УДК: 612.359:612.018
© Березовский В.А., Янко Р.В., Литовка И.Г., Волович О.И., 2012

РЕАКТИВНОСТЬ ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА

Березовский В.А., Янко Р.В., Литовка И.Г., Волович О.И.

I Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины

Березовский В.А., Янко Р.В., Литовка И.Г., Волович О.И. Реактивность паренхимы печени крыс после введения экзогенного мелатонина // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10. №4. – С. 178-181.

Исследовали влияние экзогенного мелатонина на физиологическую регенерацию и функциональную активность паренхимы печени взрослых крыс. В печени животных, после влияния экзогенного мелатонина в физиологической дозе 1 мг/кг массы тела, выявлены явные изменения в структуре гепатоцитов: увеличивались размеры ядра, возрастало количество ядрышек и двуядерных гепатоцитов, повышалось ядерно-цитоплазматическое и ядрышко-ядерное соотношения. Такие изменения мы рассматриваем как показатели интенсификации функциональной и регенераторной активности паренхимы печени. В сыворотке крове исследуемых крыс выявлена тенденция к снижению активности аланинаминотрансферазы, что может указывать на уменьшение количества дегенеративных процессов в гепатоцитах. Тогда, как концентрация общего белка в сыворотке крови – несколько увеличивалась, что возможно свидетельствует о повышении белоксинтетической функции печени.

Ключевые слова: паренхима печени, мелатонин.

Березовський В.Я., Янко Р.В., Літовка І.Г., Волович О.І. Реактивність паренхіми печінки щурів після введення екзогенного мелатоніну // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10. №4. – С. 178-181.

Досліджували вплив екзогенного мелатоніну на фізіологічну регенерацію і функціональну активність паренхіми печінки дорослих щурів. У печінці тварин, після впливу екзогенного мелатоніну в фізіологічній дозі 1 мг/кг маси тіла, виявлені явні зміни в структурі гепатоцитів: збільшувалися розміри ядра, зростала кількість ядерець і двоядерних гепатоцитів, підвищувалося ядерно-цитоплазматичне і ядерцево-ядерне співвідношення. Такі зміни ми розглядаємо як показники інтенсифікації функціональної і регенераторної активності паренхіми печінки. У сироватці крові досліджуваних щурів виявлена тенденція до зниження активності аланінамінотрансферази, що може вказувати на зменшення кількості дегенеративних процесів в гепатоцитах. Тоді, як концентрація загального білку в сироватці крові – дещо збільшувалася, що можливо свідчить про підвищення білоксинтетичної функції печінки.

Ключові слова: паренхіма печінки, мелатонін.

Berezovskiy V.A., Yanko R.V., Litovka I.G., Volovich O.I. Exogenous melatonin effects on the reactivity of rats liver parenchima // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10. №4. – С. 178-181.

Investigated influence of exogenous melatonin on the physiological regeneration and functional activity of adult rats liver parenchima. In the liver of animals, after influence of exogenous melatonin in a dose of 1 mg/kg b. w., it was shown changes in the hepatocytes structure: the increased of the nucleus sizes, amount of karyonucleus and binuclear hepatocytes, nucleocytoplasmic and nucleolar-nuclear correlation testify too. Such changes we examine as indexes of functional and regeneratation activity intensification of liver parenchima. Activity of alanine aminotranferease in the blood serum had a tendency to the decline, that can specify on reduction of degenerative processes amount in hepatocytes. The concentration of general albumen some increased in the blood serum, that can testify to the increase of albumen-synthetic liver function.

Key words: liver parenchima, melatonin.

Введение. Печень выполняет роль основного детоксикационного центра в организме. Именно в ней сконцентрированы ферментные системы, которые осуществляют биотрансформацию и детоксикацию эндо- и экзогенных метаболитов. Активно участвуя в обмене веществ, печень обеспечивает важную роль в поддержании гуморального гомеостаза организма. К сожалению количество нарушений физиологических функций гепатобилиарной системы непрестанно растет. Поиск механизмов, которые могли бы корректировать скорость процессов регенерации и повышать функциональную активность паренхимы печени является важным и актуальным направлением.

Полное морфологическое и функциональное восстановление печени требует сложной упорядоченной системы межклеточных взаимодействий между паренхимными и стромальными клетками, компонентами внеклеточного матрикса, а также гибкой центральной координации аутокринных, паракринных и эндокринных сигналов, которые стимулируют или угнетают пролиферацию клеток.

