

УДК 612.4:612.33:612.018.2

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ТКАНЕЙ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ПРИ НЕДОСТАТКЕ МЕЛАТОНИНА

Анаевич Я.Н.

*Николаевский национальный университет имени В.А. Сухомлинского,  
Николаев, e-mail: office@mdpu.edu.ua*

Проведен анализ влияния недостатка мелатонина на пролиферативную активность и протекание митоза в клетках тонкой кишки крыс. Показано, что при недостатке мелатонина подавляющее большинство клеток тонкой кишки находилось в состоянии митотического деления, среди которых большое количество было представлено патологическими митозами. На гистологических препаратах при недостатке мелатонина преобладала стадия метафазы митоза, которая наблюдалась почти в половине всех фаз и составляла 51,6% против 40,8% в контрольной группе. Основной патологией (16,7%) преимущественно был К-митоз со слипанием хромосом, на втором месте встречалась так называемая патология при расхождении хромосом (9,6%). Таким образом, опыт показал, что недостаток мелатонина резко увеличивает количество патологических митозов в клетках тонкой кишки крыс, что может указывать на появление злокачественных опухолей. Вместе с тем происходит увеличение пролиферативной активности в тонкой кишке крыс.

**Ключевые слова:** мелатонин, гипомелатонинемия, митоз, тонкая кишка

## MORPHOLOGICAL STATUS OF THE RAT SMALL INTESTINE TISSUE UNDER HYPOMELATONINEMIA

Anasevich Y.N.

*Mykolaiv National University after V.O. Sukhomlynsky, Nikolaev, e-mail: office@mdpu.edu.ua*

The analysis of the impact of hypomelatoninemia on the proliferative activity and occurrence of mitosis in cells of the small intestine of rats has shown that with a decrease of melatonin the vast majority of the cells of the small intestine were in a state of mitotic division, of which a large number were abnormal. On histological preparations under hypomelatoninemia the metaphase stage of mitosis dominated and was observed in almost half of all the nuclei, comprising 51,6%, against 40,8% in the control group. The basic abnormality (16,7%) manifested mainly as K-mitotic chromosome non-disjunctions, followed by chromosome segregation defects (9,6%). Thus, our data demonstrate that hypomelatoninemia dramatically increases the number of mitotic defects in the cells of the rat small intestine, which may indicate the increase in malignancy, apparently, as a result of the increase in the proliferative activity in the small intestine of rats.

**Keywords:** melatonin, hypomelatoninemia, mitosis, small intestine

Мелатонин – это сомногенный нейромедиатор, гормон-антиоксидант. Известно, что мелатонин является универсальным эндогенным адаптогеном, обладает антиоксидантными, иммуномодулирующими свойствами, а снижение его продукции при нарушении светового режима сопровождается признаками ускоренного старения и увеличением риска развития новообразований [3, 6, 10]. У взрослого человека за сутки синтезируется около 30 мг мелатонина, его концентрация в сыворотке крови ночью в 30 раз больше, чем днем, причем пик активности приходится на 2:00 ночи, его продукция подавляется при рецепции световой информации сетчатой оболочкой глаза [1].

Хотя основным источником мелатонина, циркулирующего в крови, является эпифиз, обнаружен и паракринный синтез мелатонина практически во всех органах и тканях: тимусе, желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), гонадах, соединительной ткани [9, 10]. В исследованиях на пинеалэктомированных животных продемонстрировано наличие мелатонина в органах желудочно-кишечного тракта [9]. Эти факты свиде-

тельствуют о синтезе мелатонина органами ЖКТ. Но даже на основании этих исследований можно считать, что мелатонин играет важную роль в физиологии ЖКТ и нарушение его секреции может быть причиной различных патологий органов. Высокий уровень мелатонина в организме подчеркивает его необходимость для жизнедеятельности человека. Мелатонин связывает свободные радикалы кислорода, одновременно запуская естественную систему антиоксидантной защиты супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Как антиоксидант мелатонин действует повсеместно, проникая через все биологические барьеры. В исследованиях *in vitro* было выявлено, что мелатонин обладает значительно большей антиоксидантной активностью в плане прерывания процессов перекисного окисления липидов и инактивации активных свободных радикалов  $\cdot\text{OH}$  и  $\text{ROO}\cdot$ , чем известные антиоксиданты [2, 3].

