

УДК 615.47

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ГІСТОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ НЕСТАЧІ
ТА НАДЛИШКУ МЕЛАТОНІНУ НА СТАН ПЕЧІНКИ****О. І. Антонова, О. П. Міхальчук**Кременчуцький національний університет імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева, 20, м. Кременчук, 39600, Україна. E-mail: antonovaei@mail.ru

Надані результати комплексних гістологічних досліджень нестачі та надлишку мелатоніну на стан печінки. Експериментально обґрунтовано, що нестача мелатоніну здатна змінювати гістологічну картину тканини печінки. Здійснено комплексне гістологічне дослідження нестачі мелатоніну на морфологічну картину печінки при п'яти- та 55-тидобовій гіпомелатоніемії. Виявлено гістологічні зміни у тканині печінки при п'ятидобовій гіпомелатоніемії: збільшення мітотичного індексу та К-мітози; каріолізіс, фрагментацію хромосом і К-мітози при довготривалій, 55-ти добовій гіпомелатоніемії.

Ключові слова: стандартні методики, печінка, мелатонін, гістологічна картина.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕДОСТАТКА
И ИЗБЫТКА МЕЛАТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ****Е. И. Антонова, О. П. Михальчук**Кременчугский национальный университет имени Михаила Остроградского
ул. Первомайская, 20, г. Кременчуг, 39600, Украина. E-mail: antonovaei@mail.ru

Представлены результаты комплексных гистологических исследований недостатка и избытка мелатонина на состояние печени. Экспериментальные исследования показали, что недостаток мелатонина способен изменять гистологическую картину печени. Наибольшие изменения морфологии печени происходят при более длительном недостатке мелатонина при пяти- и 55-тисуточной гипомелатонинемии. Выявлены гистологические изменения в ткани печени при гипомелатонинемии: патологии митозов, К-митозы при пятисуточном недостатке мелатонина; кариолизис, фрагментация хромосом, К-митозы при длительной гипомелатонинемии.

Ключевые слова: стандартные методики, печень, мелатонин, гистологическая картина.

АКТУАЛЬНІСТЬ РОБОТИ. Однією з актуальних проблем експериментальних досліджень є одночасне використання стандартних біохімічних і гістологічних методик.

Свого часу були проведені біохімічні дослідження фізіологічних властивостей печінки за допомогою різної лабораторної апаратури [1]. Морфофункціогенез печінки при патологічних станах оцінювали за допомогою комплексу методик електрофорезу та гістологічних показників.

Печінка є важливим органом антиоксидантного захисту організму. Це пов'язано з тим, що печінка багата антиоксидантами – вітамінами Е, С, Р, РР, А, тіолами, ферментами – супероксиддисмутазою, пероксидазою, глутатіонпероксидазою, глутатіонредуктазою, глутатіонтрансферазою. Регуляція функцій печінки забезпечується низкою гормонів, серед яких знаходиться і мелатонін, до якого є рецептори у печінці, та на генному рівні активується синтез СОД, каталази, глутатіонпероксидази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [2]. Вивчення морфологічної картини печінки має велике значення в діагностиці, бо сприяє об'єктивності діагнозу, уточненню плану лікування, кількісному контролю ті визначенню вірогідної оцінки лікування.

Метою роботи є дослідження функціонального стану печінки при нестачі та надлишку мелатоніну за звичайних умов і за умов окислювального стресу за допомогою комплексу методик електрофорезу та гістологічних показників.

МАТЕРІАЛИ І РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Комплекс морфологічних методів дослідження допомагає виявити більш глибокі зміни ультраструктурної організації клітин печінки – гепатоцитів.

Для вирішення поставлених у роботі завдань були проведені три серії експериментальних досліджень на 81 тварині – щурах лінії Wistar.

Для того, щоб порівняти приведені раніше біохімічні показники з морфологічними перебудовами печінки, проводили гістологічні дослідження печінки [3]. Гістологічні зрізи печінки зафарбовували гематоксиліном та еозином за загальноприйнятою методикою [4].

Відомо, що основний спосіб розмноження клітин – ділення шляхом мітозу. Це найбільш доцільний спосіб репродукції, який забезпечує утворення генетично рівноцінних клітин у ряду клітинних поколінь. Усі неблагополучні чинники прямо або опосередковано впливають на процес збереження генетичного потенціалу в цілому.

З метою вивчення реакції печінкової тканини на нестачу та надлишок мелатоніну в групах експериментальних тварин ми визначали мітотичний індекс гепатоцитів, що має вираз у промілях, тобто кількість клітин, що діляться на одну тисячу всієї клітинної популяції. Крім цього, ми з'ясували наявність патологічних мітозів і розподіл фаз нормально перебігаючого мітозу.

Зразки тканин печінки відбирали відразу після забою тварин і готували тканинні антигени за стандартною методикою [4].

Із клітин печінки виділяли ДНК і методом електрофорезу досліджували процеси апоптозу.

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9

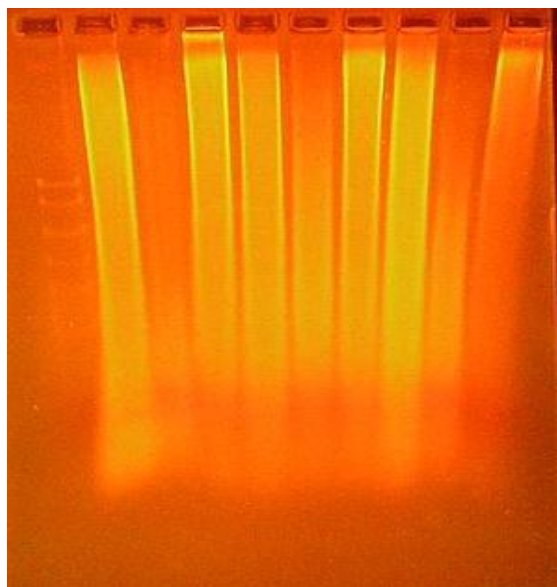


Рисунок 1 – Електрофорез зразків нативної ДНК з тканини печінки щурів (1 – норма, 4 – гіпофункція, 7 – гіперфункція) з часом електрофорезу 1,5 години

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9

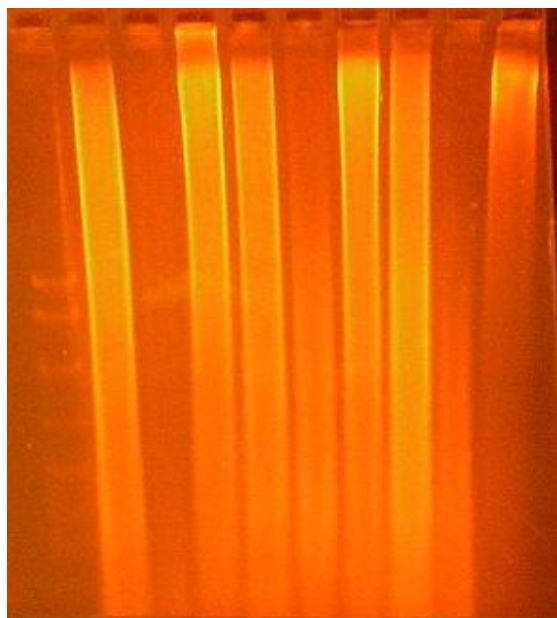


Рисунок 2 – Електрофорез зразків нативної ДНК з тканини печінки щурів (1 – норма, 4 – гіпофункція, 7 – гіперфункція) з часом електрофорезу три години

Електрофорез (при 1,5 і трьох годинах) виділеної з клітин печінки ДНК (рис. 1), як у контрольній гру-

пі під цифрою 1, так і в експериментальній групі при гіпомелатоніемії під цифрою 4 і гіпермелатоніемії під цифрою 7, не виявив розривів і фрагментів, що свідчить про відсутність апоптозу.

Якісне мікроскопічне вивчення матеріалу печінки проводили після фіксації шматочків тканини у 10 % розчині нейтрального формаліну, а також фіксатора Карнуа з наступною парафіноюю проводкою [4]. Зрізи зафарбовувалися гематоксиліном і еозином, пікрофуксином за Ван Гізон, на еластику – за способом Харта з дофарбуванням пікрофуксином, на глікоген – за способом Шабадша з ферментативним контролем амілазою, мукопротеїди – ШПК – реакція + альціановий синій.

Препарати оглядалися під мікроскопом, фотографувалися та описувалися структурні компоненти тканини печінки.

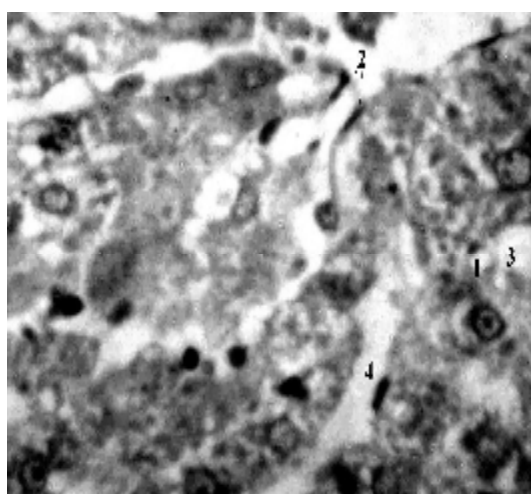


Рисунок 3 – Структура печінки у пацієнтів експериментальної групи (окр. пікрофуксином за Ван Гізон. Збільшення x 1000): 1–гепатоцит; 2–клітини Купфера; 3–синусоїд; 4–жовчна протока

Гістологічні дослідження печінки при нестачі мелатоніну виявили деякі зміни в її морфологічній структурі. У дослідній групі відзначено появлення патологічних мітозів у тканинах печінки. При підрахунку у 100 полів зору мікроскопу мітотичного індексу визначено, що він складав 4,5 проміле, що більше норми, яка становить 0,022 проміле. Від усіх мітозів 12,7 % склали патологічні, здебільшого репрезентовані К-мітозом. Останні пов'язані з ушкодженням хромосомного апарату та характеризуються нерозходженням центріолей, дезорганізацією мікротрубочок, затримкою розділення кінетохорів. Мікроскопічно гіперспіралізація хромосом виглядає, як їх потовщення та вкорочення, хромосоми зклеюються між собою, утворюючи комок кулеподібної метафази. При детальному вивченні гістологічних препаратів звертає на себе увагу той факт, що багато гепатоцитів утворюють поодинокі або багаточисельні фрагменти хромосом, які неупорядковано розсіяні по всій поверхні цитоплазми, а іноді зосереджені в області веретена поділу клітини. Вищеопи-

сана морфологічна картина характерна для патології мітозу, яка має назву відставання хромосом при розходженні. У нашому випадку вона спостерігалася у 1,7 % від усіх інших форм патології мітозів. Переважна більшість усіх форм відхилень від нормальноплинучого мітозу припадає на так звані К-мітози зі злипанням хромосом, який зустрічається в 2,1 % випадків. Ця форма патології характеризується наявністю гіперспіралізованих та утовщених хромосом, які злипаються між собою з утворенням щільного еозинофільного грудка, що займає більшу частину цитоплазми гепатоцитів.

Гістологічні дослідження інтактної печінки щурів з підвищеним споживанням мелатоніну не вказують на які-небудь суттєві відмінності, пов'язані з морфологічною будовою тканин печінки. Але в окремому препараті зазначалося осередкове повнокрів'я синусоїдів з елементами нерівноцінного їх кровонаповнення. Місцями посилювалася лімфогістіоцитарна та крупноклітинна інфільтрація центральної вени і триад. Навколо печінкових долей відмічався осередковий розвиток ніжноволокнистої сполучної тканини. Місцями зустрічаються двоядерні гепатоцити, особливо на периферії дольки. З вищеописаної гістологічної картини тканини печінки можна зробити висновок, що підвищені дози мелатоніну блокують мітози на рівні метафази, а збільшення кількості двоядерних гепатоцитів підтверджує активацію адаптивних

процесів у печінці під впливом мелатоніну, та посилюють антиоксидантний захист.

ВИСНОВКИ. Аналіз отриманих даних дозволив оцінити ефективність методик якісного мікроскопічного вивчення матеріалу печінки. Ці методики показали, що поряд із функціональними змінами відбуваються морфологічні перебудови печінки, і більш виразливі зміни при нестачі мелатоніну. В подальшому планується детально вивчити комплексні технології гістологічного та біохімічного дослідження печінки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антонова О.І. Вплив світла і часткового позбавлення сну на печінку // Вісник проблем біології та медицини. – 2006. – № 1. – С. 18–22.
2. Крауз Д.Н., Дубокович М.Л. Рецептори мелатоніну // Вісник революції у фармакології та токсикології. – 1991. – Вип. 31. – С. 549–568.
3. Антонова О.І. Аналіз методів комплексного дослідження нестачі та надлишку мелатоніну на стан печінки // Вісник Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського. – 2011. – № 6/2011 (71). – С. 235–238.
4. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Під ред. проф. І.П. Кайдашева. – Полтава: Полімет, 2003. – 319 с.

AN EXPERIMENTAL MODEL OF HISTOLOGIC STUDY OF INFLUENCE OF MELATONIN DEFICIENCY AND SURPLUS ON LIVER STATE

O. Antonova, O. Mihalchuk

Kremenchuk Mykhaylo Ostrohradskiy National University

vul. Pershotravneva, 20, Kremenchuk, 39600, Ukraine. E-mail: antonovaei@mail.ru

The article presents the results of complex histological studies of influence of melatonin deficiency and surplus on liver state. It is experimentally proved that the scarcity of melatonin can induce changes of histological state of liver. It is defined that maximum variations in metabolic processes and liver morphology occur when long-lasting melatonin deficiency, e.g. in case of five-day and 55-day melatonin deficiency. The experimental research reveals the following histological changes in liver tissue in hypomelatoninemia: mitoses pathology, k-mitoses on 5-day melatonin deficiency; karyolysis, chromosome fragmentation, and k-mitoses on long-lasting hypomelatoninemia.

Key words: standards methods, liver, melatonin, histological pattern.

REFERENCES

1. Antonova O.I. The influence of light and partial dream deprivation on liver // *Transactions of Problems of Biology and Medicine*. – 2006. – № 1. – PP. 18–22. [in Ukrainian]
2. Krause D.N., Dubocovich M.L. Melatonin receptors // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1991. – Vol. 31. – PP. 549 – 568. [in Ukrainian]
3. Antonova O.I. The analysis of the methods of complex research of melatonin lack and surplus on liver state // *Transactions of Kremenchuk Mykhailo Ostrohradskiy National University*. – 2011. – № 6/2011 (71). – PP. 235–238. [in Ukrainian]

4. *Methods of clinical and experimental researches in medicine* / Ed. by Prof. I.P. Kaydasheva. – Poltava: Polimet, 2003. – 319 p. [in Ukrainian]

Стаття надійшла 26.11.2012.

Рекомендована до друку
д.м.н., проф. Алфьоровим В.П.