В последние годы внимание многих исследователей привлекает гормон эпифиза – мелатонин. Этот гормон участвует в регуляции ряда метаболических, иммунных и репродуктивных процессов, а также – в механизмах терморегуляции и старения. Мелатонин является одним из сильнейших эндогенных антагонистов свободных радикалов, стимулирует поглощение глюкозы и депонирование гликогена в тканях, повышает концентрацию АТФ [1, 2]. В специальной литературе опубликованы данные о влиянии мелатонина на интенсивность репаративной регенерации печени [9, 16]. В то же время, относительно физиологической регенерации – данные единичны [3].

Цель настоящей работы – исследовать влияние введения экзогенного мелатонина на морфометрические и биохимические показатели физиологической регенерации и функциональной активности паренхимы печени крыс.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 48 половозрелых крысах-самцах линии Вистар со средней массой тела 460±10 г. Животные были распределены на две группы: I группа – контроль, II – подопытные крысы, которые ежедневно в 17 часов (время когда физиологическая концентрация его является минимальной) на протяжении 28-ми суток получали экзогенный мелатонин (Unipharm Inc., США) в физиологической дозе 1 мг/кг массы тела. С целью избежания стресса при принудительном введении животному мелатонина, препарат вводили в пищу (творожная масса), с визуальным контролем полного съедания порций. Крысы контрольной

группы получали порцию творожной массы без мелатонина. В течение эксперимента все животные находились на стандартном рационе питания. Еженедельно контролировали массу тела крыс. Работу проводили с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных.

Общее состояние животных, интенсивность физиологической регенерации и функциональной активности паренхимы печени оценивали с помощью цитоморфометрических, физиологических, морфологических и биохимических методов исследования.

Для цитоморфометрических исследований отбирали образцы ткани из правой и левой долей печени. Гистологические препараты изготовляли по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и диоксане, заливали в парафин, красили гематоксилином Бемера и эозином, заключали в канадский бальзам [5]. Микропрепараты фотографировали с использованием цифровой фотокамеры на микроскопе "Olympus" (Япония). На компьютерных изображениях микропрепаратов осуществляли цитоморфометрию с помощью компьютерной программы IMAGE J.

Анализ гистологических препаратов осуществляли следующим образом: подсчитывали общее количество гепатоцитов, количество одно- и двуядерных клеток в поле зрения микроскопа, измеряли площадь гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы. Подсчет количества гепатоцитов проводили в 10 полях зрения микроскопа, а измерения площади осуществляли для каждой клетки с подсчетом среднего значения относительно 100 клеток. Также подсчитывали количество ядрышек на 100 ядер гепатоцитов. Цитоморфометрию проводили при увеличении микроскопа в 400 раз.

В сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (методом Райтмана-Френкеля), концентрацию общего белка (биуретовым методом), концентрацию альбумина (методом высаливания в сочетании с биуретовой реакцией).

Статистическую обработку полученных данных производили методами вариационной статистики. Достоверность разницы между контрольными и подопытными группами оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. Общая масса тела, печени и печеночный индекс у животных, которые испытывали влияние экзогенного мелатонина, достоверно не отличались от показателей контрольных крыс.

На гистопрепаратах печени интактных и подопытных животных печеночные дольки имеют многоугольную форму и окружены небольшим количеством соединительной ткани, их границы не четко выражены. Центральные вены, ветки воротной вены и синусоиды умеренно кровенаполнены. Гепатоциты среднего размера, с округлыми ядрами, размещенными преимущественно в центре клеток. Ядерная мембрана сохранена, имеет четкие контуры. Цитоплазма умеренно и равномерно окрашена.

На срезах печени крыс, которые получали экзогенный мелатонин, выявлена тенденция снижения площади поперечного сечения гепатоцитов и их цитоплазмы, сравнительно с контролем. В то же время, площадь ядра несколько увеличивалась (на 6%). В гепатоцитах животных подопытной группы выявлено статистически достоверное увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения (ЯЦС) на 23% (табл. 1). Отношение площади ядра к площади цитоплазмы, согласно гипотезе Р. Гертвига, является показателем пролиферативной активности. Известно, что гипертрофия ядра связана с синтезом белков, нуклеиновых кислот и других компонентов клетки, что свидетельствует об активации ее функции [6].