Большое значение уделяется прооксидантно-антиоксидантному балансу органов и организма в целом, системам защиты и повреждения, универсальной адаптации. А работ, касающихся влияния недостатка

мелатонина на морфологическую структуру ткани тонкой кишки, практически нет. Поэтому **целью нашего исследования** было выявление морфологических и митотических особенностей эпителиоцитов тонкой кишки крыс при недостатке мелатонина.

### Материалы и методы исследования

Исследования выполнены на половозрелых белых крысах-самцах линии Wistar массой 220–260 г. Животные были разделены на две группы и содержались в стандартных условиях вивария при постоянной температуре и влажности воздуха, свободном доступе к воде и пище. Первая группа – интактная, животные содержались при световом режиме: 12:00 темнота – 12:00 свет, сроком 30 суток. У второй группы была смоделирована гипомелатонинемия (недостаток мелатонина), животные содержались в режиме постоянно-го освещения (1000–1500 люкс) 30 суток [4].

Сезон исследования – поздняя весна, когда секреция мелатонина средняя между максимумом зимой и минимумом летом [7]. Животных выводили из эксперимента, осуществляя мгновенную декапитацию под кетаминным наркозом (40,0 мг/кг массы тела).

Материал для исследования получали путем изъятия части тонкой кишки после вскрытия. В дальнейшем кусочки фиксировали в развернутом виде на доске и окунали их в 10% раствор нейтрального формалина, проводили через батарею спиртов и заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические препараты изучались в световом микроскопе «OLYMPUS BX-50» при различных увеличениях объектива: x10, x20, x40, x100, и окуляр: 10х. Исследование митотического режима и состояние патологических митозов изучали согласно классификации И.А. Казанцевой [5]. Митозы клетки считали не менее чем в 100 полях зрения микроскопа для каждого гистологического препарата, митотический индекс выражали в промилле (%), то есть количество митозов на 1000 всех клеток. Спектр патологических митозов исследовали в зависимости от фаз нормально идущего митоза и определения ведущей фазы патологического митоза, которую выражали в процентном соотношении (%).

### Результаты исследования и их обсуждение

Как показывают результаты морфологического исследования в контрольной группе, стенки тонкой кишки имеют хорошо развитую слизистую, подслизистую и мышечную оболочки. Поверхность слизистой оболочки имеет неровный вид, благодаря хорошо развитой системе складок, ворсинок и крипт. В кишечных криптах преобладают камбиальные и стволовые клетки. Фигуры митоза преобладают в средней части крипт. Среди клеточных элементов преобладают слизистые энтероциты, клетки Панета и столбчатые энтероциты. Последние образуют так называемую щетиночную кайму. Бокаловидные клетки имеют хорошо развитое ядро, которое находится на базальном или апикальном крае клетки

в зависимости от секреторного состояния клетки. Собственная оболочка состоит из рыхлой соединительной ткани, в которой встречается небольшое количество фибробластов, макрофагов и других клеток ретикулоэндотелиальной системы. В подслизистой оболочке преобладают так называемые Брунеровские железы, занимают почти все поле зрения микроскопа. Они представляют собой сложные альвеолярно-трубчатые железы, основой которых являются слизистые glandулоциты. Мышечная оболочка выражена достаточно умеренно и состоит из небольшого количества параллельно расположенных гладких мышечных волокон. Кровеносные сосуды, преимущественно вены, встречаются во всех полях зрения микроскопа, имеют хорошее кровенаполнение. Во всех полях зрения микроскопа встречаются эпителиоциты, которые находятся в разных фазах нормально протекающего митоза. Митотический режим эпителия слизистого отдела тонкой кишки характеризовался достаточно высоким индексом и составлял от 5,5 до 7,8 промилле. Среди раздела фаз митоза в небольшом количестве наблюдалось преобладание метафаз митотического деления. Таким образом, морфологическое исследование в первой группе препаратов выявило умеренную митотическую активность энтероцитов тонкой кишки крыс, представленную всеми фазами митотического деления клеток (рис. 1).

