

УДК 591.481.3. - 019]: 599.

**Ю. В. Ломакіна**  
**Н. В. Черновська**

Буковинський державний медичний  
 університет, м. Чернівці

## КОРЕКЦІЯ МЕЛАТОНІНОМ СТРЕС-ІНДУКОВАНИХ МІКРО– ТА УЛЬТРАМІКРОСКОПІЧНИХ ЗМІН ЕПІФІЗА МОЗКУ СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОСТІЙНОГО ОСВІТЛЕННЯ

**Ключові слова:** шишкоподібна залоза, мелатонін, мікро- та ультрамікроскопічна будова, гіпофункція шишкоподібної залози, старі щури.

**Резюме.** Робота виконана з метою визначення особливостей порушень морфологічної структури пінеалоцитів щурів, які перебували за тривалого світлового режиму та іммобілізаційного стресу. Встановлено, що в умовах цілодобового постійного освітлення мікро- та ультрамікроскопічна організація пінеалоцитів свідчить про виражені порушення реактивного характеру. Зокрема, кількість темних пінеалоцитів при гіпофункції шишкоподібної залози збільшується удвічі порівняно із контрольною групою тварин. Субмікроскопічні зміни характеризують пригнічення функціональної активності епіфіза мозку. У стресованих щурів на фоні гіпофункції шишкоподібної залози кількість світлих клітин ще прогресивно зменшується із перевагою темних, що підтверджується на електронномікроскопічному рівні. Ін'єкції мелатоніну сприяли покращанню функціональної активності пінеалоцитів.

### Вступ

Шишкоподібна залоза, як ендокринний орган у структурі мозку, відіграє особливу роль у формуванні адаптивних реакцій, регулює цілу низку життєво важливих процесів [4]. Ця регуляція є циклічною, тому, на думку багатьох дослідників, шишкоподібна залоза є регулятором “біологічного годинника” в організмі [5, 8]. На даний час активно проводяться фізіологічні та морфологічні дослідження шишкоподібної залози в старіючих організмах, оцінюється значення мелатоніну в профілактиці старіння та як антистресового чинника. Продемонстровано, що старіння супроводжується недостатністю функції шишкоподібної залози, а застосування екзогенного мелатоніну може зберегти гомеостаз із віком і продовжити тривалість життя шляхом корекції біологічного годинника до синхронізації з навколишнім середовищем, захоплення вільних радикалів, модулювання нейроендокринної системи, покращання імунітету, що запобігає пошкодженню ядерної ДНК [3, 7]. Значний спектр властивостей мелатоніну дозволяє широко застосовувати його в клінічній та геріатричній практиці. Епіфізектомія, або пригнічення функції шишкоподібної залози, зменшують тривалість життя тварин, знижують реактивність організму до впливу стресових чинни-

ків, тоді як уведення щурам екзогенного мелатоніну та пептидних препаратів шишкоподібної залози подовжує її та підвищує реактивність організму [1, 2, 6, 9, 11].

### Мета дослідження

Вивчити антистресову активність мелатоніну на відновлення морфологічних та ультраструктурних змін пінеалоцитів шишкоподібної залози у старих щурів, яких утримували при зміненому фотоперіоді та одногодинному іммобілізаційному стресі.

### Матеріал і методи

Досліди виконано на 24 старих (20-24 міс.) нелінійних щурах-самцях масою 300±10г. Упродовж одного місяця до початку та впродовж експерименту тварин утримували у віварії за умов сталої температури (18-21°C), вологості повітря (50-55%) в окремих клітках з вільним доступом до води та їжі. Іммобілізаційний стрес моделювали шляхом утримання тварин упродовж 1 год у пластикових клітках-пеналах. Гіпофункцію шишкоподібної залози моделювали шляхом утримання тварин упродовж семи діб при повному освітленні 500 Лк. За 24 години до експерименту тварин утримували без їжі з вільним доступом до води.

Тварин поділяли на чотири групи, по шість щурів у групі: першу складали контрольні тварини, які перебували сім діб за умов стандартного світлового режиму – LD (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 Лк; другу складали тварини, які перебували 7 діб за умов постійного освітлення – LL (цілодобова світлова експозиція); у третій – щурів утримували при ідентичному освітленні сім діб та моделювали 1-годинний іммобілізаційний стрес на 8-у добу; у четвертій – при тому ж освітленні впродовж трьох діб, починаючи з 5-ї доби, вводили мелатонін (виробництво SIGMA, США) у дозі 2,5 мг/кг внутрішньоочеревинно на ізотонічному розчині натрію хлориду, розведеному на етиловому спирті та фізіологічному розчині.

