

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА МОРФОЛОГИЮ МИТОХОНДРИЙ И ДРУГИХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЕПАТОЦИТА

М. Н. Курбат (vwmisha@mail.ru), Р. И. Кравчук (rimma.kravchuk@yandex.ru), О. Б. Островская (astrowskaja@gmail.com)

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Введение. Мелатонин (Melatonin, N-acetyl-5-methoxy-tryptamine) – эндогенный индоламин, который синтезируется главным образом шишковидной железой и обладает выраженным антиоксидантным эффектом.

Цель исследования. Изучить особенности ультраструктуры печени при воздействии мелатонина.

Материал и методы. Препарат мелатонина вводили нелинейным крысам-самцам внутривенно в дозе 3 мг/кг/сутки на протяжении 14 суток. Осуществляли электронно-микроскопическое исследование образцов печени с морфометрией митохондрий.

Результаты. Мелатонин оказывает влияние на ультраструктурные компоненты гепатоцитов, в том числе изменяет митохондриальную динамику в направлении уменьшения размеров и разветвленности оргanelл, увеличения их численности при сохранности концентрации внутренних мембран митохондрий в клетке.

Заключение. Мелатонин оптимизирует ультраструктуру гепатоцитов крыс при сохранности морфологического состояния микрососудистого русла и желчевыводящей системы органа.

Ключевые слова: мелатонин, митохондрия, печень, ультраструктура.

EFFECT OF MELATONIN ON THE MORPHOLOGY OF MITOCHONDRIA AND OTHER CELLULAR COMPONENTS OF THE HEPATOCYTE

M. N. Kurbat, R. I. Kravchuk, A. B. Astrowskaja

Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

Background. Melatonin (N-acetyl-5-methoxy-tryptamine) is an endogenous indoleamine, which is synthesized mainly by the pineal gland and has a pronounced antioxidant effect.

Objective. To study the features of the ultrastructure of the liver exposed to melatonin.

Materials and methods. Melatonin was administered to nonlinear male rats intragastrically at a dose of 3 mg / kg / day for 14 days. An electron microscopic study of liver samples with mitochondrial morphometry was performed.

Results. Melatonin affects the ultrastructural components of hepatocytes, including changes in the mitochondrial dynamics towards reducing the size and branching of the organelles and increasing their numbers while maintaining the concentration of mitochondrial inner membranes in the cell.

Conclusion. Melatonin optimizes the ultrastructure of rat hepatocytes while preserving the morphological state of the microvascular bed and organ biliary system.

Keywords: melatonin, mitochondria, liver, ultrastructure.

Введение

Мелатонин (Melatonin, N-acetyl-5-methoxy-tryptamine) – эндогенный индоламин, который синтезируется главным образом шишковидной железой и обладает выраженным антиоксидантным эффектом. Печень активно аккумулирует мелатонин и является, по-видимому, единственным органом, где циркулирующий мелатонин метаболизируется, метаболиты также имеют выраженные антиоксидантные свойства. Препарат практически не проявляет токсичности и показывает хорошие результаты при коррекции ряда печеночных расстройств, в патогенезе которых ключевая роль принадлежит оксидативному стрессу [1]. Вместе с тем печеночные защитные влияния мелатонина связаны с его свойством регулировать различные молекулярные клеточные пути, такие как пролиферация, апоптоз, аутофагия, воспаление и онкогенез [1, 2]. При этом собственные эффекты препарат оказывает че-

рез взаимодействие с мелатониновыми рецепторами MT1 и MT2, которые экспрессируются в гепатоцитах, холангиоцитах и клетках экстрапеченочных билиарных путей [3].

