

Agrarnyi vestnik Urala. – 2022. – No. S14. – S. 33-43. – DOI 10.32417/1997-4868-2022-229-14-33-43.

7. Virus gripa D u krupnogo rogatogo skota (obzor) / S.V. Koteneva, A.G. Glotov, T.I. Glotova, A.V. Nefedchenko // Veterinariia segodnia. – 2024. – T. 13, No. 1. – S. 20-26. – DOI 10.29326/2304-196X-2024-13-1-20-26.

8. Zeedan, G., Abdalhamed, A., Ghazy, A., Ghoneim, N. (2018). Serological and Molecular Identification of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus Isolation and Adaptation in Embryonated Chicken Eggs. Journal of Antivirals & Antiretrovirals. DOI: 10.104172/1948-5964.1000174.



УДК 636.934.3:616.36

DOI: 10.53083/1996-4277-2024-239-9-49-53

**А.В. Черезова, И.И. Калюжный**  
**A.V. Cherezova, I.I. Kalyuzhnyi**

## МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПЕЧЕНИ ЕНОТОВИДНОЙ СОБАКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ МЕЛАТОНИНА

### MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF RACCOON DOG LIVER UNDER THE INFLUENCE OF MELATONIN

**Ключевые слова:** енотовидная собака, мелатонин, печень, гепатоциты, митохондрии, морфометрия, морфология, цитология, электронная микроскопия, кариопикноз.

Применение мелатонина животным требует дополнительных исследований. Экзогенный мелатонин используется в пушном звероводстве для ускорения созревания шерсти. Однако недостаточно изучено его влияние на внутренние органы и ткани хищных пушных зверей. Патологии внутренних органов сопровождаются биохимическими, метаболическими, окислительными и воспалительными процессами, которые влияют на ультраструктуру клеток. С использованием электронно-микроскопического исследования была описана ультраструктура печени енотовидных собак, которым были имплантированы гранулы мелатонина. При исследовании выявлено протекание дистрофических и окислительных процессов в печени енотовидных собак, которым был имплантирован препарат «Мелакрил». При этом наблюдалась высокая секреторная активность и регенеративные процессы в клетках печени. В данной группе проведено исследование ультраструктурной организации печени под влиянием экзогенного мелатонина. Проводились следующие измерения внутриклеточных структур: площадь гепатоцитов, их ядер и ядрышек, ядерно-цитоплазматическое отношение, площадь митохондрий и гранул гликогена. Описывались окружающие элементы: кровенаполнение сосудов, состояние пространства Диссе. При морфометрической оценке печени енотовидных собак определяли количество нормальных (НГ) и дистрофически изменённых (ДГ) гепатоцитов, а также коэффициент нормализации паренхимы (КНП). К нормальным относятся клетки, у которых хорошо дифференцированное ядро, оформленное ядрышко и целая цитоплазма. К дистрофически изменённым относятся клетки с изменёнными ядрами и

цитоплазмой, а также безъядерные клетки. Число НГ составило  $70,45 \pm 3,87\%$ , а число ДГ –  $29,55 \pm 3,87\%$ . Значение КНП –  $2,474 \pm 0,52$  усл. ед. Таким образом, в паренхиме печени выявлено наличие дистрофических изменений.

**Keywords:** raccoon dog, melatonin, liver, hepatocytes, mitochondria, morphometry, morphology, cytology, electron microscopy, karyopyknosis.

The use of melatonin in animals requires additional research. Exogenous melatonin is used in fur farming to accelerate wool maturation. However, its effect on the internal organs and tissues of fur-bearing animals has not been sufficiently studied. Pathologies of internal organs are accompanied by biochemical, metabolic, oxidative and inflammatory processes that affect cell ultrastructure. Using electron microscopy, the ultrastructure of the liver of raccoon dogs implanted with melatonin granules was described. The study revealed the occurrence of dystrophic and oxidative processes in the liver of raccoon dogs that were implanted with the drug Melacryl. At the same time, high secretory activity and regenerative processes in liver cells were observed. In the study group of raccoon dogs, a study of the ultrastructural organization of the liver under the influence of exogenous melatonin was conducted. During the study, the following measurements of intracellular structures were carried out: the area of hepatocytes, their nuclei and nucleoli, the nuclear-cytoplasmic ratio, the area of mitochondria and glycogen granules. The surrounding elements were described: blood filling of the vessels, the state of the Disse's space. During the morphometric evaluation of the liver of raccoon dogs, the number of normal (NH) and dystrophic altered (DH) hepatocytes, as well as the parenchyma normalization coefficient (PNC), were determined. Normal cells include cells that have a well-differentiated nucleus, a formed nucleolus, and intact cyto-

plasm. Dystrophic altered cells include cells with altered nuclei and cytoplasm, as well as nuclear-free cells. The number of NH was  $70.45 \pm 3.87\%$ , and the number of DH

was  $29.55 \pm 3.87\%$ . The PNC value was  $2.474 \pm 0.52$  conventional units. Thus, the presence of dystrophic changes was revealed in the liver parenchyma.

**Черезова Анна Владимировна**, исследователь, ФГБОУ ВО Вятский ГАТУ, г. Киров, Российская Федерация, e-mail: dog\_anna@mail.ru.

**Калюжный Иван Исаевич**, д.в.н., профессор, ФГБОУ ВО Вавиловский университет, г. Саратов, Российская Федерация, e-mail: kalugnivan@mail.ru.

**Cherezova Anna Vladimirovna**, Researcher, Vyatka State Agrotechnological University, Kirov, Russian Federation, e-mail: dog\_anna@mail.ru.

**Kalyuzhnyi Ivan Isaevich**, Dr. Vet. Sci., Prof., Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation, e-mail: kalugnivan@mail.ru.

### Введение

Мелатонин – это гормон эпифиза, который является одним из центральных регуляторов циркадного ритма. При этом его гормональное действие не описано полноценно в работах по физиологии и эндокринологии, не определены эффекты от гипер- и гипопродукции данного гормона [1].

У животных и людей мелатонин обнаружен в разных участках головного мозга, а также в желудочно-кишечном тракте, сердце, половых железах и других органах. Возможности мелатонина для лечения различных патофизиологических состояний обусловлены его способностью проникать во многие клетки, ткани и органы в организме, а также влиять на обмен веществ. Мелатонин, циркулирующий в крови, метаболизируется в основном в печени. Фармакокинетика мелатонина зависит от пути введения, индивидуальной скорости всасывания и метаболизма в печени [2, 3].

Мелатонин эффективно использовался для борьбы с окислительным стрессом, воспалением и апоптозом клеток, а также для восстановления функции тканей в ряде исследований на людях и животных. Его эффективность аргументирует необходимость его более широкого применения в различных исследованиях на людях и животных [4, 5].

В исследованиях D.A. Lowes (2013) на крысах экзогенный мелатонин способствует восстановлению дисфункции митохондрий, а в исследованиях R.J. Reiter (2016) указывается на способность мелатонина снижать окислительный стресс, морфологической базой которого являются митохондрии.

**Цель** исследования – изучение структуры печени енотовидных собак под влиянием мелатонина. **Задачи** исследования – дать морфометрическую оценку гепатоцитов и оценить ультра-

структурную организацию печени исследуемой группы.

### Объекты и методы

Объектами исследования выбраны енотовидные собаки старше 1 года. Животным была проведена имплантация гранул Мелакрила на полимерной основе с содержанием в них мелатонина и бенфотиамина подкожно в область лопатки (Рапопорт О.Л., 1990) с целью улучшения физиологического состояния хищных млекопитающих и увеличения показателей хозяйственно-полезных признаков. Плановый убой проводился в ЗАО звероводческом племенном хозяйстве «Вятка» Кировской области через 3 мес. после имплантации. Произвольно выбрано 10 самцов енотовидных собак. Материалом для морфологического исследования послужили образцы печени, взятые в течение часа после убоя.

Для электронно-микроскопического исследования аутопаты размером 2-3 мм фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида. Дальнейшая подготовка материала (заливка в эпоновые смолы, приготовление и окрашивание полутонких срезов) и исследование осуществлялись в Центре коллективного пользования электронной микроскопией Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина при Российской академии наук (пос. Борок, Ярославская область) [6, 7].

Результаты были получены с использованием морфологических, морфометрических и статистических методов исследования (Глаголев А.А., 1941; Салтыков С.А., 1948, 1976; Автандилов Г.Г., 1980). В ходе морфометрического исследования определяли такие показатели, как: площадь гепатоцитов, их ядра и ядрышка, площадь митохондрий и гранул гликогена. Использовали программное обеспечение анализа

изображений TopView, с использованием функции «Произвольная область».

При морфометрической оценке печени енотовидных собак определяли количество нормальных (НГ) и дистрофически изменённых (ДГ) гепатоцитов, а также коэффициент нормализации

$$1) \text{ ЯЦО} = \frac{\text{площадь ядра (мкм}^2\text{)}}{\text{площадь цитоплазмы (мкм}^2\text{)}};$$

$$2) \text{ КНП} = \frac{\text{среднее количество нормальных гепатоцитов (\%)}}{\text{среднее количество дистрофически изменённых гепатоцитов (\%)}}.$$

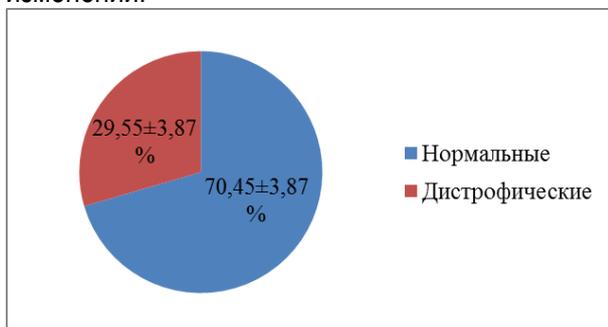
В ходе исследования проводились следующие измерения внутриклеточных структур: площадь гепатоцитов, их ядер и ядрышек, ядерно-цитоплазматическое отношение, площадь митохондрий и гранул гликогена (Стальная И.Д., 1977). Описывались окружающие элементы: кровенаполнение сосудов, состояние пространства Диссе (Салтыков С.А., 1948).

Математическую обработку всех полученных данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2007.

### Результаты и их обсуждение

В исследуемой группе енотовидных собак проведено исследование ультраструктурной организации печени под влиянием экзогенного мелатонина.

К нормальным относятся клетки, у которых хорошо дифференцированное ядро, оформленное ядрышко и целая цитоплазма. К дистрофически изменённым относятся клетки с изменёнными ядрами и цитоплазмой, а также безъядерные клетки. Число НГ составило  $70,45 \pm 3,87\%$ , а число ДГ –  $29,55 \pm 3,87\%$  (рис. 1). Значение КНП –  $2,474 \pm 0,52$  усл. ед. Таким образом, в паренхиме печени выявлено наличие дистрофических изменений.



**Рис. 1. Процентное соотношение нормальных и дистрофически изменённых гепатоцитов у исследуемой группы енотовидных собак,  $M \pm m$  (n=10)**

У енотовидных собак гепатоциты с преимущественно периферически расположенным яд-

рещи паренхимы (КНП), ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), коэффициент нормализации паренхимы (КНП) (Солопаева И.М., 1982). Для данных показателей использовали следующие формулы:

ром (рис. 2), встречаются ядра в состоянии карнопикноза. Средняя площадь гепатоцитов –  $215,21 \pm 20,01$  мкм<sup>2</sup> (табл.). Ядра крупные светлые с тёмной окаёмкой за счёт скопления гетерохроматина, округлой формы. Средняя площадь ядер гепатоцитов –  $33,93 \pm 4,2$  мкм<sup>2</sup>.

**Таблица  
Морфометрические показатели гепатоцитов печени взрослых енотовидных собак, которым имплантировали «Мелакрил»,  $M \pm m$  (n=10)**

Показатель	Измерение
S гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	$215,21 \pm 20,01$
S ядра, мкм <sup>2</sup>	$33,93 \pm 4,2$
S ядрышка, мкм <sup>2</sup>	$1,682 \pm 0,34$
ЯЦО	$0,194 \pm 0,028$
S митохондрий, мкм <sup>2</sup>	$1,674 \pm 0,115$
S гранул, мкм <sup>2</sup>	$0,535 \pm 0,058$

Ядерно-цитоплазматическое отношение –  $0,194 \pm 0,028$ , что говорит о слабой дифференцировке клеток.

В цитоплазме гепатоцита хорошо различимы клеточные органеллы: эндоплазматическая сеть с рибосомами, аппарат Гольджи, митохондрии, гранулы гликогена.

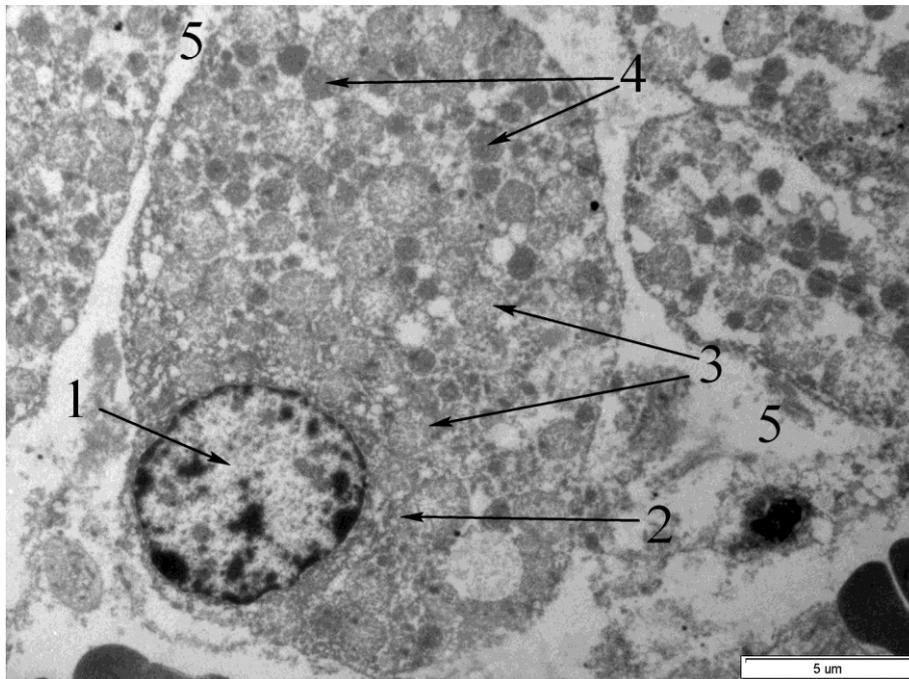
Митохондрии округлой и эллипсоидной формы с большим количеством плотно уложенных крист, распределены равномерно по всей цитоплазме и близко располагаются друг к другу. Средняя площадь митохондрий составила  $1,674 \pm 0,115$  мкм<sup>2</sup>.

Гранулы гликогена находятся на разной стадии экскреции, округлой формы, отдалены от ядра, площадь составила  $0,535 \pm 0,058$  мкм<sup>2</sup>. Относительная доля гранул в клетке  $11,94 \pm 1,08$ , что соответствует высокой секреторной активности.

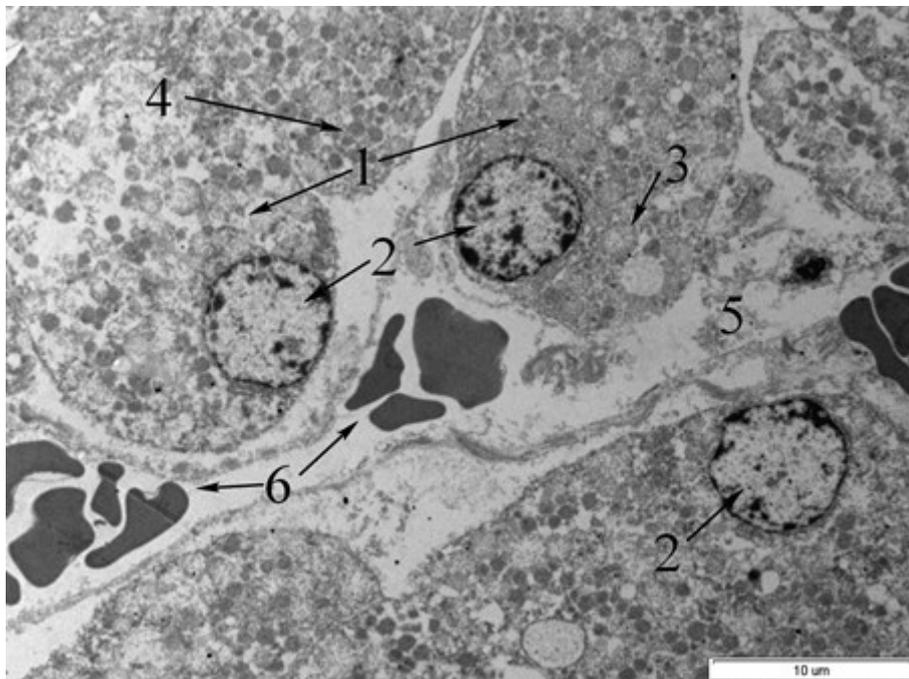
Балочное строение печени сохранено. Гепатоциты правильной формы (рис. 3), на них различаются микроворсинки, которые направлены в перисинусоидальное пространство. За счёт мик-

роворсинок перисинусоидальное пространство обеспечивает обмен веществ между гепатоцитами и кровеносными сосудами. Кровеносные сосуды умеренно наполнены. В цитоплазме кле-

ток встречаются небольшие участки вакуолизации, в области таких клеток наблюдается отёк пространства Диссе.



**Рис. 2. Ультраструктурная организация гепатоцита енотовидной собаки. Электронограмма х5000:**  
 1 – ядро; 2 – эндоплазматическая сеть (ЭПС); 3 – митохондрии; 4 – гранулы гликогена;  
 5 – межклеточное пространство



**Рис. 3. Ультраструктура печени исследуемой группы енотовидных собак. Электронограмма х4000:**  
 1 – гепатоциты; 2 – ядро гепатоцита; 3 – митохондрии; 4 – гранулы гликогена;  
 5 – пространство Диссе; 6 – кровеносные сосуды

Проведённое морфометрическое исследование печени енотовидных собак, которым им-

плантирован препарат «Мелакирил», позволило охарактеризовать ультраструктуру печени, в ко-

торой протекают регенеративные процессы на клеточном уровне: гепатоциты крупные плотные с хорошо дифференцированными органеллами и высокой секреторной активностью.

Крупные митохондрии свидетельствуют о функциональной нагрузке на печень и наличии окислительного стресса, которые не приводят к разрушению матрикса, что говорит о низкой интенсивности свободнорадикальных процессов.

В данном исследовании выявлено, что в печени на фоне регенеративных процессов имеются структурные изменения в небольшой части гепатоцитов, которые характеризуются наличием ядер в состоянии кариопикноза и участками вакуолизации цитоплазмы.

### Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что при имплантации гранул Мелакрила в печени происходят регенеративные процессы. Дистрофические изменения представлены в количественном (согласно уровням коэффициента нормализации паренхимы и ядерно-цитоплазматическом индекса) и качественном аспектах (единичные вакуоли), что говорит об устойчивости гепатоцитов к клеточному апоптозу.

Дальнейшее изучение морфофункционального состояния печени енотовидных собак позволит судить об интенсивности воспалительных процессов, их динамике и эффективности проводимой терапии.

### Библиографический список

1. Amaral F.G.D., Cipolla-Neto J. (2018). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab.* 62 (4): 472-9. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>.
2. Мелатонин: теория и практика / В. Я. Бродский, А. Ю. Беспятых, О. В. Бурлакова [и др.]; под редакцией С. И. Рапопорта, В. А. Голыченкова. – Москва: ИД «МЕДПРАКТИКА М», 2009. – 99 с. – Текст: непосредственный.
3. Дедов, И. И. Биоритмы гормонов / И. И. Дедов, В. И. Дедов. – Москва: Медицина, 2008. – 228 с. – Текст: непосредственный.
4. Lowes D.A., Webster N.R., Murphy M.P., Galley H.F. (2013). Antioxidants that protect mito-

chondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth.* 110 (3): 472-480. <https://doi.org/10.1093/bja/aes577>.

5. Смолин, С. Г. Физиология и этология животных / С. Г. Смолин. – 4-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2023. – 628 с. – Текст: непосредственный.

6. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, et al. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 61 (3): 253-78. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>.

7. Mascorro A., Bozzola J.J. (2007). Processing Biological Tissues for Ultrastructural Study // *Electron microscopy: methods and protocols.* – 2nd ed. / edited by John Kuo. p. 19-34.

### References

1. Amaral F.G.D., Cipolla-Neto J. (2018). A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab.* 62 (4): 472-9. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000066>.
2. Brodskii V.Ia., Bespiatykh A.Iu., Burlakova O.V. i dr. Melatonin: teoriia i praktika / pod red. S.I. Rapoport, V.A. Golichenkova. – Moskva: ID "Medpraktika M", 2009. – 99 s.
3. Dedov I.I., Dedov V.I. Bioritmy gormonov. – Moskva: Meditsina, 2008. – 228 s.
4. Lowes D.A., Webster N.R., Murphy M.P., Galley H.F. (2013). Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth.* 110 (3): 472-480. <https://doi.org/10.1093/bja/aes577>.
5. Smolin, S.G. Fiziologija i etologija zhivotnykh / S.G. Smolin. – 4-e izd., ster. – Sankt-Peterburg: Lan, 2023. – 628 s.
6. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, et al. (2016). Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res.* 61 (3): 253-78. <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>.
7. Mascorro A., Bozzola J.J. (2007). Processing Biological Tissues for Ultrastructural Study // *Electron microscopy: methods and protocols.* – 2nd ed. / edited by John Kuo. p. 19-34.