Декапітацію тваринам проводили о 14.00 год під легким ефірним наркозом згідно з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Для гістологічних досліджень шматочки тканини фіксували впродовж 48 годин у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї спиртів та парафінову заливку при температурі 56°C. На парафінових зрізах виконували методику забарвлення гематоксиліном і еозином [12].

Документацію морфологічних змін здійснювали з отриманням цифрових копій оптичного зображення ділянок мікроскопічних препаратів за допомогою цифрового фотоапарата Olympus C740UZ та мікроскопа ЛЮМAM-8.

Кількісний аналіз цифрових зображень виконували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0 (Санкт-Петербург, Росія, 2000). Різницю в середніх тенденціях між групами дослідження, враховуючи нормальний розподіл даних (за критерієм

Shapiro-Wilk), оцінювали за допомогою параметричного критерію Стьюдента (непарний для незалежних вибірок, двобічний). Враховуючи малий об'єм порівнюваних вибірок, для надійності висновків додатково застосували непараметричний критерій Mann-Whitney, який давав значення вірогідності, близькі до критерію Стьюдента.

Для електронно-мікроскопічного дослідження шишкоподібної залози забір матеріалу проводили згідно з загальноприйнятими правилами [10].

Після трепанації черепа вилучали залозу і фіксували її в 2,5% розчині глютаральдегіду, який готували на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією середовища pH 7,2-7,4. Фіксований матеріал переносили у буферний розчин і промивали протягом 20-30 хв. Після цього впродовж 60 хв здійснювали постфіксацію матеріалу, використовуючи для цього 1% розчин чотириокису осмію на буфері Міллонга. Далі проводили дегідратацію матеріалу в спиртах і ацетоні та заливали в суміш епоксидних смол відповідно до загальноприйнятої методики [10].

### Обговорення результатів дослідження

При гістологічному дослідженні епіфіза мозку встановлено, що співвідношення між світлими та темними пінеалоцитами складало  $1,77 \pm 0,028$  (світлих пінеалоцитів –  $64 \pm 0,9\%$ , темних –  $36 \pm 0,9\%$ ) (рис. 1).

Субмікроскопічні дослідження за умов звичайного світлового режиму (12C:12T) показали, що для більшості пінеалоцитів характерні округло-овальні ядра з великими осміофільними ядерецями.

У каріоплазмі є невеликі грудочки гетерохроматину. Каріолема рівна і має відносно рівномірний перинуклеарний простір, чіткі ядерні пори. У цитоплазмі наявні різної величини, округлі осміофільні гранули серотоніну (рис. 2). Цистер-

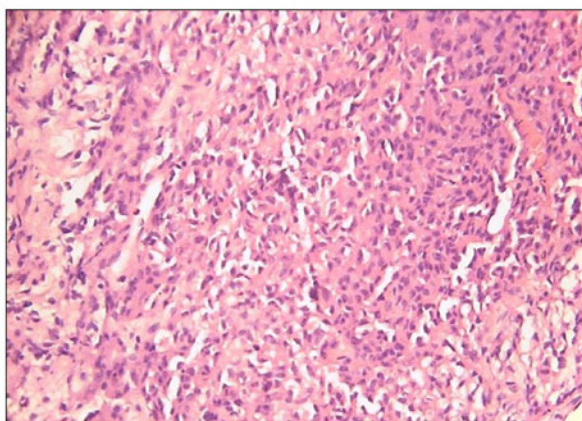


Рис. 1. Морфологічний стан епіфіза мозку старого щура за умов звичайного світлового проміжку. Гематоксилін і еозин Об.20 $\times$ , ок.10 $\times$

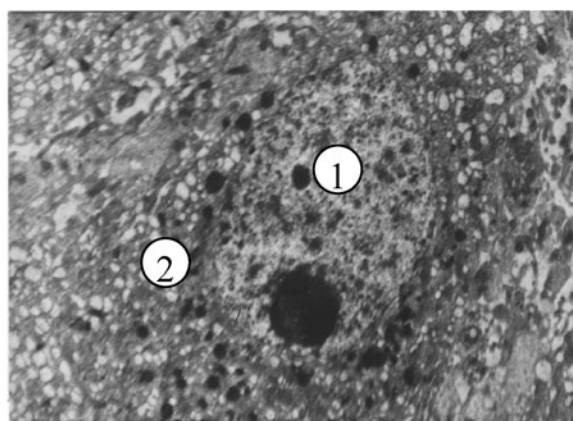


Рис. 2. Ультраструктура пінеалоцита при звичайному освітленні. Овальне ядро (1) з ядерецем. Гранули серотоніну (2).x 10 000

ни гранулярного ендоплазматичного ретикулула (ЕПР) розширені, утворюють вакуолоподібні структури, великі мітохондрії мають осміофільний матрикс, наявні кристи.