Таблица 1. Площадь поперечного сечения гепатоцитов, их ядер и цитоплазмы у контрольных и подопытных крыс (M±m, n=24)

Показатели	Площадь, мкм ^{2}			Ядерно-цитоплазматическое соотношение
	гепатоцитов	цитоплазмы	ядра	
Контроль	359±11	316±8,7	42,4±2,3	0,13±0,01
Мелатонин	331±11,6	286±12	45±2,4	0,16±0,01*

*P<0,05 – достоверность сравнительно с контролем

Общее количество и количество одноядерных гепатоцитов (в поле зрения микроскопа) у животных, получавших мелатонин, оставалось на уровне контрольных значений (табл. 2). Это можно объяснить тем, что печень принадлежит к стабильным, постмитотическим тканям, а гепатоциты являются долгоживущими клетками, которые при физиологических условиях имеют низкую скорость митотического деления. Цикл деления клеток паренхимы печени происходит очень медленно и длится от 150 до 400 суток. Число делящихся клеток от общей клеточной популяции зрелого органа составляет всего 0,8 – 1,5%. Уже в первые дни постнатальной жизни пролиферативные процессы в гепатоцитах резко снижаются, однако способность к митозам при этом у них сохраняется. В печеночной ткани взрослого организма митотическая активность гепатоцитов интенсивно проявляется преимущественно в редуцированной форме — образовании полиплоидных (4с—16с), в частности двуядерных клеток. Физиологическая регенерация гепатоцитов происходит преимущественно на внутриклеточном уровне (гиперплазия или гипертрофия органелл клетки) [6, 8].

Количество двуядерных гепатоцитов у крыс после введения экзогенного мелатонина достоверно увеличилось на 50% сравнительно с контролем (табл. 2). Биологический смысл двуядерных гепатоцитов долгое время оставался неясным. Многие исследователи считают, что образование двуядерных гепатоцитов из одноядерных при регенерации представляет собой резерв полиплоидизации. Общим принципом регенерации является восстановление прежде всего суммарного тканевого генома. Это достигается или делением клеток, или увеличением их геномов в неразделившейся клетке, т.е. полиплоидизацией. Таким образом, полиплоидизация с биологической точки зрения является, по мнению ряда авторов, эквивалентом клеточного размножения [7].

Таблица 2. Количество гепатоцитов в поле зрения микроскопа контрольных и подопытных крыс (M±m, n =24)

Показатели	Количество гепатоцитов			Соотношение двуядерные / одноядерные гепатоциты
	общее	одноядерных	двуядерных	
Контроль	121±3	116±3	4±0,2	0,035±0,002
Мелатонин	121±4	114±4,2	6±0,4*	0,053±0,003*

*P<0,05 – достоверность сравнительно с контролем

Функционирование ядрышка является одним из основных показателей характера метаболизма клетки. Именно в нем происходит транскрипция генов рибосом и начальные этапы процессинга рибосомной РНК. У животных подопытной группы, которые испытывали влияние мелатонина, ядрышки хорошо визуализируются, среднего размера, имеют округлую форму и четкие границы. Количество ядрышек (на 100 ядер) в гепатоцитах достоверно увеличилось на 22% сравнительно с контролем. Как результат этого – у крыс II группы отмечено достоверное повышение ядрышко-ядерного соотношения на 13% (рис. 1).

Увеличение количества ядрышек (амплификация) в ядрах и ядрышко-ядерного соотношения свидетельствует об активации белоксинтетической функции клетки, которая приводит к накоплению пластического материала, активации ферментов. По данным литературы амплификация ядрышек может быть одним из показателей интенсивности физиологической регенерации на внутриклеточном уровне [6, 8].

