

© М. Л. Чуркова, 2019  
УДК 611.34.018.73:612.826.33.015.22:599.323.4

*М. Л. Чуркова*

## РЕАКЦИЯ ЭНДОКРИНОЦИТОВ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ КИШКИ КРЫС НА ВВЕДЕНИЕ МЕЛАТОНИНА

Кафедра медицинской биологии (зав. — проф. С. В. Костюкевич), ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России

**Цель** — изучить содержание эндокриноцитов в эпителии слизистой оболочки кишки при введении крысам разных доз мелатонина.

**Материал и методы.** Исследовано количество аргирофильных, аргентаффинных, серотонин-иммунореактивных клеток эпителия двенадцатиперстной, ободочной и прямой кишки у 30 крыс Вистар, разделенных на 3 группы в соответствии с введением 1, 20 или 100 терапевтических доз мелатонина.

**Результаты.** Установлено, что введение разных доз мелатонина вызывает в эпителии слизистой оболочки изучаемых отделов кишки увеличение числа аргирофильных, аргентаффинных, серотонин-иммунореактивных клеток. Выявлены изменения со стороны стенки кишки: укорочение кишечных ворсинок двенадцатиперстной кишки и складок ободочной кишки, увеличение глубины крипт прямой кишки.

**Выводы.** Обнаруженные изменения свидетельствуют о развитии адаптивной реакции эпителия, в том числе эндокриноцитов, на экспериментальное введение мелатонина.

**Ключевые слова:** *эндокриноциты, слизистая оболочка, кишка, крыса, мелатонин*

Эндокриноциты (ЭНК) эпителия слизистой оболочки органов пищеварительной системы, в частности кишки, вырабатывают большой спектр гормонов и биологически активных веществ [5]. Было показано, что экспериментальное воздействие на организм животного может приводить к морфологическим перестройкам эндокринного аппарата эпителия. При воздействии различных факторов на эпителий слизистой оболочки кишки наблюдается изменение количественного содержания ЭНК. Например, у животных при изменении диеты или голодании, воздействии высокоинтенсивного импульсного магнитного поля или введении декстрансульфата натрия наблюдается увеличение числа эндокриноцитов кишки [1, 3, 6, 7, 9], что свидетельствует о включении компонентов эндокринного аппарата в реакцию эпителия слизистой оболочки органов пищеварения на действующие факторы [3].

Мелатонинсодержащие лекарственные фармакологические препараты используются в медицине для нормализации циклов «сон—бодрствование», а также при лечении заболеваний органов пищеварения [2, 10]. В эксперименте на крысах показано, что разные дозы мелатонина (1–10 или 100–1000 мг/кг) влияют на моторику двенадцатиперстной кишки крыс [8, 12]. Эндокринные ЕС-клетки эпителия слизистой оболочки орга-

нов пищеварения, в том числе кишки, в норме вырабатывают мелатонин [5]. Обычно мелатонинсодержащие препараты принимают в течение длительного времени, однако данных в опубликованной литературе о хроническом воздействии (в течение 1 мес) терапевтической дозы и более высоких доз на эндокринный аппарат эпителия слизистой оболочки органов пищеварения в настоящее время нет.

Цель настоящего исследования — оценить при помощи гистологических и количественных методов количественное содержание эндокриноцитов в эпителии слизистой оболочки двенадцатиперстной, ободочной и прямой кишки при введении крысам разных доз мелатонина.

**Материал и методы.** Исследование проводилось по типу аналитического на биологических моделях при экспериментальном воздействии на 30 половозрелых крысах-самцах линии Вистар. Протоколы опытов одобрены локальным этическим комитетом СЗГМУ им. И. И. Мечникова (протокол № 12 от 10.12.2014 г.) и соответствуют биоэтическим принципам. Все манипуляции выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР), «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ от 2003 г. № 267). Для исследования сформировали 3 группы по 5 крыс в каждой. Препарат «Мелаксен» (раствор мелатонина, МТ) вводили с помощью внутрижелудочного зонда. В 1-й группе исследования мелатонин вводили в течение 1 мес по 1 тера-

### Сведения об авторах:

Чуркова Мария Леонидовна (e-mail: [mariya.churkova@szgmu.ru](mailto:mariya.churkova@szgmu.ru)), кафедра медицинской биологии, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47, 9 пав.

