

УДК: 612.359:612.018

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ФІЗІОЛОГІЧНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ПАРЕНХІМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Березовський В. Я., Янко Р. В., Літовка І. Г.

Вплив мелатоніну на інтенсивність фізіологічної регенерації паренхіми печінки щурів різного віку. — В. Я. Березовський, Р. В. Янко, І. Г. Літовка. — Досліджували вплив екзогенного мелатоніну на показники фізіологічної регенерації паренхіми печінки 32 щурів-самців лінії Вістар (3 та 9 місячних). Показано, що після 28-добового введення мелатоніну, в дозі 1 мг/кг маси тіла, в полі зору мікроскопа достовірно збільшується кількість одноп'ядерних (на 17%) і двоядерних гепатоцитів (на 30%) тільки у 9-місячних щурів. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення достовірно зростає у молодих тварин на 38%, а у дорослих щурів на 43%. Зроблений висновок, що 28-добове введення мелатоніну, в дозі 1 мг/кг маси тіла, позитивно впливає на регенерацію паренхіми печінки молодих і дорослих щурів.

Ключові слова: мелатонін, фізіологічна регенерація, паренхіма печінки.

Адреса: Відділ клінічної патофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, вул. Богомольця, 4, м. Київ, 01024, Україна; e-mail: biolag@bigmir.net

The melatonin effects on the physiology regeneration different age rats liver parenchyma. — V. Berezovskiy, R. Yanko, I. Litovka. — It was studied the effects of melatonin in doze 1 mg/kg during 28 days on functional state and physiological regeneration liver parenchyma fenomenas. It was shown that after completion of experiment at 3th and 9-monthly rats is increase sizes nucleus, the area of cytoplasm decrease, and also is increase the hepatocytes amount on tissue area unit at 9-monthly animals. Thus our study suggested that melatonin stimulant morphological markers functional and regenerative liver ability.

Key words: melatonin, physiological regeneration, liver parenchyma.

Address: A. A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, 4, Bogomoletz str, Kiev, 01024, Ukraine; e-mail: biolag@bigmir.net

Вступ

Останнім часом значну увагу вчених привертає дослідження впливу мелатоніна на різні системи організму. Він виконує різноманітні функції: гормона, нейромедіатора, імуномедіатора, антиоксиданта, стимулятора сну та імуногенезу. Мелатонінові рецептори розташовані, як на плазмалемі, так і на мембрані ядра клітини. Мелатонін використовують як імуностимулятор, гальмівник канцерогенезу, геропротектор [12]. Достатньо вивчено дію мелатоніну на статеву та нейроендокринну системи, на розвиток онкопатології [5, 7]. Однак вплив мелатоніну на процеси фізіологічної регенерації печінки вивчено недостатньо, що обумовлює доцільність проведення досліджень у цьому напрямку. Адже печінка виконує в організмі декілька принципово важливих функцій: детоксикацію та жовчоутворення, забезпечує підтримання гомеостазису. Тому пошук шляхів, які могли б інтенсифікувати фізіологічну регенерацію печінки є вельми актуальним.

Відомо, що мелатонін синтезується епіфізом у темний період доби. Його вміст у сировотці крові змінюється протягом життя. Концентрація мелатоніна поступово збільшується до періоду статевого дозрівання, після чого відбувається протилежний

ефект – зниження продукції мелатоніна та зменшення амплітуди добового ритму його секреції [11]. Інтенсивність процесів регенерації паренхіми печінки у молодих і дорослих тварин, у зв'язку з цим, можуть мати певні відмінності.

Мета роботи – дослідити вплив екзогенного мелатоніну на процеси фізіологічної регенерації гепатоцитів печінки молодих і дорослих щурів.

Матеріали і методи досліджень

Дослідження здійснено на 32 щурах-самцях лінії Вістар віком 3 та 9 місяців. На початку експерименту було сформовано 4 групи: I, III групи – контроль, II і IV групи – дослідні щури, яким перорально у дозі 1 мг/кг маси тіла вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну (Unipharm Inc., США). Мелатонін тварини отримували о 17 годині – це той час коли фізіологічна концентрація його є мінімальною. Щури контрольних груп одержували перорально 1 мл дистильованої води. Протягом експерименту всі тварини перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування та природнім циклом світло/темрява (тривалість освітлення: ~6.30 год. – ~17.30 год.). Доступ до води у всіх тварин був вільний. Щотижнево визначали масу тіла щурів. Роботу з лабораторними тваринами проводили з дотриманням міжнародних принципів

Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей (Страсбург, 1985).