Гістологічними дослідженнями епіфіза мозку старих щурів за умов гіпофункції шишкоподібної залози встановлено, що співвідношення між світлими та темними пінеалоцитами складало  $0,51 \pm 0,018$  (світлих пінеалоцитів –  $34,0 \pm 1,5\%$ , темних –  $66,0 \pm 1,6\%$ ), що вказує на збільшення темних клітин майже удвічі порівняно з контрольною групою тварин (рис. 3).

Дослідження субмікроскопічної організації епіфіза мозку в умовах цілодобового семиденного освітлення показали, що більшість клітин мають округло-овальні, частково інвагіновані ядра. У світлій каріоплазмі виявлено невелике компактне ядерце, окремі грудочки гетерохроматину. Чітка каріолема має невеликий перинуклеарний простір. У цитоплазмі наявні окремі осміофільні гранули серотоніну. Канальці ЕПР та цистерни комплексу Гольджі мають вузькі прояснення. Мітохондрій небагато, вони невеликі, з помірно оксифільним матриксом і нечисельними кристами (рис. 4). Описані вище зміни свідчать про пригнічення функціональної активності пінеалоцитів.

Таким чином, зовнішній подразнювач у вигляді світлової експозиції, викликав значні зміни у співвідношенні світлих і темних пінеалоцитів, знизивши в 3,5 раза коефіцієнт такого до  $0,38 \pm 0,015$ , що вказує на негативний ефект світлового чинника.

При гістологічному дослідженні епіфіза мозку стресованих тварин, які перебували за умов семидобової світлової експозиції, виявлені зміни у співвідношенні між світлими та темними пінеалоцитами порівняно з контролем, яке становило  $0,38 \pm 0,015$  (світлих пінеалоцитів –  $28,0 \pm 1,3\%$ ,

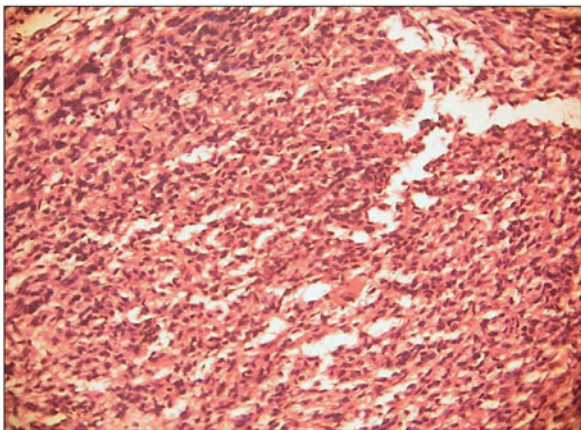
темних –  $72,0 \pm 1,1\%$ ), що вірогідно відрізнялося від показників інтактної групи тварин ( $p < 0,001$ ) (рис. 5).

При цілодобовому освітленні та в умовах іммобілізаційного стресу зміни ультраструктурної організації подібні як і в попередніх умовах експерименту, проте більш виражені. Спостерігаються значні, глибокі інвагінації каріолеми, завдяки яким ядра набувають посіченого вигляду. Цитоплазма щільна, у ній наявні тонкі канальці гранулярного ЕПР і цистерни комплексу Гольджі. Мітохондрії невеликі, у них мало крист. У таких пінеалоцитах поодинокі і дрібні гранули серотоніну. Описаний стан відображає низьку функціональну активність пінеалоцитів.