Многочисленные исследования на животных свидетельствуют о способности мелатонина положительно влиять на повреждения печени, возникающие при моделировании широкого спектра патологических процессов, включая гепатиты разной этиологии, синдром ишемии-реперфузии печени, холестаза, печеночные стеатоз, фиброз, цирроз и карциноматоз [2-7]. Один из важных механизмов защитного влияния мелатонина при разного рода патологиях печени – его способность улучшать функциональное состояние митохондрий гепатоцитов через регуляцию проницаемости митохондриальных мембран, что ведет к увеличению депонирования Ca²⁺ и сдерживанию высвобождения цитохрома с и фосфодиэстеразы-1 (КФ 3.1.4.16, 2',3'-циклонуклеотид-2-фосфодиэстераза) [8, 9, 10]. В свою

очередь восстановление мелатонином трансмембранного митохондриального потенциала предотвращает в паренхиматозных клетках печени запуск запрограммированной клеточной гибели по митохондриальному пути [11].

Таким образом, в экспериментах на животных детально изучены биохимические пути и механизмы действия препарата, в то время как сведений о влиянии препарата на ультраструктуру интактной печени недостаточно.

Цель исследования – изучить особенности ультраструктуры печени при воздействии мелатонина.

Материал и методы

Исследование проведено на 10 белых нелинейных крысах-самцах массой $232,5 \pm 20,35$ г. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Крысам опытной группы внутривенно через зонд вводили суспензию препарата мелатонина («Меласон», производство ООО «Рубикон», Республика Беларусь) на 0,9% растворе натрия хлорида в дозе 3 мг/кг/сутки на протяжении 14 суток (группа «Мелатонин»). Контрольные животные получали внутривенно эквивалентное количество 0,9% раствора натрия хлорида. За 12 часов до забоя животных лишали пищи с сохранением воды в качестве источника питья.

Эксперимент выполнен с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными. Проведение исследования одобрено комитетом по биомедицинской этике учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет» (протокол № 2 от 06.01.2015 г.).

Ультраструктурное исследование проводили в образцах печени, фиксированных 1% раствором четырехоксида осмия (OsO_4 , «Fluca», USA) на 0,1M буфере Миллонига (натрий фосфорнокислый, «Анализ-Х», Беларусь, NaOH, «Stanlab», Poland), pH 7,4, при +40С в течение 2 часов. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в аралдитную смолу (Araldite, «Fluca», Germany). Из полученных блоков на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Germany) изготавливали полутонкие срезы (350 нм) и окрашивали метиленовым синим («Анализ-Х», Беларусь). Препараты просматривали в световом микроскопе (Leica, Germany) и выбирали участок для дальнейшего изучения ультраструктурных изменений. Ультратонкие срезы (35 нм) контрастировали 2% раствором уранилацетата (Uranyl, «MERCK», натрий лимоннокислый, «Анализ-Х», Беларусь) и цитратом свинца по E. S. Reynolds. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Japan) при увеличении 10 000-50 000 и ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовался

комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Germany) и программы iTEM (Version 5,0 (Build 1224); Serial Number A3766900-7E852FAB) для обработки изображений.

Для морфометрической оценки митохондриального аппарата в каждом препарате анализировали 20 непересекающихся полей зрения при увеличении 20 тыс. и 10 полей зрения при увеличении 50 тыс. (для расчета концентрации внутренних мембран митохондрий (КВММ)).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q). Оценку распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные представлены в виде медианы (Me) и 25-75% интерквартильного интервала.

Результаты и обсуждение

На светооптическом уровне гистоархитектоника печеночной ткани животных, получавших мелатонин, соответствовала структуре печени контрольных крыс. Цитоплазма гепатоцитов во всех ацинусах отличалась однородностью окрашивания. Вокруг части портальных трактов наблюдалась незначительная инфильтрированность лимфоцитарно-макрофагальными клеточными элементами. Как и в печени контрольных животных, в разных участках дольки регистрировались единичные мелкие очаги внутривенной воспалительной реакции, состоящие из 7-10 элементов, преимущественно круглоклеточных. Выявлялись многочисленные двуядерные гепатоциты. Синусоидные капилляры были в норме. Митотическая активность находилась на уровне показателей контрольных крыс и составляла 0,026%.