При исследовании наличия отклонений от нормально идущего митоза в данной гистологической группе были обнаружены единичные формы патологии митозов. В небольшом количестве здесь наблюдались патология профазы митоза – мостики и задержка при расхождении хромосом. Кроме того, единичные патологии метафазы – К-митоз со слипанием хромосом. Последнее утверждение может свидетельствовать о физиологических процессах инволюции энтероцитов в тонкой кишке крыс.

Таким образом, в первой интактной группе стенки тонкой кишки имеют хорошо развитую слизистую, подслизистую и мышечную оболочки. Митотический режим эпителия слизистого отдела тонкой кишки характеризовался достаточно высоким индексом и составлял от 5,5 до 7,8%. Среди фаз митоза в небольшом количестве наблюдалось преобладание метафазы.

Несколько иначе представлен клеточное деление в подопытной группе крыс в которых была смоделирована гипомелатонинемия. Так, во всех полях зрения микроскопа встречались клетки, находившиеся в разных фазах митоза, характеризовались большой пролиферативной активностью (табл. 1).

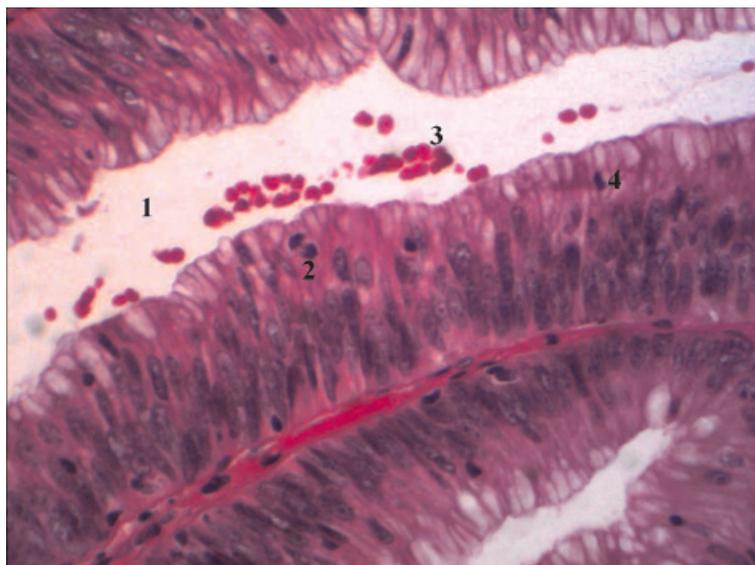


Рис. 1. Состояние тонкой кишки крыс в интактной группе:  
1 – полнокровные венулы; 2 – патология митоза – мостики; 3 – эритроциты; 4 – К-митоз со слипанием хромосом. Окраска: гематоксилин – эозин. Увеличение: об. 20х, ок. 15х

Таблица 1

Распределение фаз митоза в тонкой кишке крыс при недостатке мелатонина

Группа наблюдения	Митотический индекс (‰)	Профаза митоза* (%)	Метафаза митоза* (%)	Анафаза митоза* (%)	Телофаза митоза* (%)
Интактная группа	6,65	26,60	40,80	9,80	22,80
Гипомелатонинемия	22,31	22,50	51,60	10,60	15,40

Примечание. \* – по отношению к 100% клеток в состоянии деления.

Исходя из данных о распределении пролиферативной активности энтероцитов, митотический индекс при гипомелатонинемии составляет 22,32‰ против 6,65‰ в контрольной группе. Это свидетельствует о том, что недостаток мелатонина стимулирует пролиферативную активность в тонкой кишке крыс. Характерной особенностью было то, что почти все клетки находились в состоянии митотического деления (столбчатые, бокаловидные и недифференцированные стволовые энтероциты). Кишечные крипты и ворсинки имели несколько сглаженный вид за счет увеличения количества митотических недифференцированных клеток. В меньшей степени бокаловидные клетки производили слизь.

При изучении морфологических особенностей в группе, где был смоделирован недостаток мелатонина, при большом увеличении микроскопа нами были отмечены следующие особенности распределения энтероцитов. Клетки имели хорошо развитую цитоплазму, почти всю ее поверхность занимали хорошо контурируемые ядра. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в некоторых энтероцитах составляло 0,8-0,9. Гетерохроматин ядер

имел комковатый характер и располагался диффузно по всей ядерной оболочке. Ядрышки в количестве 1–2, а иногда и более, предпочтительно локализовались по периферии ядер. Большинство клеток находилось в состоянии митотического деления, среди которых большое количество было представлено патологическими митозами (табл. 2).