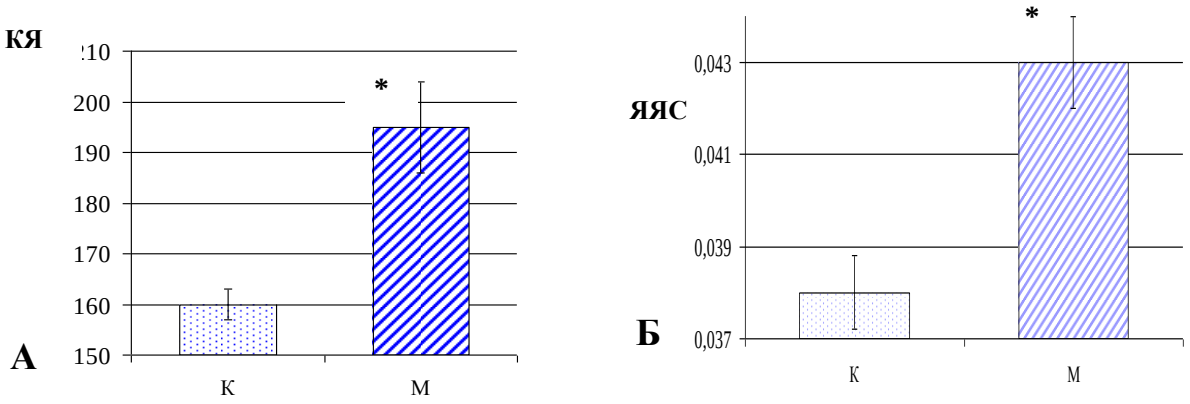

Рис. 1. Количество ядрышек (КЯ – на 100 ядер) (А) и ядрышко-ядерное соотношение (ЯЯС) (Б) в гепатоцитах контрольных (К) и подопытных крыс, получавших экзогенный мелатонин (М). *P<0,05 – достоверность сравнительно с контролем

Аланинаминотрансфераза (АЛТ) является внутриклеточным ферментом, который синтезируется гепатоцитами и может указывать на физиологическое состояние клеток паренхимы печени, степень сохранения интенсивности белкового обмена и включения аминокислот в реакции углеводного обмена. После влияния экзогенного мелатонина у крыс выявлена тенденция к снижению активности АЛТ в сыворотке крови (на 9%) (табл. 3). Это может свидетельствовать как о достаточной сохранности гепатоцитов, так и о снижении проницаемости цитоплазматической мембраны клеток, возможно – на угнетение апоптических процессов.

Таблица 3. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), концентрация общего белка и альбумина в сыворотке крови контрольных и подопытных крыс (M±m, n =24)

Показатели	Контроль	Мелатонин
Активность АЛТ, мккат/л	0,47±0,04	0,43±0,03
Концентрация общего белка, г/л	78,6±1,02	81,4±1,2
Концентрация альбумина, г/л	38,9±1,04	38,9±1,05

Печень активно участвует в синтезе и обмене белков. По концентрации общего белка и альбумина в сыворотке крови можна судить о функциональной активности паренхимы печени. В наших исследованиях у крыс, после влияния экзогенного мелатонина, выявлена незначительная тенденция к повышению концентрации общего белка в сыворотке крови, что может указывать на повышение белоксинтетической функции гепатоцитов [4]. В то же время концентрация альбумина в сыворотке крови оставалась на уровне контрольных значений. Таким образом, в пределах чувствительности использованного нами теста, под влиянием экзогенного мелатонина (в физиологической дозе 1 мг/кг массы тела), не было выявлено достоверных изменений в концентрации общего белка и альбумина в сыворотке крови между подопытными и контрольными крысами (табл. 3).

В литературе имеются сведения о антиапоптическом, антиоксидантном и гепатопротекторном действии мелатонина. Он уменьшает проницаемость митохондриальной мембраны, синтез цитохрома С и модулирует гены Bcl - 2 и Bax [10, 12]. Также способствует снижению уровня NO в сосудах и ослабляет экспрессию индуцирующей NO-синтазы в печени, что было продемонстрировано на моделях сепсиса, ишемии / реперфузии, холестаза, ионизирующей радиации [15]. Мелатонин интенсифицирует синтез гликогена в печени, но подавляет его высвобождение из гепатоцитов. Мелатонин уменьшает воспалительные изменения после резекции печени, что положительно влияет на ход послеоперационного периода. Это подтверждают результаты гистологических исследований – животные, которым вводили мелатонин обычно имеют сниженный уровень некроза гепато-

цитов и ослабленную инфильтрацию полиморфных гранулоцитов [14].

В настоящее время между двумя группами исследователей дискутируется вопрос о способности мелатонина стимулировать регенерацию печени. Первые – отмечают способность мелатонина активировать пролиферацию гепатоцитов. После введения экзогенного мелатонина отмечен рост митотического индекса [9]. Одними из возможных механизмов может быть ингибирование мелатонином IKKα, JNK1 и cJUN (c-Jun N-terminal kinases), которые являются Ser/Thr киназами. Основные биологические эффекты действия этих киназ – угнетение митотической активности и активация апоптоза [13]. В то же время другие исследователи описывают подавление мелатонином экспрессии ядерного антигена пролиферующих клеток и белка Ki-67, которые усиливают скорость клеточной пролиферации [11]. Эти результаты свидетельствуют о том, что роль мелатонина в процессе регенерации, в зависимости от реальных условий, может быть неоднозначной.