Электронно-микроскопическое изучение печени крыс, получавших мелатонин, свидетельствовало о положительном влиянии этого препарата на структурное состояние органа. Все гепатоциты отличались одинаковой умеренной электронной плотностью цитоплазмы (рис. 1). Данное обстоятельство может свидетельствовать о равномерном морфофункциональном состоянии гепатоцитов в пределах ацинуса.

Ядра локализовались в центре гепатоцитов, в большинстве клеток отличались овальной формой, содержали преимущественно эухроматин, с незначительной периферической концентрацией гетерохроматина, как правило, крупное, часто эксцентрично локализованное ядрышко с преобладанием гранулярного компонента. В кариолемме выявлялись отчетливые широкие поры. Подобное состояние ядерного аппарата оценивается как активное.

Заслуживало внимания ультраструктурное состояние митохондрий. Митохондрии локализовались в клетках диффузно, не образуя скоплений (рис. 1). Органеллы отличались преи-

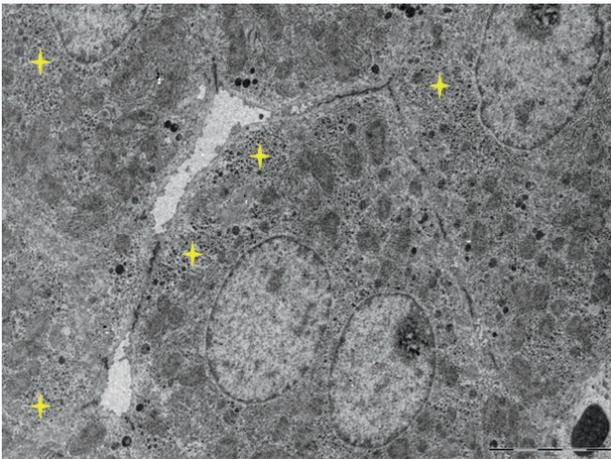


Рисунок 1. – «Мелатонин». Гепатоциты. Первая зона ацинуса. Звездочки – поля гликогеновых включений. ×5000

мущественно овальной и бобовидной формой, умеренно электронно-плотным матриксом, многочисленными, четкими, радиально ориентированными кристами с нерасширенными интракристными промежутками (рис. 2). Подобное состояние митохондрий соответствует их оптимальному биосинтетическому и биоэнергетическому потенциалу и структурной организованности. У контрольных животных митохондрии отличались большим полиморфизмом и чаще – неупорядоченной ориентацией крист (рис. 3).

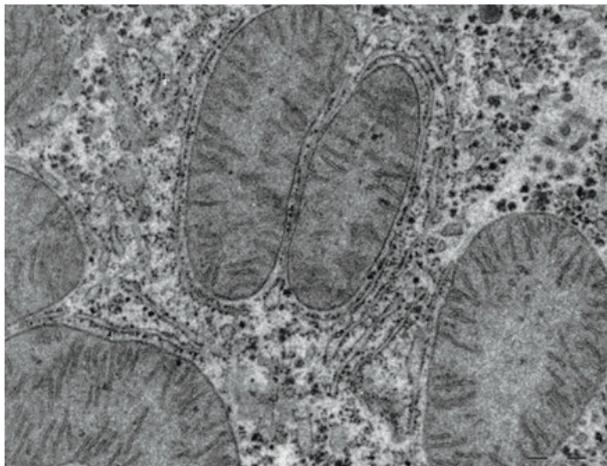


Рисунок 2. – «Мелатонин». Овальная и бобовидная форма митохондрий с кристами, ориентированными радиально. ×40 000

Среди основной популяции митохондрий находились гантелеобразные формы, которые принято расценивать как предшествующие их делению. Встречались разветвленные митохондрии (рис. 4), которые либо являются результатом слияния органелл, либо это естественная форма митохондрий, от которых отпочковываются фрагменты с формированием новых органелл, что определяет митохондриальную динамику в клетках (баланс между слиянием и делением) [12].