По завершенню експеримента зразки тканини відбирали з правої і лівої долі печінки, які фіксували в рідині Буена. Зневоднення матеріалу проводили у спиртах зростаючої концентрації (від 70° до 96°) та діоксані. Зразки печінки заливали в парафін. Зрізи, завтовшки 5–6 мкм, виготовляли на санному мікромомі, фарбували за традиційною методикою – гематоксиліном Бемера та еозином, заключали в канадський бальзам [1, 3, 13].

Інтенсивність регенерації паренхіми печінки досліджували гістологічними та морфометричними методами. Функціональний стан гепатоцитів аналізували на світлооптичному мікроскопі за допомогою окуляр-мікрометра МОВ-1-15х та комп'ютерної програми IMAGE J. Регенераторні властивості паренхіми печінки оцінювали на підставі даних підрахунку загальної кількості гепатоцитів у полі зору, співвідношення числа одноядерних та двоядерних гепатоцитів. Крім того вимірювали площу гепатоцитів, їх ядер і цитоплазми, відстані між сусідніми ядрами. Підрахунок кількості гепатоцитів проводили в 10 полях зору мікроскопа, а вимірювання площі здійснювали для кожної клітини з підрахунком середнього значення відносно 100 клітин. Всі морфометричні виміри та підрахунок гепатоцитів проводили в полі зору мікроскопа при збільшенні в 400 разів. Статистичну обробку морфометричних даних здійснювали мето-

дам варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Statistica 5.0. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за t-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

На початку експерименту вага тіла 3-місячних щурів становила 140 ± 10 г, а 9-місячних – 350 ± 10 г. За 28 днів експерименту виявлено збільшення маси тіла молодих щурів, як контрольних, так і дослідних груп. Так на кінець досліду маса тіла 3-місячних щурів контрольної групи зросла на 74%, а експериментальної – на 96%. У 9-місячних тварин, як контрольної, так і дослідної групи, маса тіла за 28 днів експерименту суттєво не змінилася.

Маса печінки 3-місячних тварин, які отримували мелатонін, була нижчою на 16%, а 9-місячних – на 26% порівняно з контрольними групами (табл. 1).

Співвідношення між масою печінки і масою тіла (вказує скільки відсотків маса печінки становить від загальної маси тіла) у 3-місячних щурів, які отримували мелатонін, зменшилось на 15%, а 9-місячних – на 21% порівняно з контролем.

Таким чином, при введенні екзогенного мелатоніну маса печінки по відношенню до маси тіла знижується, як у молодих, так і дорослих щурів дослідних груп. У 9-місячних тварин зниження маси печінки проявляється інтенсивніше ніж у 3-місячних щурів.

Таблиця 1. Показники маси тіла та печінки молодих і дорослих щурів контрольних та досліджуваних груп, що отримували мелатонін протягом 28 днів експерименту ($M \pm m$, $n=8$)

Table 1. Indexes of mass body and liver of young and adult rats of control and explored groups, that received melatonin during 28 days experiment ($M \pm m$, $n=8$)

Показники	3 місячні щури		9 місячні щури	
	Контрольні тварини	Дослідні тварини	Контрольні тварини	Дослідні тварини
Маса тіла, г	$250,0 \pm 14,2$	$247,0 \pm 8,9$	$393,0 \pm 8,6$	$360,0 \pm 13,2$
Маса печінки, г	$9,8 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,9$	$11,4 \pm 0,7$	$8,4 \pm 0,3^*$
Співвідношення: маса печінки / маса тіла, %	3,9	3,3	2,9	2,3*

* $P < 0,05$ – вірогідність порівняно з контролем.

Загальна кількість клітин і кількість одноядерних гепатоцитів у 3-місячних щурів мала тенденцію до зниження. Кількість двоядерних клітин у молодих тварин вірогідно знизилась на 29% порівняно з контрольними даними, що може вказувати на присутність негативного зворотного зв'язку (рис. 1. А). У 9-місячних тварин загальна кількість і кількість одноядерних гепатоцитів вірогідно зросла на 17%, а двоядерних – на 30% порівняно з контролем (рис. 1. В).