певтической дозе (MT1), во 2-й группе — в течение 1 мес по 20 терапевтических доз (MT20), в 3-й группе — однократно по 100 терапевтических доз (MT100). Одна терапевтическая доза определялась из расчета 0,5 мг/кг массы тела животного. Кратность введения и дозы MT выбраны исходя из клинических рекомендаций использования данного лекарственного препарата. Стократная доза выбрана для демонстрации негативного воздействия лекарственного препарата (отравления) при суициде. Для каждой группы экспериментальных животных была сформирована группа контроля (всего — 3 группы по 5 крыс), получавшая количество изотонического раствора NaCl, равное по объему изучаемому препарату (15 крыс).

На следующие сутки после окончания опыта крыс ингаляционно усыпляли раствором фторотана (0,5 %), затем проводили эвтаназию путем декапитации. Для светооптического исследования забирали образцы двенадцатиперстной, ободочной, прямой кишки ( $n=90$ ), которые подвергали стандартной гистологической обработке. Изучение материала проводили методами световой микроскопии с последующей морфометрией на гистологических препаратах. Поперечные срезы для обзорного изучения эпителия окрашивали гематоксилином Майера с докраской эозином. Для выявления ЭНК использовали импрегнацию серебром по методам Гримелиуса (для выявления аргирофильных клеток) и Массона—Гамперля в модификации Синга (для выявления аргентаффиновых клеток). Также проводили иммуногистохимическое определение ЭНК, продуцирующих серотонин (серотонин-иммунореактивные клетки (СИР-клетки), используя поликлональные кроличьи антитела против серотонина (1:150, NovoCastra, Великобритания) и вторичные антитела и реагенты — реактивы из набора LSAB2 (DAKO, Дания).

В изучаемых образцах определяли количественное содержание аргирофильных, аргентаффиновых и серотонин-иммунореактивных клеток. ЭНК подсчитывали с помощью окулярной морфометрической сетки в 100 полях зрения и относили к 1 мм<sup>2</sup> поверхности среза эпителия слизистой оболочки кишки. Использовали микроскоп Биомед 6 (Ломо, Россия); об. 40, ок. 7, окулярную морфометрическую сетку с шагом 10 мкм, увеличением 7 (Ломо, Россия). С помощью морфометрической сетки определяли длину кишечных ворсинок двенадцатиперстной кишки, ширину и высоту складок ободочной кишки, глубину крипт изучаемых отделов кишки. Морфометрические измерения проводили на 5–10 срезах с различных стекол в каждой группе исследования.

Статистическая обработка была осуществлена с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Для всех данных была применена описательная статистика (критерий Манна—Уитни). Различия считали значимыми при  $p<0,05$ .

**Результаты исследования.** При хроническом (MT1, MT20) и остром (MT100) введении мелатонина у экспериментальных животных были выявлены структурные изменения стенки кишки. В двенадцатиперстной кишке крыс введение препарата приводило к уменьшению высоты кишечных ворсинок (от 29 до 42 % в разных группах исследования). При введении MT1 она составляла в среднем  $238\pm 13,56$  мкм, при MT20 —  $204\pm 19,65$  мкм, при MT100 —  $248\pm 13,56$  мкм, в контрольных группах —  $350\pm 21$  мкм. Для ободочной кишки у подопытных животных также

было характерно уменьшение высоты складок (более чем на 20 % в разных группах исследования): при введении MT1 —  $458\pm 22$  мкм, при MT20 —  $188\pm 28,88$  мкм, при MT100 —  $426\pm 10,77$  мкм, в контроле —  $534\pm 28,57$  мкм. В прямой кишке наблюдалось увеличение глубины крипт (от 55 до 62 % в разных группах исследования): при введении MT1 —  $9,42\pm 4,78$  мкм, при MT20 —  $14,40\pm 1,12$  мкм, при MT100 —  $13,8\pm 0,4$  мкм, в контроле —  $8,88\pm 0,9$  мкм.

ЭНК располагались в эпителии слизистой оболочки двенадцатиперстной, ободочной и прямой кишки преимущественно в глубине кишечных крипт, а в двенадцатиперстной кишке — в основании кишечных ворсинок. По форме эндокриноциты у подопытных крыс не отличались от ЭНК у контрольных крыс.