При этом, если в контроле в некоторых гепатоцитах обнаруживались единичные набухшие

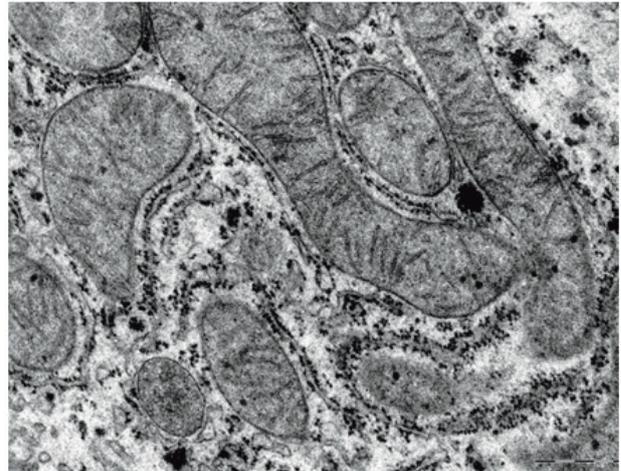


Рисунок 3. – «Контроль». Полиморфизм митохондрий. Кристы ориентированы либо поперечно длинной оси органелл, либо неупорядоченно. ×40 000

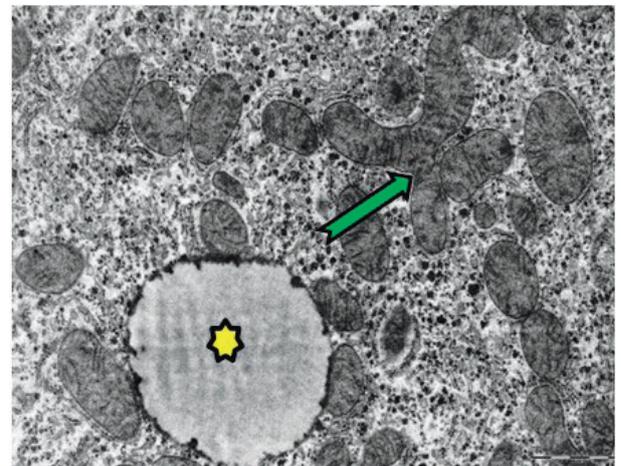


Рисунок 4. – «Мелатонин». Митохондрия, имеющая разветвленную форму (стрелка). Тесный контакт митохондрий с липидной каплей (звездочка). ×20 000

митохондрии, содержащие электронно-светлый матриксы и укороченные кристы (рис. 5), то при введении мелатонина такие органеллы не обнаруживались.

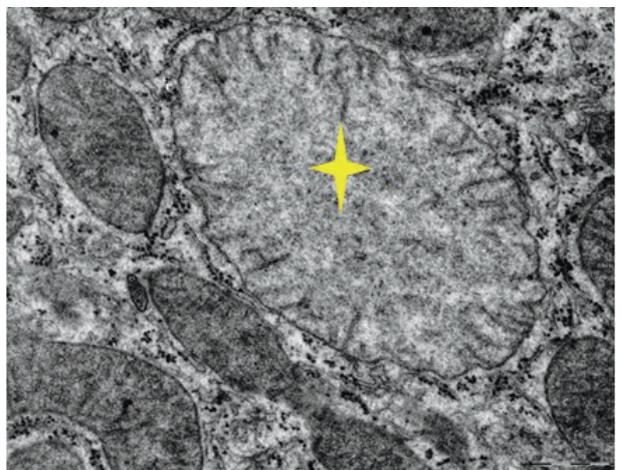


Рисунок 5. – «Контроль». Митохондрия, содержащая электронно-светлый матриксы и укороченные кристы. ×40 000

Для оценки морфофункционального состояния митохондриального аппарата проведено морфометрическое исследование (таблица).

Морфометрические показатели согласуются с представленными выше визуальными наблюдениями. Так, достоверное увеличение показателя фактора формы, который определяет степень митохондриальных разветвлений, свидетельствует о возрастании «компактности» органелл. Одновременно достоверно уменьшались средний периметр, площадь (тенденция), а также средний и максимальный диаметры одной митохондрии. Однако это не привело к снижению концентрации внутренних мембран митохондрий на единице площади цитоплазмы (КВММ), что, по-видимому, связано с увеличением количества Мх в единице объема цитоплазмы, а также с возрастанием количества и суммарной длины крист в одной органелле.