При недостатке мелатонина основной патологией (16,7%) преимущественно был К-митоз со слипанием хромосом, который характеризуется блокадой деления клеток в метафазе в результате повреждения митотического аппарата. Он представлен гиперспирализованными и утолщенными хромосомами, которые образуют плотный конгломерат – комок. На втором месте встречалась так называемая патология при расхождении хромосом (9,6%). Она характеризовалась неравномерным распределением хромосом в митотических центрах и задержкой при их попадании в дочерние клетки. Кроме этого, в незначительном количестве наблюдались так называемые мостики. Они были следствием фрагментации хромосом с образованием мостика, который задерживает и блокирует образование цитотомии (рис. 2).

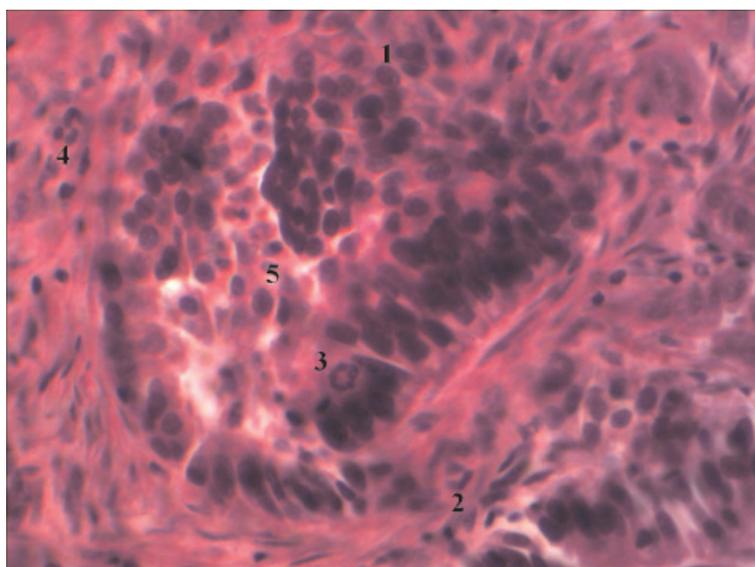
**Таблица 2**

Распределение патологических митозов в тонкой кишке крыс при гипомелатонинемии

№ п/п	Распределение патологических митозов	Количество (%)	
		Интактная группа	Гипомелатонинемия
1.	Отставание хромосом при расхождении*	2,08	9,60
2.	Мостики*	0,94	1,10
3.	Рассеивание хромосом*	0,12	0,90
4.	Трехгрупповая метафаза*	0,01	0,90
5.	Моноцентрический митоз*	0,10	4,00
6.	Асимметричный митоз*	0,07	0,90
7.	Многополюсный митоз*	0,08	3,20
8.	К-митоз*	2,42	16,70
9.	Общее количество патологических митозов**	5,82	36,70

**Примечания**

1. \* – это процент по отношению к общему количеству патологических митозов;
2. \*\* – это процент по отношению к 100% клеток в состоянии деления.



*Рис. 2. Основные формы патологии митозов в энтероцитах тонкой кишки крыс при недостатке мелатонина:*

- 1 – патология митоза в виде мостиков; 2 – отставание хромосом при расхождении; 3 – кольцевая метафаза; 4 – трехгрупповая метафаза; 5 – К-митоз со слипанием хромосом. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение. об. 40х, ок. 15х*

В группе животных, у которых был смоделирован недостаток мелатонина, митотический индекс составляет 22,32%. Характерной особенностью было то, что почти все клетки находились в состоянии митотического деления, на гистологических препаратах преобладала стадия метафазы митоза, которая наблюдалась почти в половине всех фаз и составляла 51,6%. Эти исследования подтверждают данные других авторов о том, что мелатонин способен контролировать клеточное деление и подавлять митоз клеток [8], вызывая задержку на стадии метафазы.

Анализ изучения патологических митозов показал, что основной патологией был К-митоз со слипанием хромосом. На втором месте встречалась так называемая задержка при расхождении хромосом. Кроме этого, в незначительном количестве наблюдались так называемые мостики. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии недостатка мелатонина на митотический цикл, так как резко увеличивается количество патологических митозов в клетках тонкой кишки крыс, что типично для злокачественных опухолей.