В наших исследованиях, после влияния экзогенного мелатонина, выявлены явные изменения в структуре гепатоцитов: увеличивались размеры ядра, возрастало количество ядрышек и двуядерных гепатоцитов, повышалось ядерно-цитоплазматическое и ядрышко-ядерное соотношения. Такие изменения мы рассматриваем как показатели интенсификации функциональной и регенераторной активности паренхимы печени. В сыворотке крове исследуемых крыс выявлена тенденция к снижению активности аланинаминотрансферазы, что может указывать на уменьшение количества дегенеративных процессов в гепатоцитах. Некоторое увеличение концентрации общего белка в сыворотке крови возможно свидетельствует о повышении белковосинтетической функции печени.

Выводы:

1. После 28-ми суток ежедневного введения животным мелатонина, в физиологической дозе 1 мг/кг массы тела, в структуре гепатоцитов крыс происходит ряд изменений: увеличиваются размеры ядра, возрастает количество ядрышек и двуядерных гепатоцитов, повышается ядерно-цитоплазматическое и ядрышко-ядерное соотношения.
2. Экзогенный мелатонин способствует снижению активности аланинаминотрансферазы и увеличению концентрации общего белка в сыворотке крови.
3. Введение экзогенного мелатонина интенсифицирует функциональную активность и физиологическую регенерацию паренхимы печени взрослых крыс.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Анисимов В.Н Мелатонин, роль в организме, применение в клинике. - СПб.: Система, 2007.– 40 с.
2. Арушанян Э.Б. Гормон эпифиза мелатонин и его лечебные возможности // Русский медицинский журнал. – 2005. – Т.13, № 26. – С. 1755 – 1760.
3. Березовський В.Я., Янко Р.В., Літовка І.Г. Вплив мелатоніну на інтенсивність фізіологічної регенерації паренхіми печінки щурів різного віку // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2010. – Випуск 27. – С. 163 – 166.
4. Бродский В.Я., Рапопорт С.И., Дубовая Т.К., Звездина Н.Д., Фатеева В.И., Мальченко Л.А. Мелатонин, введенный крысе, эффективно синхронизирует ритм синтеза белка в первичных культурах гепатоцитов, выделенных из этой крысы // Онтогенез. – 2010. – Т. 41, № 2. – С. 101–106.
5. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
6. Оболенська М.Ю. Регенерація печінки у щурів: молекулярно-біологічні процеси та їх регуляція : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук : спец 03.00.03. – Київ, 1999. – 34 с.
7. Романова Л.П., Малышев И.И. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс // Вестник Чувашского университета. – 2011. – №3. – С. 398 – 402.
8. Саркисов Д.С. Электронная микроскопия деструктивных и регенераторных внутриклеточных процессов – М.: Медицина, 1967. – 224 с.
9. Abbasoglu O., Berker M., Ayhan A., Palaoglu S., Sayek I. The effect of the pineal gland on liver regeneration in rats // J. Hepatol. – 1995. – Vol. 23, № 5. – P. 578 – 581.
10. Alexander M. Mathes hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors // World J Gastroenterol. – 2010. – Vol. 48, № 16. – P. 6087 – 6097.
11. Cini G., Neri B., Pacini A., Cesati V., Sassoli C., Quattrone S., D'Apolito M., Fazio A., Scapagnini G., Provenzani A., Quattrone A. Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects // J. Pineal Res. – 2005. – Vol.39 – P.12 – 20.
12. Hu S., Yin S., Jiang X., Huang D., Shen G. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response and apoptosis // Eur. J. Pharmacol. – 2009. – Vol. 61, № 6. – P. 287 – 292.
13. Liang R., Nickkholgh A., Hoffmann K., Kern M., Schneider H., Sobirey M., Zorn M., Büchler M.W., Schemmer P. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation // J Pineal Res. – 2009. – Vol. 46, № 1. – P. 8 – 14.
14. Nickkholgh A., Schneider H., Sobirey M., Venetz W.P., Hinz U., Pelzlle H., Gotthardt D.N., Cekauskas A., Manikas M., Mikalauskas S., Mikalauskene L., Bruns H., Zorn M., Weigand M.A., Büchler M.W., Schemmer P. The use of high-dose melatonin in liver resection is safe: first clinical experience // J. Pineal Res. – 2011. – Vol. 50, № 4. – P. 328 – 388.
15. Othman A.I., El-Missiry M.A., Amer M.A., Arafa M. Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats // Life Sci. – 2008. – Vol. 83, № 15–16. – P. 563 – 568.
16. Sigala F., Theocharis S., Sigalas K. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration // Journal of Pineal Res. – 2006. –Vol. 40. – P. 270 – 279.

Надійшла 11.09.2012 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін