕНИ И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2-ГО ТИПА У МЫШЕЙ *db/db*. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН В ПЕЧЕНИ, МИКРО- И УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Мичурина С.В.¹,
Колесников С.И.^{2,3},
Васендин Д.В.^{4,5},
Ищенко И.Ю.¹

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, Россия)

² ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (119991, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия)

⁴ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет геосистем и технологий» (630108, г. Новосибирск, ул. Плеханова, 10, Россия)

⁵ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет телекоммуникаций и информатики» (630102, г. Новосибирск, ул. Гурьевская, 86, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Мичурина Светлана Викторовна,
e-mail: michurinasv3000@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Ожирение, сахарный диабет (СД) и метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (МАЗБП) – одни из самых актуальных проблем современности. Показано, что мелатонин (МТ) эффективен в коррекции ряда метаболических нарушений, но данных о его влиянии на морфологические особенности липидного обмена при ожирении и СД 2-го типа (СД2) недостаточно.

Цель работы. Изучить микро- и ультраструктурные особенности липидного обмена в печени мышей *db/db* с ожирением и сахарным диабетом 2-го типа и оценить влияние на них введения мелатонина.

Методы. Самкам мышей *db/db* с 8-недельного возраста интрагастрально в течение 56 суток вводили раствор МТ (1 мг/кг в 200 мкл воды). Группами сравнения были интактные (контроль) и плацебо-животные, которым вводили 200 мкл dH_2O по вышеуказанной схеме. Проводили светооптическое и электронно-микроскопическое исследование образцов печени.

Результаты. У контрольных и плацебо *db/db* мышей гепатоциты характеризовались вакуолярной дистрофией и абберантным накоплением мелких липидных включений, иногда с наличием гигантских липидных капель (ЛК). Также выявлены: стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР); уплотнение матрикса митохондрий с хаотично расположенными кристами либо разрушение их ультраструктуры; митофагосомы; комплексы митохондрий с ЛК; массовый экзоцитоз ЛК в межгепатоцитарные щели и пространства Диссе с застоем межклеточной жидкости.

Введение МТ приводило к снижению относительного числа гепатоцитов с ЛК, уменьшению доли клеток с мелкокапельными включениями и увеличению процента гепатоцитов со средними и крупными, но не гигантскими ЛК. Нормализовалась ультраструктура митохондрий, нарастали комплексы митохондрий с большими компартментами гранулярной ЭПР. Экзоцитоз ЛК в межгепатоцитарные щели не выявлялся.

Заключение. Мелатонин может рассматриваться как перспективное средство в комплексной терапии МАЗБП при ожирении и СД2.

Ключевые слова: мыши *db/db*, сахарный диабет 2-го типа, мелатонин, ультраструктура, метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (МАЗБП)

Для цитирования: Мичурина С.В., Колесников С.И., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю. Метаболически ассоциированная жировая болезнь печени и сахарный диабет 2-го типа у мышей *db/db*. Влияние мелатонина на липидный обмен в печени, микро- и ультраструктурная характеристика. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(1): 238-247. doi: 10.29413/ABS.2025-10.1.25

Статья поступила: 21.08.2024

Статья принята: 20.01.2025

Статья опубликована: 13.03.2025

GENETICALLY DETERMINED FATTY LIVER DISEASE AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN *DB/DB* MICE. THE EFFECT OF MELATONIN ON LIPID METABOLISM IN THE LIVER, MICRO- AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS

Michurina S.V.¹,
Kolesnikov S.I.^{2,3},
Vasendin D.V.^{4,5},
Ishchenko I.Yu.¹

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (Timakova str. 2, Novosibirsk 630060, Russian Federation)

² Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

³ Lomonosov Moscow State University (Leninskie Gory 1, Moscow 119991, Russian Federation)

⁴ Siberian State University of Geosystems and Technologies (Plakhotnogo str. 10, Novosibirsk 630108, Russian Federation)

⁵ Siberian State University of Telecommunications and Informatics (Guryevskaya str. 86, Novosibirsk 630102, Russian Federation)

Corresponding author:
Svetlana V. Michurina,
e-mail: michurinasv3000@gmail.com

ABSTRACT

Background. Obesity, diabetes mellitus and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease are some of the most pressing issues of our time. Melatonin has been shown to be effective in correcting a number of metabolic disorders, but there is insufficient data on its effect on morphological features of lipid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus.

The aim. To study micro- and ultrastructural features of lipid metabolism in the liver of *db/db* mice with obesity and type 2 diabetes mellitus and to evaluate the effects of melatonin treatment on them.

Methods. Female *db/db* mice from 8 weeks of age were administered melatonin solution intragastrically (1 mg/kg in 200 µl of water) for 56 days. The comparison groups were intact (control) and placebo animals, which were injected with 200 µl of dH_2O according to the above scheme. Light-optical and electron microscopic examinations of liver samples were performed.

Results. In control and placebo *db/db* mice, hepatocytes were characterized by vacuolar dystrophy and aberrant accumulation of small lipid inclusions, sometimes with the presence of giant lipid droplets (LDs). Also we revealed: endoplasmic reticulum stress; densification of the mitochondrial matrix with chaotically arranged cristae, or destruction of their ultrastructure; mitophagosomes; complexes of mitochondria with LDs; mass exocytosis of LDs into the interhepatocyte slits and Dysse spaces with stagnation of intercellular fluid. Treatment with melatonin resulted in a decrease in the relative number of hepatocytes with LDs, a decrease in the percentage of cells with small-droplet inclusions, and an increase in the percentage of hepatocytes with medium and large, but not giant LDs. The mitochondria ultrastructure improved, and the formation of complexes from mitochondria with large compartments of granular endoplasmic reticulum increased. Exocytosis of LDs into the interhepatocytic slits was not detected.

Conclusion. Melatonin can be considered as a promising agent in complex therapy of metabolic associated fatty liver disease in obesity and type 2 diabetes mellitus.

Key words: *db/db* mice, type 2 diabetes mellitus, melatonin, ultrastructure, metabolic associated fatty liver disease, (MAFLD)

Received: 21.08.2024
Accepted: 20.01.2025
Published: 13.03.2025

For citation: Michurina S.V., Kolesnikov S.I., Vasendin D.V., Ishchenko I.Yu. Genetically determined fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus in *db/db* mice. The effect of melatonin on lipid metabolism in the liver, micro- and ultrastructural characteristics. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(1): 238-247. doi: 10.29413/ABS.2025-10.1.25

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что нарушение циркадных ритмов, гиподинамия, неправильное питание и хронические инфекционные заболевания приводят к развитию метаболического синдрома, который является одной из актуальных проблем современной медицинской науки в связи с высокой распространённостью и ранней инвалидизацией этой категории пациентов. Метаболический синдром образован кластером различных синергических патологий (абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия, инсулинорезистентность, дислипидемия), которые взаимосвязаны, несмотря на то, что могут различаться по этиологии, развитию, проявлениям и механизмам [1, 2].

Начало проявления ожирения, сахарного диабета 2-го типа (СД2) и метаболического синдрома как сочетания вышеперечисленных патологий характеризуется преждевременной прогрессирующей цитоатрофией и органоинволюцией, вызванными нарушением регуляции клеточных глюко- и липометаболических каскадов. Последующая системная интерстициальная и внутриклеточная гиперлипидемия приводит к нарушению нормальной цитоинтеграции и метаболической чувствительности к установленной гиперкалорической перичеселлюлярной среде [3]. Печень является ключевым органом, контролирующим энергетический баланс, а нарушения функции печени имеют серьёзные последствия для гомеостаза глюкозы и липидов, гемодинамики и иммунных процессов. Дисбаланс липидного обмена в печени приводит к аномальному отложению триглицеридов в гепатоцитах и, как следствие, к развитию метаболически ассоциированной с ними жировой болезни печени (МЖБП) [4, 5].

Согласно последним научным данным, многие патологические состояния, включая ожирение, СД2 или метаболический синдром в целом развиваются на фоне нарушения/снижения продукции мелатонина (МТ) и его концентрации в крови пациентов, что играет важную роль в регуляции гомеостаза глюкозы [6]. МТ не только реализует важные для организма функции антиоксиданта и хронобиотика, но и оказывает влияние на углеводный обмен, секрецию инсулина, лептина и адипонектина, пролиферацию адипоцитов и пищевое поведение. Гипомелатонинемия совместно с вызываемыми ею депривацией сна, нарушением пищевого поведения, углеводного и жирового обмена, в настоящее время считается одной из причин «неинфекционной эпидемии XXI века» – экзогенно-конституционального ожирения [7, 8]. Ожирение вызывает серьёзные метаболические нарушения в организме и предрасполагает к развитию тяжёлых заболеваний, таких как артериальная гипертензия, атеросклероз, СД2 и МЖБП [9], которые в значительной степени ассоциированы с дислипидемией [10]. Четырьмя основными механизмами, ответственными за регуляцию метаболизма липидов в печени, являются поглощение жирных кислот, липогенез *de novo*, липолиз и окисление жирных кислот [11, 12]. Однако влияние мелатонина на морфологические особенности липидного обмена в печени *db/db* мышей исследованы недостаточно.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить микро- и ультраструктурные особенности липидного обмена в печени мышей линии BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J (*db/db*) с метаболически ассоциированной жировой болезнью печени и сахарным диабетом 2-го типа и оценить влияние на них введения мелатонина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на самках селекционной модели животных: мыши *db/db* (BKS.Cg-Dock7^m+/+Lepr^{db}/J) с генетически детерминированным развитием ожирения и СД2. Гомозиготные животные данной линии имеют дефект рецептора лептина (*Lepr db*) и характеризуются полифагией, прогрессирующим ожирением с 3–4-й недели жизни, выраженной гипергликемией с 4–8-й недели жизни, развитием органных поражений после 8–10-й недели. Животных содержали в контролируемых барьерных помещениях ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных животных» ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI62119X0023), предоставляли им свободный доступ к еде (сбалансированный гранулированный корм SSNIFF, Германия) и воде. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза о защите животных, используемых в научных целях, и с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики. Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (протокол № 128 от 15.03.2017).

Мелатонин (MP Biomedicals, США) вводили мышам с 8-й по 16-ю неделю интрагастрально через зонд (1 мг/кг в 200 мкл dH₂O в течение 56 суток; *n* = 7). Группами сравнения были интактные особи в возрасте 16 недель (контроль; *n* = 5) и *db/db* мыши плацебо (200 мкл dH₂O по вышеуказанной схеме; *n* = 5).

Животных выводили из эксперимента методом краниоцервикальной дислокации, забирали образцы печени для электронно-микроскопического исследования, фиксировали их в 4%-м параформальдегиде на 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) с последующей дофиксацией в 1%-м OsO₄ (Sigma Aldrich, США), обезжировали и заключали в эпон-812 (Serva, Германия). Полутонкие срезы, окрашенные толуидиновым синим (Sigma Aldrich, США), использовали для подсчёта доли гепатоцитов (%), содержащих липидные включения, а среди них высчитывали % клеток с мелкими (*d* ≤ 2 мкм), средними (2 ≤ *d* ≤ 6 мкм) и крупными (*d* > 6 мкм) липидными каплями (ЛК). Было исследовано более 100 полей зрения в каждой группе: в контроле – 134 поля зрения, в плацебо – 173, в группе введения мелатонина – 225. Определяли значения медианы, первого и третьего квартилей, среднее арифметическое. Статистическую значимость различий сравни-

ваемых величин между группами вычисляли с помощью непараметрического теста Краскела – Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Срезы толщиной 35–45 нм контрастировали водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали под электронным микроскопом JEOL JEM-1400 (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Паренхиматозные клетки печени как интактных *db/db* мышей, так и животных плацебо характеризовались вакуолярной дистрофией и абберантным накоплением липидных включений (рис. 1а, б), что свидетельствовало о развитии у них МАЖБП. При этом доля гепатоцитов, содержащих ЛК, была повышена у мышей плацебо (табл. 1), что может быть объяснено стрессом, вызванным внутрижелудочным введением воды через зонд.

Среди липидосодержащих паренхиматозных клеток преобладали гепатоциты с мелкими ЛК (табл. 1; рис. 1а, б). Иногда в цитоплазме гепатоцитов встречались гигантские

ЛК, достигающие размеров клетки, формирующиеся в результате слияния мелких липидных включений (рис. 1а).

На ультраструктурном уровне (рис. 2) как у интактных, так и у животных плацебо выявлялся стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), проявлявшийся в разбухании цистерн и трубочек, теряющих свои стенки с осыпающимися рибосомами. Встречались аутофагосомы, формирующиеся из скопления рибосом. Отмечались большие поля гликогена (рис. 2а–в). Митохондрии либо характеризовались очень плотным матриксом с хаотично расположенными кристами, либо имели разрушающую структуру (рис. 2а–г), встречались митофагосомы. Дезорганизация митохондрий, как известно, приводит к выделению факторов, запускающих апоптоз (цитохром с, каспазы) [13]. Наблюдался выраженный экзоцитоз мелких капель липидов из гепатоцитов в пространства Диссе (рис. 2а) и в межгепатоцитарные щели (рис. 2б, г). Компактные участки с комплексами «митохондрия-ЭПР (гранулярного эндоплазматического ретикулума)» (комплексы митохондрий с неразрушенными профилями гранулярного ЭПР) выявлялись редко.

ТАБЛИЦА 1
ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ГЕПАТОЦИТОВ С ЛИПИДНЫМИ ВКЛЮЧЕНИЯМИ И ДОЛЯ ГЕПАТОЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗМЕРА ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ

TABLE 1
RELATIVE VALUE OF HEPATOCYTES WITH LIPID INCLUSIONS AND THE PROPORTION OF HEPATOCYTES DEPENDING ON THE SIZE OF LIPID DROPLETS

Группы	Доля гепатоцитов с липидными включениями (%), Ме (Q1; Q3)	Доля гепатоцитов в зависимости от размера липидных капель (%), Ме (Q1; Q3)		
		мелкие капли	средние капли	крупные капли
Контроль	77,78 (68,97; 86,36)	75,00 (64,71; 80,00)	22,05 (16,00; 28,57)	0,01 (0,01; 5,80)
Плацебо	83,33 (69,70; 91,67)*	66,67 (59,26; 76,92)*	27,78 (20,69; 34,78)*	0,01 (0,01; 6,67)
Мелатонин	77,78 (53,85; 88,89)*	40,00 (25,00; 57,14)*•	42,86 (31,82; 55,56)*•	10,71(4,00; 20,83)*•

Примечание. * – сравнение с контролем; • – сравнение с плацебо.

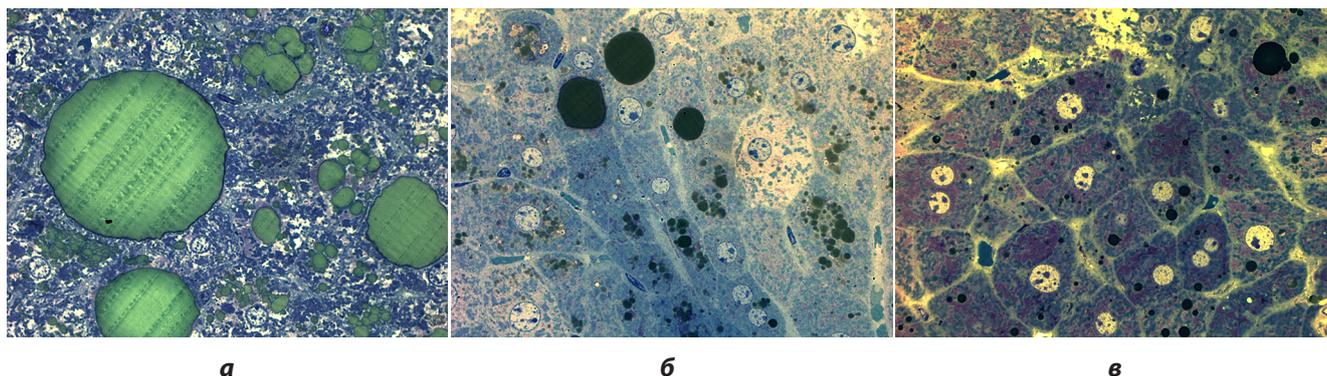
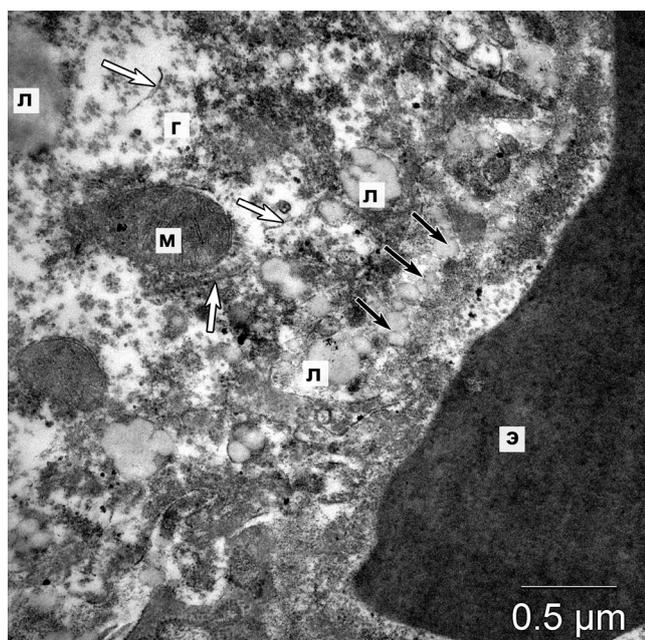
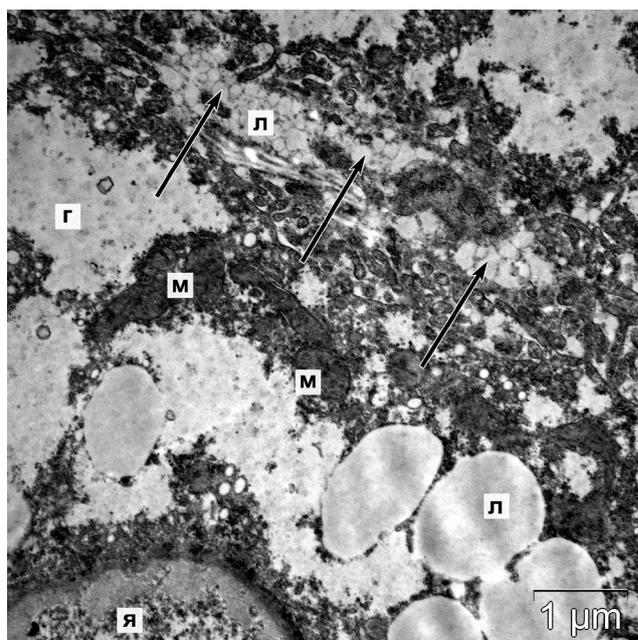