Общая популяция ЭНК, выявленная в эпителии слизистой оболочки двенадцатиперстной, ободочной и прямой кишки по методу Гримелиуса (аргирофильные клетки, *рис. 1*), в хронических опытах с введением MT1 и MT20 была увеличена по сравнению с контролем на 24–76 % в разных группах исследования. При введении MT100 в изучаемых отделах кишки отмечалась разная реакция ЭНК на вводимое вещество. В двенадцатиперстной кишке число аргирофильных клеток было уменьшено на 25 %, в эпителии ободочной кишки — сопоставимо с показателями у контрольных крыс, тогда как в прямой кишке число данных клеток было выше контроля на 38 %.

Количественное содержание аргентаффиновых клеток, вырабатывающих серотонин и мелатонин и выявленных по методу Массона—Гамперля (см. *рис. 1*), в изучаемых отделах кишки у экспериментальных животных было выше, чем у контрольных особей. При хроническом введении MT1 и MT20 было отмечено значимое повышение их относительного содержания от 24 до 48 % по разным отделам кишки. В остром опыте с MT100 наблюдалась тенденция к увеличению числа аргентаффиновых клеток в изучаемых отделах кишки.

Исходя из того, что мелатонин тесно связан с серотониновым обменом, и в норме оба гормона вырабатываются ЕС-клетками (аргентаффиновые клетки), было проанализировано число серотонин-иммунореактивных клеток (СИР-клеток, *рис. 2*) в эпителии у подопытных крыс.

У контрольных животных, получавших изотонический раствор NaCl, число серотонин-иммунореактивных клеток во всех отделах кишки было сопоставимо с числом аргентаффиновых клеток (см. *рис. 1*). У подопытных крыс наблюдалось преимущественно значимое повышение числа серотонин-иммунореактивных клеток

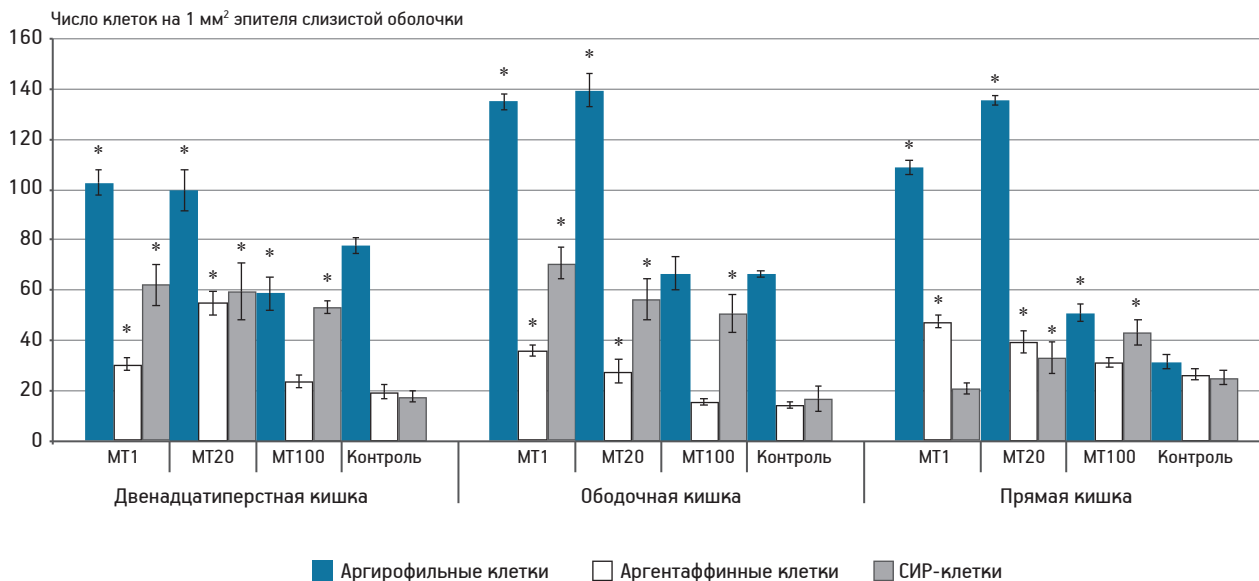


Рис. 1. Распределение аргирофильных, аргентаффиновых и СИР-клеток (серотонин-иммунореактивных клеток) в эпителии слизистой оболочки двенадцатиперстной, ободочной и прямой кишки крыс при введении мелатонина.

MT1 — при введении мелатонина в течение 1 мес по 1 терапевтической дозе; MT20 — при введении мелатонина в течение 1 мес по 20 терапевтических доз; MT100 — при однократном введении 100 терапевтических доз мелатонина.

\* Различия по сравнению с показателями в контрольной группе значимы при  $p < 0,05$ . Вертикальные отрезки — значения стандартной ошибки

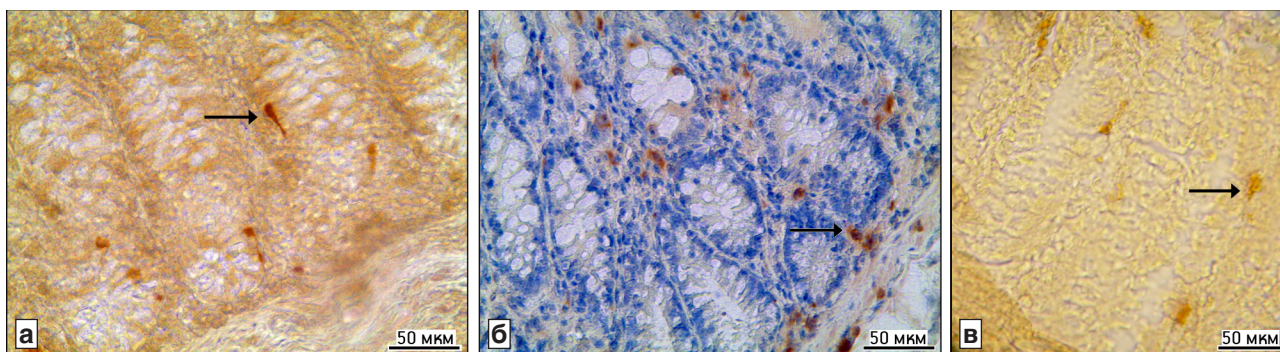


Рис. 2. Серотонин-иммунореактивные клетки в эпителии слизистой оболочки ободочной кишки крыс при хроническом введении мелатонина.

а — при введении мелатонина в течение 1 мес по 1 терапевтической дозе; б — при введении мелатонина в течение 1 мес по 20 терапевтических доз; в — контроль. Стрелки — серотонин-иммунореактивные клетки. а, в — без докраски; б — с докраской гематоксилином

в изучаемых отделах кишки от 24 до 72 % в различных группах исследования по сравнению с контрольными животными. Исключение составило число СИР-клеток в прямой кишке у крыс, которым ежедневно в течение 1 мес вводили MT1. У данных животных число клеток было снижено на 17 %.

Число СИР-клеток у подопытных крыс было больше числа аргентаффиновых клеток в двенадцатиперстной кишке на 45–55 %, в ободочной кишке — на 31–50 %. В прямой кишке подобная закономерность была выражена в остром опыте с MT100, когда число СИР-клеток было на 73 % больше числа аргентаффиновых клеток.

Кроме того, в остром опыте было отмечено, что СИР-клетки во всех изучаемых отделах кишки составляли значительную долю от общего числа аргирофильных клеток: в двенадцатиперстной кишке — 68 %, в ободочной — 76 %, в прямой — 84 %. В хронических опытах с введением MT1 и MT20 выявленная закономерность была также обнаружена, но слабее выражена: в двенадцатиперстной кишке СИР-клетки составляли 60–60,5 % от общего числа ЭнК, в ободочной — 40–52 %, в прямой кишке — 19–24 %.

Обсуждение полученных данных. Количественный анализ содержания ЭнК (аргирофильных, аргентаффиновых, СИР-клеток)

показал, что в большинстве случаев при введении мелатонина наблюдается значимое увеличение их числа. Эти показатели были более выражены в хронических опытах с введением МТ1 и МТ20. По-видимому, в данном случае увеличение количества ЭнК происходит вследствие ежедневного воздействия мелатонина, которое приводит к перестройке работы эндокринного аппарата эпителия кишки. В остром опыте с введением МТ100 данная особенность была менее выражена, что, возможно, связано с тем, что материал был забран на следующие сутки после однократного воздействия, и эндокринный аппарат не успел «перестроиться». Хроническое введение МТ1 и МТ20, вероятно, вызывает перестройку функциональной активности клеток эндокринного аппарата, приводящую к усилению секреции и постепенному «истощению» ЭнК. Продолжение введения мелатонина, по-видимому, стимулирует пролиферацию ЭнК эпителия слизистой оболочки кишки через камбиальную систему, проявляющуюся морфологически в виде увеличения, в том числе аргирофильных, аргентаффиновых и СИР-клеток, что мы наблюдали в хронических опытах с введением МТ1 и МТ20. Подобная реакция эндокриноцитов кишки (увеличение количественного содержания) была ранее описана при других видах экспериментального воздействия, таких как голодание [6], диета с избыточно жирной пищей [7], висцеральная гипералгезия [11], воздействие высокоимпульсного магнитного поля [1], введение декстрансульфата натрия [9].

Обнаруженное в исследовании изменение численности ЭнК свидетельствует о реакции эпителия слизистой оболочки кишки и развитии регенераторных процессов в ответ на воздействие (острое или хроническое введение мелатонина). Тогда как уменьшение численного содержания эндокриноцитов (МТ1, прямая кишка) свидетельствует об истощении этих механизмов.

При анализе количественного содержания ЭнК, вырабатывающих серотонин (см. рис. 1), определенных серебрением по методу Массона—Гамперля (аргентаффиновые клетки) и с применением метода иммуногистохимии (СИР-клетки), было установлено, что у подопытных крыс число СИР-клеток значительно выше числа аргентаффиновых клеток. У контрольных животных эти значения были сопоставимы. Возможно, это связано со специфической реакцией серебрения по методу Массона—Гамперля, для прохождения которой требуется достаточное количество вещества, реагирующего с серебром. Иммуногистохимический метод дает возможность добиться более четкой иденти-

фикации СИР-клеток в эпителии кишки у крыс [4] и выявляет клетки, содержащие серотонин, на разных стадиях их дифференцировки, с разным содержанием секрета в цитоплазме, в том числе и малодифференцированные клетки, которые методика серебрения не позволяет выявить из-за малого содержания гормона.

Для подтверждения высказанных предположений об изменении активности камбиальной системы эпителия и появлении малодифференцированных клеток необходимо провести электронномикроскопическое изучение эпителия слизистой оболочки кишки при введении разных доз препарата.

Длительное экспериментальное воздействие на эпителий слизистой оболочки кишки приводит к развитию компенсаторных процессов в ее различных отделах и проявляется в виде структурных изменений: укорочение кишечных ворсинок двенадцатиперстной кишки и складок ободочной кишки, увеличение глубины крипт прямой кишки. Наблюдаемое при введении мелатонина уменьшение длины кишечных ворсинок двенадцатиперстной кишки, по-видимому, приводит к уменьшению всасывательной поверхности, что в совокупности может сопровождаться ускорением транзита химуса, описанного ранее в литературе при введении мелатонина крысам в малых дозах [8, 12].

Таким образом, в опытах при экспериментальном введении разных доз мелатонина была обнаружена реакция эпителия слизистой оболочки двенадцатиперстной, ободочной и прямой кишки на их введение, которая проявляется в виде увеличения числа аргирофильных, аргентаффиновых и серотонин-иммунореактивных клеток. Описанные морфологические реакции со стороны стенки кишки были более выражены при хроническом введении препарата, что, возможно, свидетельствует о развитии адаптивной реакции эпителия слизистой оболочки изучаемых отделов кишки.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов (серия ПСП № 16553).*

#### **Вклад авторов:**

*Концепция и дизайн исследования: М. Л. Ч.*

*Сбор и обработка материала: М. Л. Ч.*

*Статистическая обработка данных: М. Л. Ч.*

*Анализ и интерпретация данных: М. Л. Ч.*

*Написание текста: М. Л. Ч.*

**Автор сообщает об отсутствии в статье конфликта интересов.**

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Драй Р.В., Костюкевич С.В., Иванова В.Ф. Регенерация эпителиоцитов двенадцатиперстной кишки крысы при