### Заключение

Недостаток мелатонина резко увеличивает количество патологических митозов в клетках тонкой кишки крыс, что может указывать на появление злокачественных опухолей. Вместе с тем происходит увеличение пролиферативной активности в клетках тонкой кишки крыс.

### Список литературы

1. Анисимов В.Н. Эпифиз и продукция мелатонина // Мелатонин в физиологии и патологии желудочно-кишечного тракта; под ред. акад. РАМН Ф.И. Комарова. – М.: Сов. спорт, 2000b. – С. 6–23.
2. Антонова О.І. Вплив хронічної гіпермелатоніемії на стан печінки шурів / Антонова О.І., Цебржинський О.І. // Вісник Луганського національного педагогічного університету імені Тараса Шевченка. – 2006. – № 13 (18). – С. 6–10.
3. Барабой В.А. Антиокислительная и биологическая активность мелатонина / Барабой В.А. // Укр. біохім. журнал. – 2000. – Т 72, № 3. – С. 5–11.
4. Гуралюк В.М. Стрес-індуковані морфофункціональні зміни надниркових залоз за різної довжини фотоперіоду: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. – Одеса, 2008. – 20 с.
5. Казанцева И.А. Патология митоза в опухолях человека. – Новосибирск: Наука, 1981. – 144 с.
6. Пішак В. П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації. – Чернівці, 2003. – 152 с.
7. Турчина С.И. Сезонные ритмы продукции мелатонина и иммунореактивности у здоровых детей / С.И. Турчина, Н.В. Шляхова // Всероссийская научно-практическая конференция 50 лет мелатонину: итоги и перспективы исследования: тезисы докладов. – СПб., 2008. – С. 41.
8. Anisimov V.N. Melatonin and colon carcinogenesis: Inhibitory effects of melatonin on development of intestinal tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski // Carcinogenesis. – 1997. – Vol. 18. – P. 1549–1453.
9. Bubenik G.A. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat: effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy // Horm. Res. – 1980. – Vol. 12. – P. 313–323.
10. Reiter R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Freals // News Physiol. Sci. – 2000. – Vol. 15. – P. 246–250.

### References

1. Anisimov V.N. *Epifiz i produkcija melatonina. V kn. Melatonin v fiziologii i patologii zheludochno-kishechnogo trakta* (Pineal gland and production of melatonin. In the book: Melatonin in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract). [Ed. Acad. RAMS F.I. Komarov]. Moscow, Sov. sport, 2000b, pp. 6–23.
2. Antonova O.I., Tsebrzhinskiy O.I. *Bulletin of Lugansk National Pedagogical University named after Taras Shevchenko*, 2006, no 13 (18), pp. 6–10.
3. Baraboy V.A. *Ukr. biohim. Journ.*, 2000, t.72, no 3, pp. 5–11.
4. Huraliuk V.M. *Authoref. cand. med. nauk*, 2008, Odessa, pp. 20.
5. Kazantseva I.A. *Nauka*, 1981, pp. 144.
6. Pishak V.P. *Shyshkopodibne tilo i biokhimichni osnovy adaptatsiyi* [Pineal body and the biochemical basis of adaptation]. Chernivtsi, 2003, pp. 152.
7. Turchyna S. I., Shlyakhova N.V. *Vserossyiskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya 50 let melatoninu: itogi i perspektivy* [All-Russian Scientific Conference 50 years of melatonin: results and prospects for future research]. St. Petersburg, 2008, p. 41.
8. Anisimov V.N. Melatonin and colon carcinogenesis: Inhibitory effects of melatonin on development of intestinal tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski // Carcinogenesis. 1997. Vol. 18. pp. 1549–1453.
9. Bubenik G.A. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat: effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy // Horm. Res. 1980. Vol. 12. pp. 313–323.
10. Reiter R.J. Melatonin: Lowering the High Price of Freals // News Physiol. Sci. 2000. Vol. 15. pp. 246–250.

### Рецензенты:

Шепитько В.И., д.м.н., профессор, Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава;  
 Цебржинский О.И., д.б.н., профессор, Полтавский национальный педагогический университет им. В.Г. Короленко, г. Полтава.  
 Работа поступила в редакцию 17.10.2013.