В перипортальной области (первой зоне ацинуса) отчетливой, параллельной упорядоченностью цистерн характеризовалась хорошо развитая гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС), содержащая многочисленные связанные рибосомы (рис. 6). Цистерны ГрЭС находились в тесном контакте с митохондриями. У контрольных животных ГрЭС также хорошо развита, но отличалась меньшей параллельной упорядоченностью цистерн (рис. 7).

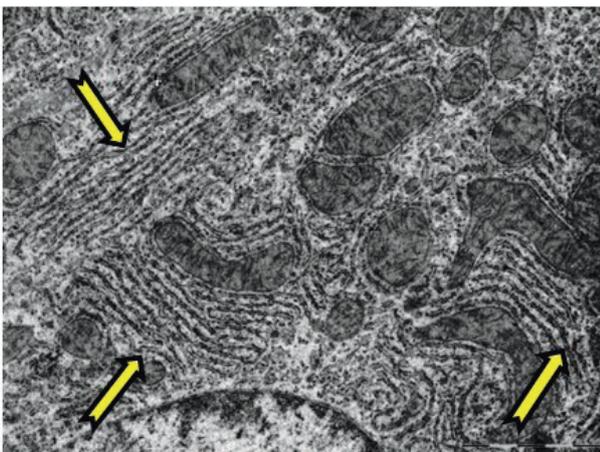


Рисунок 6. – «Мелатонин». Отчетливая параллельная упорядоченность цистерн хорошо развитой ГрЭС. ×15 000

На билиарном полюсе гепатоцитов локализовались одна-две диктиосомы умеренно развитого комплекса Гольджи, состоящего из 3-4 параллельных цистерн, нескольких конче-

Таблица – Морфометрические параметры митохондрий (Мх) гепатоцитов (Ме [LQ; UQ])

Морфометрические параметры	Контроль (n=5)	Мелатонин (n=5)
Средняя суммарная площадь сечений Мх на 100 мкм ² цитоплазмы, мкм ²	24,9 [23,0; 29,1]	22,8 [22,1; 23,0]
Среднее количество Мх/100мкм ² , шт.	68,8 [67,7; 75,0]	80,4 [66,2; 85,3]
Area (средняя площадь сечения одной Мх), мкм ²	0,38 [0,33; 0,43]	0,28 [0,26; 0,33]#
Perimeter (средний периметр одной Мх), мкм	2,49 [2,36; 2,60]	2,13 [2,04; 2,24]*
Aspect Ratio (соотношение сторон)	1,82 [1,77; 1,83]	1,74 [1,65; 1,81]
Elongation (фактор элонгации)	1,89 [1,83; 1,90]	1,78 [1,69; 1,86]
Gray Value Mean (средняя относит. электронная плотность Мх)	120,0 [105,1; 25,0]	104,5 [102,0; 106,6]
ECD (диаметр эквивалентного круга)	0,67 [0,62; 0,69]	0,57 [0,55; 0,61]*
Diameter Max	0,93 [0,90; 0,96]	0,80 [0,77; 0,83]*
Diameter Min	0,55 [0,49; 0,57]	0,45 [0,45; 0,49]#
Diameter Mean	0,81 [0,79; 0,85]	0,70 [0,67; 0,74]*
Sphericity (сферичность)	0,38 [0,37; 0,38]	0,42 [0,37; 0,43]
Shape Factor (фактор формы)	0,76 [0,74; 0,76]	0,78 [0,76; 0,78]*
Средняя суммарная длина крист в 1 Мх, мкм	1,01 [0,99; 1,19]	1,62 [1,22; 2,23]
Среднее кол-во крист в 1 Мх, шт.	6,3 [6,2; 7,2]	8,4 [7,6; 15,9]
Средняя длина 1 кристы, мкм	0,166 [0,162; 0,182]	0,160 [0,149; 0,169]
КВММ, мкм ⁻¹	19,0 [16,0; 20,3]	20,5 [20,2; 20,8]