За даними літературних джерел збільшення кількості гепатоцитів є характерною ознакою зростання інтенсивності регенераторних процесів у паренхімі печінки [4, 8, 9]. Для паренхіми печінки ссавців характерна наявність великої кількості двоядерних та багатоядерних клітин. Проте, у нау-

ковій літературі нема чіткого уявлення стосовно походження і долі двоядерних гепатоцитів, а також їх ролі в фізіологічній регенерації печінки. Найбільш поширена точка зору, що двоядерні клітини утворюються в результаті незакінченого мітозу чи аміотичного поділу [14]. Так, деякі дослідники відмічають зростання кількості двоядерних гепатоцитів при регенерації печінки [6, 8].

За нашими даними співвідношення двоядерні/одноядерні гепатоцити у I та III групах становило 5,1% і 7,2% відповідно. У досліджуваній II групі це співвідношення вірогідно знизилось до 3,7%, а в IV групі – зросло до 8%. Відстань між сусідніми ядрами гепатоцитів в обох дослідних групах мала тенденцію до зниження.

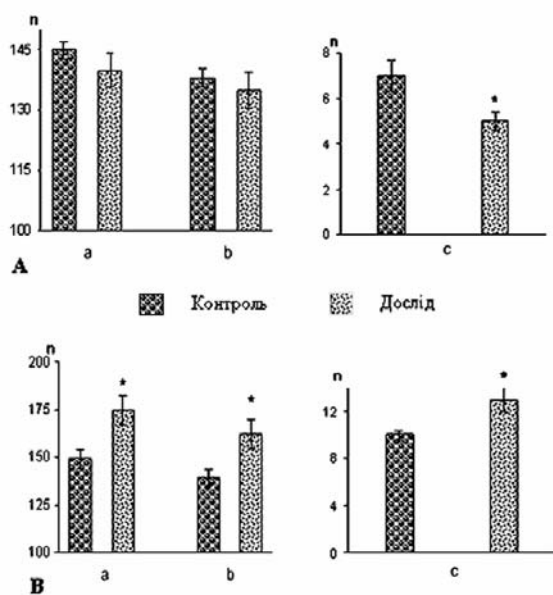


Рис. 1. Кількість гепатоцитів печінки 3 - (А) та 9-місячних шурів (В), що отримували мелатонін протягом 28 днів експерименту:

n – кількість гепатоцитів у полі зору мікроскопа при збільшенні в 400 разів;

a – загальна кількість гепатоцитів;

b – кількість одноядерних гепатоцитів;

c – кількість двоядерних гепатоцитів;

* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Fig. 1. Hepatocytes amount of 3- (A) and 9-monthly rats liver (B), that received melatonin during 28 days experiment:

n – hepatocytes amount in site of microscope vision with magnification of $\times 400$;

a – general hepatocytes amount;

b – mononuclear hepatocytes amount;

c – binuclear hepatocytes amount;

* – $P < 0,05$ comparatively with the control

Таблиця 2. Розміри гепатоцитів, їхніх ядер та цитоплазми печінки молодих і дорослих шурів, що отримували мелатонін протягом 28 днів експерименту ($M \pm m$, $n=8$)

Table 2. Sizes of hepatocytes, their nucleus and cytoplasm of liver of young and adult rats, that received melatonin during 28 days experiment ($M \pm m$, $n=8$)

Показники	3 місячні шури		9 місячні шури	
	Контрольні тварини	Дослідні тварини	Контрольні тварини	Дослідні тварини
Площа гепатоцита, μm^2	371,1 \pm 32,9	263,9 \pm 14,9*	313,2 \pm 38,1	205,5 \pm 18,6*
Площа ядра гепатоцита, μm^2	43,3 \pm 2,5	39,1 \pm 1,3	38,9 \pm 1,9	33,9 \pm 1,3
Площа цитоплазми, μm^2	328,7 \pm 26,9	217,4 \pm 14,5*	276,1 \pm 34,8	172,7 \pm 18*
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,13	0,18*	0,14	0,20*

За нашими даними, після введення екзогенного мелатоніну у вечірній час доби, збільшується кількість одноядерних та двоядерних гепатоцитів в паренхімі печінки дорослих шурів. Зростає ядерно-цитоплазматичне співвідношення, як у молодих, так і дорослих тварин, що вказує на відносне збільшення розмірів ядра, і може свідчити про підвищення функціональної активності та підготовку гепатоцита до мітозу. Тому, можна зробити висновок про те, що пероральне введення екзогенного мелатоніну,