РИС. 1. Фото гепатоцитов печени половозрелых самок *db/db* мышей: мелкокапельный характер стеатоза в группах «Контроль» (а) и «Плацебо» (б) с отдельными гигантскими липидными включениями; в – появление большего числа гепатоцитов со средними и большими липидными включениями (но не гигантскими ЛК) в группе «Мелатонин». Полутонкие препараты, окраска толуидиновым синим; окуляр 10, объектив 100, иммерсия

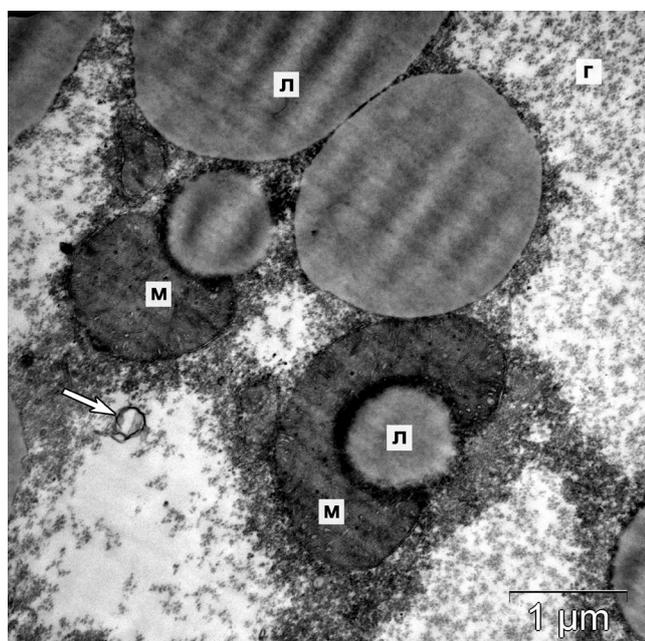
FIG. 1. Photo of liver hepatocytes of mature female *db/db* mice: small-drop steatosis in the “Control” (а) and “Placebo” (б) groups with individual giant lipid inclusions; в – the appearance of a larger number of hepatocytes with medium and large lipid inclusions (but not with giant lipid droplets) in the “Melatonin” group. Semithin preparations, toluidine blue stain; magnification $\times 1000$, immersion



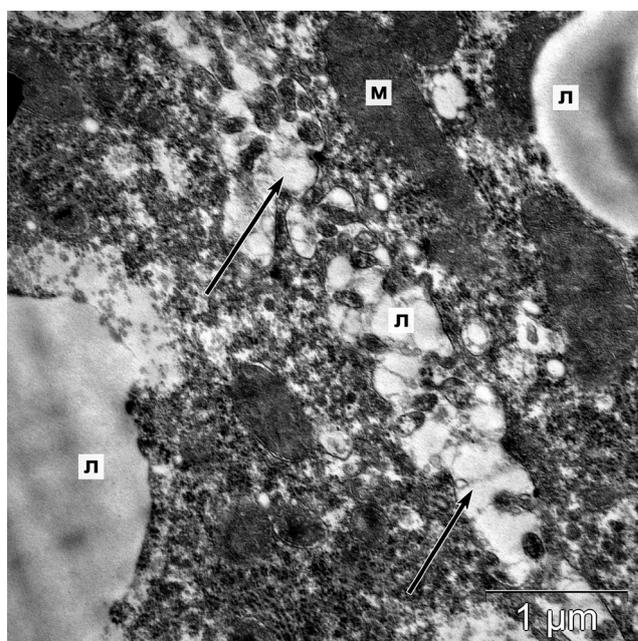
а



б



в



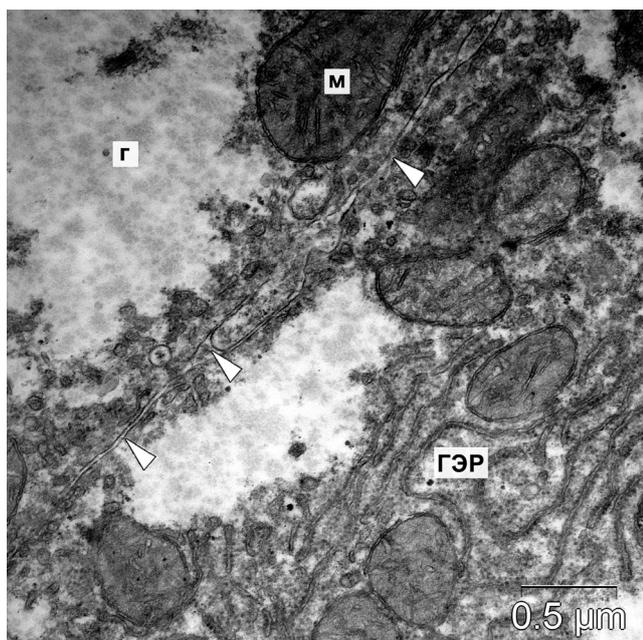
г

РИС. 2.

Ультраструктурные особенности печени db/db мышей с ожирением и СД2 групп «Контроль», «Плацебо» и «Мелатонин»: а, б – группа «Контроль»: выраженный экзоцитоз мелких капель липидов из гепатоцитов в пространство Диссе (а) и межгепатоцитарные щели (б); в, г – группа «Плацебо»: комплексы липидов с митохондриями и экзоцитоз липидов в межгепатоцитарные щели. г – гликоген; л – липидная капля; м – митохондрия; э – эритроцит (в просвете синусоидного капилляра); я – ядро гепатоцита; черные короткие стрелки – экзоцитоз липидных капель в пространство Диссе; черные длинные стрелки – экзоцитоз ЛК в межгепатоцитарные щели; белые стрелки – остатки профилей ЭПР; белые «треугольные» стрелки – межгепатоцитарные щели без экзоцитоза ЛК

FIG. 2.