Примечание: * - достоверные различия по сравнению с контролем (p<0,05); # - тенденция к достоверности различия по сравнению с контролем (p<0,1)

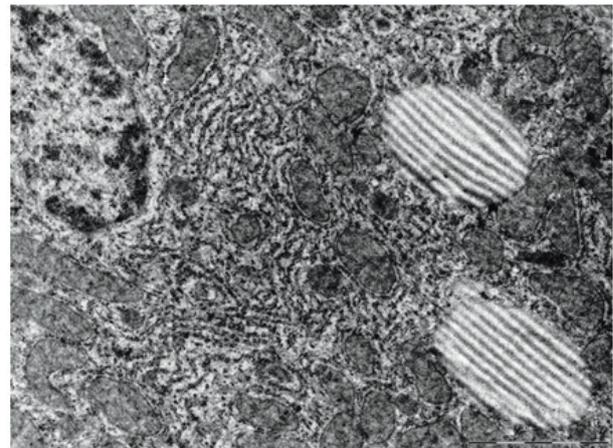


Рисунок 7. – «Контроль». Хорошо развитая ГрЭС, отличающаяся меньшей параллельной упорядоченностью цистерн. ×15 000

вых мешочков и секреторных вакуолей (рис. 8), в то время как у контрольных животных в составе пластинчатого комплекса часто регистрировалось большее число секреторных вакуолей, отличавшихся и более крупными размерами (рис. 9). На билиарном полюсе наблюдались в умеренном числе первичные и вторичные лизосомы, иногда, также как и в контроле, регистрировалось их некоторое скопление. Желчные каналцы не расширены, содержали многочисленные микроворсинки и характеризовались нормальной ультраструктурой специализированных межклеточных соединений. Желчные протоки были сформированы эпителиоцитами, имеющими типичную кубическую форму.

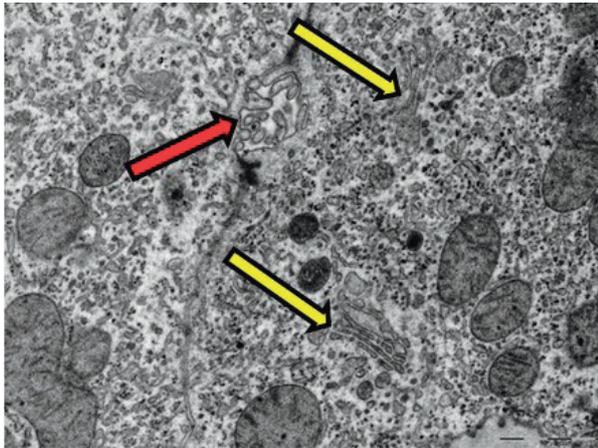


Рисунок 8. – «Мелатонин». Диктиосомы умеренно развитого комплекса Гольджи, состоящего из 3-4 параллельных цистерн, нескольких концевых мешочков и секреторных вакуолей (желтые стрелки). Желчный каналец – красная стрелка. $\times 25\ 000$

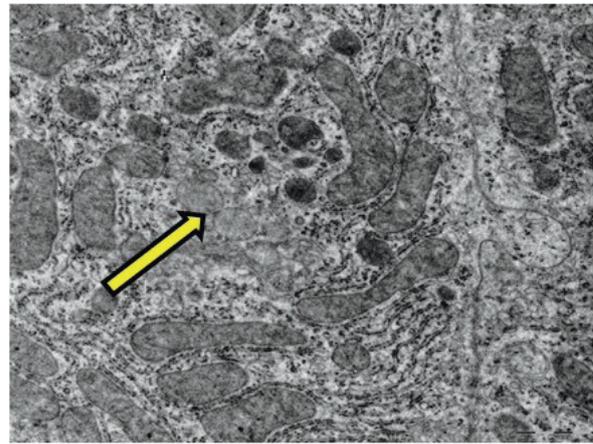


Рисунок 9 – «Контроль». Диктиосома пластинчатого комплекса, в составе которого – несколько крупных секреторных вакуолей. $\times 20\ 000$

Практически все гепатоциты содержали многочисленные розетки гликогена, локализованные диффузно, в части гепатоцитов формирующие гликогеновые поля с большей концентрацией последних на билиарном полюсе клеток (рис. 1). Липидные включения были единичными и встречались реже, чем в контроле.