- повреждении высокоинтенсивным импульсным магнитным полем // Вопросы морфологии XXI века. СПб.: ДЕАН, 2010. Вып. 2. С. 115–123 [Drai R. V., Kostyukevich S. V., Ivanova V. F. Regeneration of rat duodenal epithelial cells in case of damage by high-intensity pulsed magnetic field Influence of magnetic stimulation on the rat duodenal epithelium // Voprosy morfologii XXI veka. SPb.: The DEAN, 2010. Vol. 2. P. 115–123. In Russ.].
2. Ермаченков М. Н., Гуляев А. В., Анисимов В. Н. Мелатонин и рак толстой кишки: повышение эффективности стандартного лечения // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. 2012. Т. 4, № 1. С. 78–83 [Ermachenkov M. N., Gulyaev A. V., Anisimov V. N. Melatonin and colorectal cancer: the rise of standard treatment efficacy // Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. I. I. Mechnikova. 2012. Vol. 4, № 1. P. 78–83. In Russ.].
  3. Иванова В. Ф. Регенерация эндокринной гастроэнтеропанкреатической системы при экспериментальной и клинической патологии: становление концепции и современные проблемы // Морфология. 2013. Т. 144, вып. 6. С. 73–84 [Ivanova V. F. Regeneration of endocrine gastroenteropancreatic system in experimental and clinical pathology: concept development and current problems // Morfologiya. 2013. Vol. 144, № 6. P. 73–84. In Russ.].
  4. Коржевский Д. Э., Драй Р. В., Костюкевич С. В. Иммуноцитохимический метод выявления ЕС- (энтерохроматиновых) клеток эпителия слизистой оболочки кишки крысы // Морфология. 2008. Т. 133, вып. 1. С. 78–81 [Korzhevskiy D. E., Drai R. V., Kostyukevich S. V. Immunocytochemical method for the demonstration of EC- (enterochromaffin) cells in the gut mucosal epithelium of the rat // Morfologiya. 2008. Vol. 133, № 1. P. 78–81. In Russ.].
  5. Пальцев М. А., Кветной И. М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. М.: Шико, 2014. 752 с. [Paltsev M. A., Kvetnoy I. M. Handbook of neuroimmunoendocrinology. M.: Shiko, 2014. 752 p. In Russ.].
  6. Соболева М. В. Морфофункциональные изменения ЕС-клеток двенадцатиперстной кишки белой крысы при голодании // Морфология. 1995. Т. 108, вып. 1. С. 69–70 [Soboleva M. V. Morphofunctional changes in EU-cells of the duodenum of the white rat during starvation // Morfologiya. 1995. Vol. 108, № 1. P. 69–70. In Russ.].
  7. Bertrand R. L., Senadheera S., Markus I., Liu L., Howitt L., Chen H., Murphy T. V., Sandow S. L., Bertrand P. P. A Western diet increases serotonin availability in rat small intestine // Endocrinology. 2011. Vol. 152, № 1. P. 36–47.
  8. Drago F., Macaudo S., Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats // Dig. Dis. Sci. 2002. Vol. 47, № 9. P. 1969–1974.
  9. El-Salhy M., Hatlebakk J. G., Gilja O. H. Abnormalities in endocrine and immune cells are correlated in dextran-sulfate-sodium-induced colitis in rats // Mol. Med. Rep. 2017. Vol. 15, № 1. P. 12–20.
  10. Konturek P. C., Brzozowski T., Konturek S. J. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options // J. Physiol. Pharmacol. 2011. Vol. 62, № 6. P. 591–599.
  11. Li Z., Zhang X. J., Xu H. X., Sung J. J., Bian Z. X. Intracolonic administration of protease-activated receptor-2 agonists produced visceral hyperalgesia by up-regulating serotonin in the colon of rats // Eur. J. Pharmacol. 2009. Vol. 606, № 1–3. P. 199–204.
  12. Sommansson A., Saudi W. S., Nylander O., Sjöblom M. Melatonin inhibits alcohol-induced increases in duodenal mucosal permeability in rats in vivo // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2013. Vol. 305, № 1. P. G95–G105.
- Поступила в редакцию 13.12.2018  
Получена после доработки 22.01.2019
- ### REACTION OF RAT INTESTINE MUCOSAL EPITHELIUM ENDOCRINE CELLS TO MELATONIN TREATMENT
- M. L. Churkova*
- Objective** — to study the content of endocrine cells of intestinal mucosal epithelium in rats receiving different doses of melatonin.
- Material and methods.** The number of argyrophilic, argentaffine, and serotonin-immunoreactive epithelial cells of duodenum, colon and rectum was studied in 30 Wistar rats, divided into 3 subgroups treated with 1, 20 and 100 therapeutic doses of melatonin.
- Results.** It was found that the injection of different doses of melatonin caused increase in the number of argyrophilic, argentaffine, and serotonin-immunoreactive cells in the studied parts of intestine. The changes in the intestinal wall were revealed: a shortening of duodenum villi and colons folds, an increase of the depth of rectal crypts.
- Conclusion.** The detected changes indicate the development of an adaptive reaction of the epithelium, including endocrine cells, to the experimental injection of melatonin.
- Key words:** *endocrine cells, mucous membrane, intestine, rat, melatonin*
- Department of Medical Biology, I. I. Mechnikov North-Western State Medical University, 47/9 Piskarevskij Pr., St. Petersburg 195067