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів є одним із важливих показників регенераторного стану паренхіми печінки. Площа гепатоцитів та їх цитоплазма, як у молодих, так і дорослих тварин, що отримували мелатонін вірогідно знижувалась. А саме у 3-місячних шурів, які отримували мелатонін, площа гепатоцита знизилась на 29%, а цитоплазми – на 34% порівняно з контролем. У 9-місячних тварин ці показники вірогідно зменшились на 34 і 37% відповідно. Площа ядра при цьому залишалась практично сталою (табл. 2). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення гепатоцитів 3- та 9-місячних шурів після введення мелатоніну вірогідно зросло на 38 та 43% відповідно, порівняно з даними контрольних груп. Це свідчить про відносне збільшення розмірів ядра.

Збільшення розмірів ядра є одним із проявів, як фізіологічної, так і репаративної регенерації паренхіми печінки. Зростання розміру ядра за трьома гіпотезами може свідчити про: 1 – підвищення функціональної активності клітини; 2 – підготовку клітини до мітозу, в результаті синтезу нуклеїнових кислот, білків тощо; 3 – збільшення плоідності гепатоцитів, так як у процесі регенерації збільшується кількість тетраплоїдних та октаплоїдних клітин [10].

Досить суперечливі дані містяться в літературі відносно дії мелатоніну на функціональну діяльність і регенерацію печінки. Отримання таких неоднозначних результатів, можливо, є наслідком використання в якості об'єкта експерименту різних видів тварин. Значну роль може мати вік тварин, час введення та доза мелатоніну. Так, Abbasoglu O. з співавторами вказує, що мелатонін стимулює регенерацію печінки, тоді ж як Антонова О. І. при введенні екзогенного мелатоніну тваринам не спостерігала змін інтенсивності регенерації печінки [2, 15].

протягом 28 днів, у дозі 1 мг/кг у період мінімуму його природного синтезу в організмі позитивно впливає на регенераторну здатність паренхіми печінки, як молодих, так і особливо дорослих тварин.

Висновки

Введення екзогенного мелатоніну, протягом 28 днів, у дозі 1 мг/кг у період мінімуму його природного синтезу в організмі, підвищує ядерно-цитоплазматичний індекс у печінці у молодих і дорослих шурів та збіль-

ше кількість одно- та двоядерних гепатоцитів у полі зору у 9-місячних тварин.

Екзогенний мелатонін, у дозі 1 мг/кг маси тіла (28 діб), підвищує інтенсивність фізіологічної ре-

генерації паренхіми печінки у дорослих щурів у більшій мірі, ніж у молодих тварин.

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Георгий Герасимович Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 385 с.
2. Антонова О. І. Морфологічні особливості печінки при довготривалому впливі мелатоніну / О. І. Антонова // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2007. – С. 128 – 132.
3. Волкова О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М.: Медицина, 1982. – 304 с.
4. Воробьева О. В. Влияние экспериментального цирроза печени у самок крыс на патологию и регенерацию печени у потомства: автореф. дисс. на присвоения науч. степени канд. мед наук: спец. 14.00.15 / О.В. Воробьева. – Ульяновск, 2007. – 23 с.
5. Дзержинський М. Е. Мелатонін в різний час доби по-різному впливає на морфофункціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-гонадного комплексу японських перепелів / М. Е. Дзержинський, І. М. Варенюк, Н. В. Фурса // Науковий вісник Львівської національної академії ветеринарної медицини імені С. З. Гжицького. – 2004. – Т.6, №1. – С. 162 – 167.
6. Карапетян А. Ф. О регенераторном потенциале печени озерной лягушки *RANA RIDIBUNDA* после частичной гепатэктомии / А. Ф. Карапетян, К. А. Дживанян // Цитология. – 2003 – Т. 48, № 4. – С. 346 – 354.
7. Малиновская Н. К. Роль мелатонина в организме человека / Н. К. Малиновская // Клини. медицина. – 1998. – №10. – С. 15 – 22.
8. 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 / М. Ю. Оболенська. – К., 1999. – 34 с.

Отримано: 20 березня 2009 р.

Прийнято до друку: 4 лютого 2010 р.