Структурные элементы микрососудистой системы соответствовали норме. В просветах синусоидных капилляров, как и в печени контрольных животных, местами выявлялись мелкие очаги круглоклеточных элементов, в составе которых обнаруживались клетки Купффера с плотными

тельцами (лизосомами) и поглощенными, отжившими свой срок, эритроцитами. Обнаруживались единичные клетки Ито, находящиеся в разном функциональном состоянии, однако фиброзные изменения в печени не регистрировались.

Выводы

Электронно-микроскопическая характеристика печени крыс, получавших мелатонин, свидетельствует об оптимизации ультраструктуры гепатоцитов мелатонином при сохранности морфологического состояния микрососудистого русла и желчевыводящей системы органа.

References

- Mortezaee K, Khanlarkhani N. Melatonin application in targeting oxidative-induced liver injuries: A review. *J. Cell. Physiol.* 2018;233(5):4015-4032. doi: 10.1002/jcp.26209.
- Zhang JJ, Meng X, Li Y, Zhou Y, Xu DP, Li S, Li HB. Effects of Melatonin on Liver Injuries and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(4):E673. doi: 10.3390/ijms18040673.
- Glaser S, Han Y, Francis H, Alpini G. Melatonin regulation of biliary functions. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014;3(1):35-43. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2013.10.04.
- Bonomini F, Borsani E, Favero G, Rodella LF, Rezzani R. Dietary Melatonin Supplementation Could Be a Promising Preventing/Therapeutic Approach for a Variety of Liver Diseases. *Nutrients.* 2018;10(9):E1135. doi: 10.3390/nu10091135.
- Chojnacki C, Walecka-Kapica E, Romanowski M, Chojnacki J, Klupinska G. Protective role of melatonin in liver damage. *Curr. Pharm. Des.* 2014;20(30):4828-4833.
- Esteban-Zubero E, Alatorre-Jiménez MA, López-Pingarrón L, Reyes-Gonzales MC, Almeida-Souza P, Cantín-Golet A, Ruiz-Ruiz FJ, Tan DX, García JJ, Reiter RJ. Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage: A review. *Pharmacol. Res.* 2016;105:108-120. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.018.
- Li Y, Yang Y, Feng Y, Yan J, Fan C, Jiang S, Qu Y. A review of melatonin in hepatic ischemia/reperfusion injury and clinical liver disease. *Ann. Med.* 2014;46(7):503-511. doi: 10.3109/07853890.2014.934275.
- Baburina Y, Odinkova I, Azarashvili T, Akatov V, Lemasters JJ, Krestinina O. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase as a messenger of protection of the mitochondrial function during melatonin treatment in aging. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2017;1859(1):94-103. doi: 10.1016/j.bbmem.2016.11.003.
- Ma Z, Xin Z, Di W, Yan X, Li X, Reiter RJ, Yang Y. Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 2017;74(21):3989-3998. doi: 10.1007/s00018-017-2618-6.
- Guo P, Pi H, Xu S, Zhang L, Li Y, Li M, Cao Z, Tian L, Xie J, Li R, He M, Lu Y, Liu C, Duan W, Yu Z, Zhou Z. Melatonin improves mitochondrial function by promoting MT1/SIRT1/PGC-1 alpha-dependent mitochondrial biogenesis in cadmium-induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicol. Sci.* 2014;142(1):182-195. doi: 10.1093/toxsci/kfu164.
- Guha M, Maity P, Choubey V, Mitra K, Reiter RJ, Bandyopadhyay U. Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *J. Pineal Res.* 2007;43(4):372-381. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00488.x.
- Galloway CA, Lee H, Yoon Y. Mitochondrial morphology – emerging role in bioenergetics. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;12(53):2218-2228. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.035.