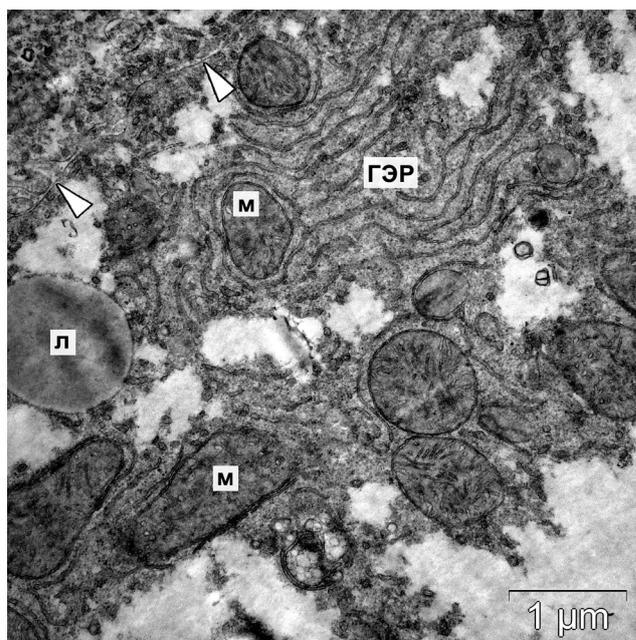
Ultrastructural features of the liver in db/db mice with obesity and type 2 diabetes mellitus of "Control", "Placebo" and "Melatonin" groups: а, б – the "Control" group: pronounced exocytosis of small lipid droplets (LDs) from hepatocytes into Disse's space (а) and into interhepatocytic slits (б); в, г – the "Placebo" group: lipid complexes of LDs with mitochondria and exocytosis of LDs into interhepatocytic slits. г – glycogen; л – lipid droplet; м – mitochondria; э – erythrocyte (in the lumen of the sinusoidal capillary); я – hepatocyte nucleus; short black arrows – exocytosis of LDs into the Disse space; long black arrows – exocytosis of LDs into the interstitial slits; white arrows – remnants of the endoplasmic reticulum profiles; white "triangular" arrows – interhepatocytic slits without exocytosis of LDs



д

РИС. 2 (продолжение).

Ультраструктурные особенности печени db/db мышей с ожирением и СД2 групп «Контроль», «Плацебо» и «Мелатонин»: **д, е** – группа «Мелатонин»: нормализация состояния профилей ЭПР, отсутствие экзоцитоза в межгепатоцитарные щели, комплексообразование митохондрий с гранулярным ЭПР. г – гликоген ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум; л – липидная капля; м – митохондрия; э – эритроцит (в просвете синусоидного капилляра); я – ядро гепатоцита; черные короткие стрелки – экзоцитоз липидных капель в пространство Диссе; черные длинные стрелки – экзоцитоз ЛК в межгепатоцитарные щели; белые стрелки – остатки профилей ЭПР; белые «треугольные» стрелки – межгепатоцитарные щели без экзоцитоза ЛК



е

FIG. 2 (continued).

Ultrastructural features of the liver in db/db mice with obesity and type 2 diabetes mellitus of the "Control", "Placebo" and "Melatonin" groups. **д, е** – the "Melatonin" group: recovery of the state of endoplasmic reticulum profiles, absence of exocytosis into interhepatocytic slits, complexing mitochondria with granular endoplasmic reticulum. г – glycogen ГЭР – granular endoplasmic reticulum; л – lipid droplet LD; м – mitochondria; э – erythrocyte (in the lumen of the sinusoidal capillary); я – hepatocyte nucleus; short black arrows – exocytosis of LDs into the Disse space; long black arrows – exocytosis of lipid droplets into the interstitial slits; white arrows – remnants of the endoplasmic reticulum profiles; white "triangular" arrows – interhepatocytic slits without exocytosis of LDs

Введение МТ db/db мышам в течение 2 месяцев способствовало статистически значимому снижению доли гепатоцитов с липидными включениями по сравнению с плацебо (табл. 1). Причём установлено уменьшение количества паренхиматозных клеток с мелкими липидными каплями и увеличение числа гепатоцитов со средними и крупными жировыми включениями по сравнению как с контролем, так и с плацебо (табл. 1; рис. 1в). При этом формирования гигантских ЛК не выявлялось, а плотность липидных включений на клетку была значительно менее выражена по сравнению с контрольными и плацебо-животными (табл. 1). Ультраструктурно гепатоциты характеризовались менее выраженными полями гликогена, большими компартаментами с неразрушенными гранулярными профилями ЭПР, комплексирующими с митохондриями (рис. 2д, е); наблюдались тесные контакты мембран митохондрий и пероксисом с ЛК. Отсутствовал экзоцитоз мелких капель липидов в межгепатоцитарные щели (рис. 2д).

ОБСУЖДЕНИЕ

Липидные капли – это липидные включения внутри клеток, которые хранят нейтральные липиды. «Ядро» ЛК, состоящее в основном из триацилглицеринов и эфиров стероидов, окружено монослоем фосфолипидов, а также специализированными ЛК-ассоциированными поверхностными белками. ЛК участвуют в гидролизе нейтральных липидов, предотвращают липотоксичность и играют важную роль в поддержании липидного гомеостаза клеток. Липидные включения хранят эфиры холестерина и содержат стероидные гормоны и триглицериды, которые используются в качестве источника энергии и предшественника для синтеза мембранных фосфолипидов. В нормальных физиологических условиях ЛК в печени малы и их количество ограничено. Они образуются путём отпочковывания от мембраны ЭПР и переносятся в цитозоль. При развитии метаболической дисфункции происходит увеличение синтеза ЛК, что приводит к возрастанию отложения нейтральных липидов и вызывает

ряд нарушений, вовлечённых в патогенез стеатоза печени, включая воспаление, стресс ЭПР, митохондриальную дисфункцию, повышенное производство активных форм кислорода (АФК) и резистентность к инсулину из-за клеточной токсичности [12].

Липидные включения и связанные с ними специализированные поверхностные белки (перилипины (PLIN), белок-накопитель жира 27 (FSP27, fat-storage protein 27) и др.) играют важную роль в патогенезе накопления липидов в печени. Нарушение регуляции накопления ЛК рассматривается как один из основных факторов стеатоза печени при МАЖБП. Так, FSP27 участвует в процессе слияния ЛК, что приводит к образованию более крупных липидных включений и увеличению хранения и накопления триглицеридов [12, 14].

Дисфункциональные ЛК и клеточный транспорт липидов связаны с метаболическими нарушениями, воспалением и ожирением печени. Исследование ЛК разного размера с помощью иммунофлуоресценции, электронной микроскопии и вестерн-блоттинга обнаружило, что размер липидных включений регулирует липолиз и катаболизм липофагии в гепатоцитах. В частности, ингибирование липолиза, липофагии или того и другого приводило к сходному общему содержанию ЛК, но к резким различиям в их морфологии. Ингибирование фермента липолиза триглицеридлипазы приводило к образованию крупных цитоплазматических ЛК, тогда как лизосомальное ингибирование вызывало накопление многочисленных мелких липидных включений и везикул, подвергавшихся кислотной деградации, в цитоплазме. Эти данные являются новыми доказательствами, указывающими на синергическую взаимосвязь, при которой липолиз нацелен на ЛК большего размера с образованием как уменьшенных по размеру, так и зарождающихся синтезированных малых ЛК, которые пригодны для липофагической интернализации [15]. В нашем исследовании установлено, что в печени *db/db* мышей среди липидосодержащих паренхиматозных клеток преобладали гепатоциты с мелкими ЛК. Полученные нами результаты согласуются с научными данными других учёных. Так, у 22-недельных *db/db* мышей была установлена повышенная экспрессия печёночного мембранного канального белка акваглицеропорина AQP9, что увеличивало поступление глицерина в печень и вызывало жировую дистрофию печени и гипергликемию. При этом сниженная экспрессия AQP7 в белой жировой ткани способствовала избыточному накоплению липидов в адипоцитах. В результате у этих животных с возрастом увеличилась масса тела, белая жировая ткань, масса печени, уровни липидов печени, липидов плазмы, инсулина и лептина на фоне усиления экспрессии генов, связанных с синтезом жирных кислот и триглицеридов в печени и увеличения экспрессии генов и белковых ферментов, связанных с глюконеогенезом [16].

Имеются данные о том, что у *db/db* мышей уровень гликогена в печени постоянно повышен. На трансмиссионных электронных микрофотографиях гликоген печени выглядит как ростки цветной капусты, состоящие из крупных α -частиц (различных размеров), в состав ко-

торых входят более мелкие β -частицы, связанные между собой. Новые исследования распределения молекул гликогена печени по размерам обнаружили, что α -частицы у *db/db* мышей химически более хрупкие, чем у здоровых мышей, и могут легко распадаться на более мелкие β -частицы. Имеются доказательства того, что более мелкие частицы гликогена имеют более высокую связь с гликогенфосфорилазой, ключевым ферментом, участвующим в деградации гликогена, а также быстрее разлагаются *in vitro*. Предполагается, что неспособность образовывать стабильные крупные α -частицы гликогена приводит у *db/db* мышей к более быстрому и менее контролируемому распаду гликогена в глюкозу [17].

Нами установлено, что гепатоциты *db/db* мышей содержали большое количество мелкокапельных липидных включений: преимущественно в цитоплазме, редко – в ядрах. Отмечался экзоцитоз липидных включений в дилатированные пространства Диссе и межгепатоцитарные щели из гепатоцитов, что способствует застою лимфы и развитию гистотоксической гипоксии, являющейся индуктором клеточной гибели. Последние исследования подчёркивают, что, помимо роли хранения жирных кислот, ЛК являются резервуарами для липофильных токсинов, жирорастворимых витаминов, а также в них концентрируются развёрнутые и агрегированные белки во время стресса ЭПР [18].

В гепатоцитах *db/db* мышей нами описаны структурные комплексы липидных включений с митохондриями, контакты в которых известны как места передачи жирных кислот от ЛК в митохондрии для окисления. Исследования последних лет установили, что ЛК являются жизненно важными центрами, обеспечивающими правильную координацию переноса жирных кислот между различными органеллами. Показано, что ЛК имеют физические контакты с ЭПР, пероксисомами, лизосомами/вакуолями, эндосомами эндоцитарного пути и митохондриями с целью передачи информации о гомеостазе ЛК и об обмене метаболитами. В местах контакта липидных включений с митохондриями жирные кислоты передаются последним для β -окисления. Совсем недавно они также были идентифицированы как сигнальные платформы, участвующие в ответе на протеотоксический стресс или микробные инфекции [18]. Например, специализированные поверхностные белки семейства PLIN, входящие в структуру таких контактных зон, участвуют в привлечении митохондрий к поверхности липидных включений, регулируют окислительный гидролиз последних, предотвращают липолиз, блокируя воздействие липопротеинлипазы на ЛК [19]. Повышенные уровни перилипина 2 (PLIN2) отмечены у пациентов с саркопенией и стеатозом печени [12].

Приводятся доказательства того, что жировая ткань играет решающую роль в регуляции системного метаболизма глюкозы и липидов и секретирует биологически активные молекулы, обладающие эндокринными, паракринными и аутокринными функциями. Дисфункциональная жировая ткань тесно связана с ключевыми аспектами метаболических заболеваний, такими как резистентность к инсулину, липидная перегрузка, воспа-

ление и стресс органелл. Считается, что в нормальных условиях липогенез *de novo* в белом жире незначителен по сравнению с липогенезом в печени. Жировая ткань также экспрессирует регулируемый инсулином переносчик глюкозы типа 4 (insulin-regulated glucose transporter type 4) и участвует в периферической утилизации глюкозы. Кроме того, термогенная жировая ткань может служить стоком глюкозы в условиях, вызывающих адренергическую стимуляцию. Жировая ткань подвергается обширному ремоделированию при ожирении, которое включает не только увеличение размера и количества адипоцитов, но и инфильтрацию тканей иммунными клетками, тканевую гипоксию, накопление компонентов внеклеточного матрикса и дисфункцию на уровне органелл – ЭПР, митохондрий, липидных включений [20].

Нами выявлено, что введение МТ приводит к уменьшению численной плотности паренхиматозных клеток с мелкокапельным стеатозом и увеличению количества гепатоцитов с крупными и средними жировыми включениями. При этом формирования гигантских липидных капель не наблюдалось, а плотность липидных включений на клетку была значительно менее выражена по сравнению с контролем и плацебо. В настоящее время известно, что при клеточном окислительном стрессе, вызванном АФК, возрастает накопление ЛК. К тому же через путь JNK – p38 – ATF клеточный окислительный стресс усиливает экспрессию перилипина 5 (PLIN5), ключевого специализированного ЛК-ассоциированного поверхностного белка, связанного с контактными участками митохондрий и липидных включений. При этом установлено, что белок PLIN5 снижает уровни АФК и улучшает функцию митохондрий в клетках печени при МАЖБП [21].

Выявленное нами формирование средних и крупных (но не гигантских) ЛК и уменьшение численной плотности гепатоцитов с мелкими липидными включениями у *db/db* мышей, получавших МТ, по сравнению с прогрессированием микровезикулярного стеатоза печени у животных, не получавших гормон, другими исследователями рассматривается как благоприятный прогностический признак [22]. Кроме того, у *db/db* мышей после введения МТ не выявлялись картины экзоцитоза мелких липидных включений в межгепатоцитарные щели. Такие морфологические перестройки способствуют улучшению жидкостного гомеостаза, препятствуют развитию тканевой гистотоксической гипоксии и митохондриальной дисфункции. Имеются данные о том, что восстановление гомеостатического интерстициального микроокружения смягчает тяжесть цитолипидемического нарушения в поражённых типах клеток, уменьшает ядерную липоинфильтрацию и липорастворение ДНК, что приводит к сохранению цитоструктурной целостности [3].

Улучшение состояния крист митохондрий, увеличение комплексов «мито-ГЭР» свидетельствует об активном функциональном состоянии этих структур. На животных моделях показано, что МТ блокирует перекисное окисление в митохондриях и стимулирует синтез мито-

фусина-2 – белка, участвующего в восстановлении митохондрий у мышей с ожирением [7]. Усиление дренажа в органе, улучшение состояния митохондрий, уменьшение тканевой гипоксии – эти факты согласуются с полученными ранее данными об антиапоптотическом действии МТ [13].

Интенсивный липолиз приводит к выделению большого количества свободных жирных кислот, которые транспортируются преимущественно в печень и препятствуют связыванию инсулина с гепатоцитами, обуславливая развитие инсулинорезистентности. Инсулин, не связавшийся с гепатоцитами, в свою очередь, способствует развитию системной гиперинсулинемии [23]. Нами отмечено, что гепатоциты печени *db/db* мышей, получавших МТ, характеризовались менее выраженными полями гликогена по сравнению с контрольными и плацебо-животными.

Патогенез прогрессирования заболевания от стеатоза до фиброза и цирроза был изначально представлен в виде теории «двух ударов», который предполагает, что накопление липидов в печени является первым ударом, а восприимчивость гепатоцитов к повреждениям, таким как окислительный стресс, митохондриальная дисфункция и провоспалительные цитокины, – вторым [12]. Нами установлено, что введение МТ способствует большей сохранности микро- и ультраструктурной организации печени: приводит к снижению относительного числа гепатоцитов с ЛК, уменьшению доли клеток с мелкокапельными включениями и увеличению процента гепатоцитов со средними и крупными, но не гигантскими ЛК, улучшает морфологическую организацию митохондрий, приводит к появлению структурных комплексов липидных включений с митохондриями, уменьшению содержания гликогена, нормализации состояния профилей ЭПР, увеличению комплексов «мито-ГЭР» и отсутствию экзоцитоза липидных капель в межгепатоцитарные щели, что создаёт условия для уменьшения восприимчивости к повреждениям клеток органа и уменьшению морфологических проявлений МАЖБП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение МТ значительно нивелировало негативные изменения морфологических показателей липидного обмена в печени животных, что свидетельствует о возможности использования МТ как эффективного протектора жирового гепатоза.

Финансирование

Данное исследование было поддержано бюджетным проектом Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (FWNR-2022-0009).

Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования микроскопического анализа био-

логических объектов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» за предоставленное оборудование.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases. *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2020; 5: 16. doi: 10.21037/tgh.2019.09.08
2. Alemany M. The metabolic syndrome, a human disease. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(4): 2251. doi: 10.3390/ijms25042251
3. Garris DR. Hypercytolipidemia-induced cellular lipooapoptosis: Cytostructural and endometabolic basis of progressive organo-involution following expression of diabetes (*db/db*) and obese (*ob/ob*) mutation syndromes. *Prog Histochem Cytochem.* 2006; 40(4): 181-231. doi: 10.1016/j.proghi.2006.02.002
4. Райхельсон К.Л., Маевская М.В., Жаркова М.С., Гречишников В.Р., Оковитый С.В., Деева Т.А., и др. Жировая болезнь печени: новая номенклатура и ее адаптация в Российской Федерации. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2024; 34(2): 35-44. [Raikhelson KL, Maevskaya MV, Zharkova MS, Grechishnikova VR, Okovityi SV, Deeva TA, et al. Steatotic liver disease: New nomenclature and its localization in the Russian Federation. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2024; 34(2): 35-44. (In Russ.)]. doi: 10.22416/1382-4376-2024-961
5. Habibullah M, Jemmeh K, Ouda A, Haider MZ, Malki MI, Elzouki AN. Metabolic-associated fatty liver disease: A selective review of pathogenesis, diagnostic approaches, and therapeutic strategies. *Front Med (Lausanne).* 2024; 11: 1291501. doi: 10.3389/fmed.2024.1291501
6. Tursinawati Y, Kartikadewi A, Kartikadewi A, Yuniastuti A, Yuniastuti A, Susanti R. Melatonin, a promising therapeutic for diabetes mellitus and its complications: A narrative review. *J Biomed Transl Res.* 2021; 7(3): 138-145. doi: 10.14710/jbtr.v7i3.12257
7. Цветкова Е.С., Романцова Т.И., Полуэктов М.Г., Руннова Г.Е., Глинкина И.В., Фадеев В.В. Значение мелатонина в регуляции обмена веществ, пищевого поведения, сна и перспективы использования препаратов мелатонина для лечения ожирения. *Ожирение и обмен веществ.* 2021; 18(2): 112-124. [Tsvetkova ES, Romantsova TI, Poluektov MG, Runnova GE, Glinkina IV, Fadeev VV. The importance of melatonin in the regulation of metabolism, eating behavior, sleep, and the prospects for the use of melatonin drugs for obesity treatment. *Obesity and Metabolism.* 2021; 18(2): 112-124. (In Russ.)]. doi: 10.14341/omet12279
8. Hosseinzadeh A, Changizi-Ashtiyani S, Koosha F, Amiri S, Karimi-Behnagh A, Reiter RJ, et al. Melatonin: Therapeutic potential for stroke and other neurodegenerative diseases. *Melatonin Res.* 2023; 6(1): 102-134. doi: 10.32794/mr112500144
9. Крелевец Т.С., Ливзан М.А. Неалкогольная жировая болезнь печени: дайджест 2021. *Доказательная гастроэнтерология.* 2021. 10(2): 27-35. [Krolevets TS, Livzan MA. Non-alcoholic fatty liver disease: digest 2021. *Russian Journal of Evidence-Based*

Gastroenterology. 2021; 10(2): 27-35. (In Russ.)]. doi: 10.17116/dokgastro20211002127

10. Киселева Е.В., Демидова Т.Ю. Неалкогольная жировая болезнь печени и сахарный диабет 2 типа: проблема сопряженности и этапности развития. *Ожирение и метаболизм.* 2021; 18(3): 313-319. [Kiseleva EV, Demidova TY. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: The problem of conjunction and phasing. *Obesity and Metabolism.* 2021; 18(3): 313-319. (In Russ.)]. doi: 10.14341/omet12758
11. Zakaria Z, Othman ZA, Nna VU, Mohamed M. The promising roles of medicinal plants and bioactive compounds on hepatic lipid metabolism in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in animal models: Molecular targets. *Arch Physiol Biochem.* 2023; 129(6): 1262-1278. doi: 10.1080/13813455.2021.1939387
12. Chandrasekaran P, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Perilipins: A family of five fat-droplet storing proteins that play a significant role in fat homeostasis. *J Cell Biochem.* 2024; 125(6): e30579. doi: 10.1002/jcb.30579
13. Michurina SV, Ischenko IY, Arkhipov SA, Klimontov VV, Cherepanova MA, Korolev MA, et al. Melatonin-aluminum oxide-polymethylsiloxane complex on apoptosis of liver cells in a model of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 164(2): 165-169. doi: 10.1007/s10517-017-3949-x
14. Wang S, Yang M, Li P, Sit J, Wong A, Rodrigues K, et al. High-fat diet-induced deSUMOylation of E4BP4 promotes lipid droplet biogenesis and liver steatosis in mice. *Diabetes.* 2023; 72(3): 348-361. doi: 10.2337/db22-0332
15. Schott MB, Weller SG, Schulze RJ, Krueger EW, Drizyte-Miller K, Casey CA, et al. Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *J Cell Biol.* 2019; 218(10): 3320-3335. doi: 10.1083/jcb.201803153
16. Hirako S, Wakayama Y, Kim H, Iizuka Y, Wada N, Kaibara N, et al. Association of aquaporin 7 and 9 with obesity and fatty liver in *db/db* mice. *Zoolog Sci.* 2023; 40(6): 455-462. doi: 10.2108/zs230037
17. Sullivan MA, Harcourt BE, Xu P, Forbes JM, Gilbert RG. Impairment of liver glycogen storage in the *db/db* animal model of type 2 diabetes: A potential target for future therapeutics? *Curr Drug Targets.* 2015; 16(10): 1088-1093. doi: 10.2174/1389450116666150727123115
18. Enkler L, Spang A. Functional interplay of lipid droplets and mitochondria. *FEBS Lett.* 2024; 598(10): 1235-1251. doi: 10.1002/1873-3468.14809
19. Chahirou Y, Mesfioui A, Ouichou A, Hessni A. Адипокины: механизмы метаболических и поведенческих расстройств. *Ожирение и метаболизм.* 2018; 15(3): 14-20. [Chahirou Y, Mesfioui A, Ouichou A, Hessni A. Adipokines: mechanisms of metabolic and behavioral disorders. *Obesity and metabolism.* 2018; 15(3): 14-20. (In Russ.)]. doi: 10.14341/OMET9430
20. An SM, Cho SH, Yoon JC. Adipose tissue and metabolic health. *Diabetes Metab J.* 2023; 47(5): 595-611. doi: 10.4093/dmj.2023.0011
21. Tan Y, Jin Y, Wang Q, Huang J, Wu X, Ren Z. Perilipin 5 protects against cellular oxidative stress by enhancing mitochondrial function in HepG2 cells. *Cells.* 2019; 8(10): 1241. doi: 10.3390/cells8101241
22. Павлов Ч.С., Кузнецова Е.А., Шульпекова Ю.О., Семенистая М.Ч. Неалкогольная жировая болезнь печени. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019. [Pavlov ChS, Kuznetsova EA, Shulpekova YuO, Semenistaya MCh. *Non-alcoholic fatty liver disease.* Moscow: GEOTAR-Media; 2020. (In Russ.)].

23. Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Федорова Т.С., Новицкий В.В. Молекулярные механизмы модуляции липолиза в жировой ткани и развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 58(4): 111-

119. [Ivanov VV, Shakhristova EV, Stepovaya EA, Nosareva OL, Fedorova TS, Novitsky VV. Molecular mechanisms of modulation of lipolysis in adipose tissue and development of insulinresistance in diabetes. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2014; 58(4):111-119. (In Russ.)].

Сведения об авторах

Мичурина Светлана Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующая группой экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: michurinasv3000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Колесников Сергей Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; профессор факультета политологии, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», e-mail: sikolesnikov2012@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

Васендин Дмитрий Викторович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры техносферной безопасности, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет геосистем и технологий»; доцент кафедры радиотехнических устройств и техносферной безопасности, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный университет телекоммуникаций и информатики», e-mail: vasendindv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9503-6940>

Иценко Ирина Юрьевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник группы экспериментальной фармакологии, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», e-mail: irenisch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>

Information about the authors

Svetlana V. Michurina – Dr. Sc. (Med.), Professor, Chief Research Officer, Head of the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: michurinasv3000@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Sergey I. Kolesnikov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Member of the RAS, Leading Research Officer, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; Professor at the Faculty of Political Science, Lomonosov Moscow State University, e-mail: sikolesnikov2012@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>

Dmitry V. Vasendin – Cand. Sc. (Med.), Associate Professor at the Department of Technosphere Safety, Siberian State University of Geosystems and Technologies; Associate Professor at the Department of Radio Devices and Technosphere Safety, Siberian State University of Telecommunications and Informatics, e-mail: vasendindv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9503-6940>

Irina Yu. Ishchenko – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer at the Group of Experimental Pharmacology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, e-mail: irenisch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6281-0402>