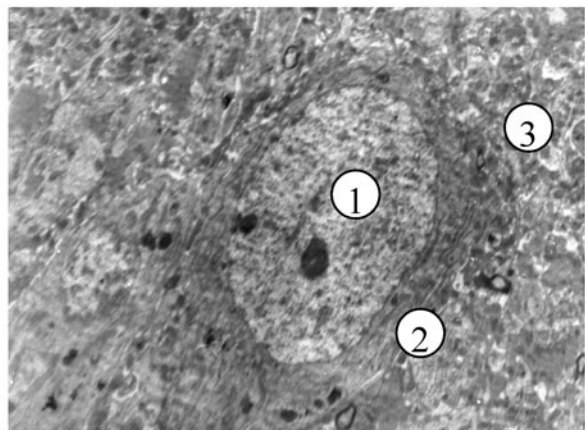
Пінеалоцити в умовах даного дослідження мають невеликі неправильної форми ядра, у каріолемі яких є багато осміофільних гранул гетерохроматину. Перинуклеарні простори невеликі, ядерних пор мало. У цитоплазмі нерівномірно потовщені, фрагментовані канальці гранулярного ЕПР та цистерни комплексу Гольджі. Видовженої або округло-овальної форми мітохондрії мають небагато крист у помірно електроннощільному матриксі. Спостерігаються лише поодинокі серотонінівмісні структури у вигляді пластівців (рис. 6).

Низька функціональна активність пінеалоцитів підтверджена описаними змінами субмікроскопічної будови.

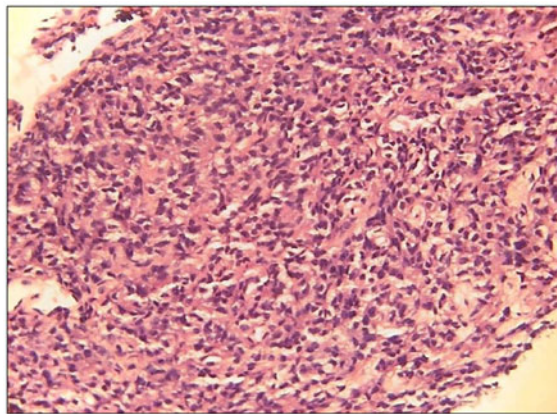
Після внутрішньоочередового введення мелатоніну в дозі  $2,5$  мг/кг маси тіла тварини при гістологічному дослідженні епіфіза мозку виявлено підвищення співвідношення між світлими та темними пінеалоцитами майже удвічі порівняно зі стресованими тваринами на фоні тривалого освітлення до  $0,75 \pm 0,02$  (світлих пінеалоцитів –  $43,0 \pm 1,3\%$ , темних –  $57,0 \pm 1,4\%$ ) з вірогідною відмінністю  $p < 0,001$ , що вказує на позитивну дію



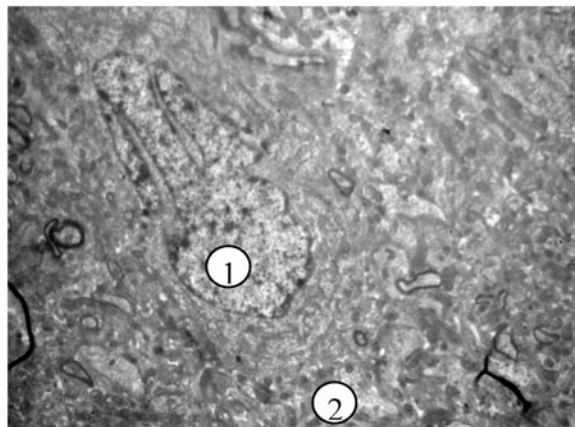
**Рис. 3.** Морфологічний стан епіфіза мозку старого щура при утриманні його за умов гіпофункції шишкоподібної залози. Гематоксилін і еозин. Об.  $20\times$ , ок.  $10\times$



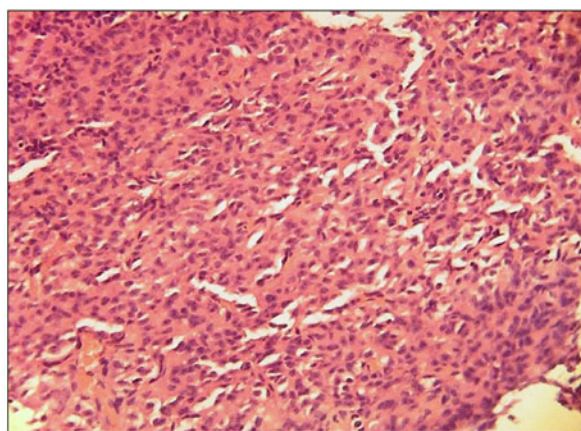
**Рис. 4.** Субмікроскопічний стан пінеалоцита при 24-годинному освітленні впродовж 7 днів. Овальне ядро (1), гранулярний ендоплазматичний ретикулум (2), секреторні гранули (3)  $\times 9\,000$



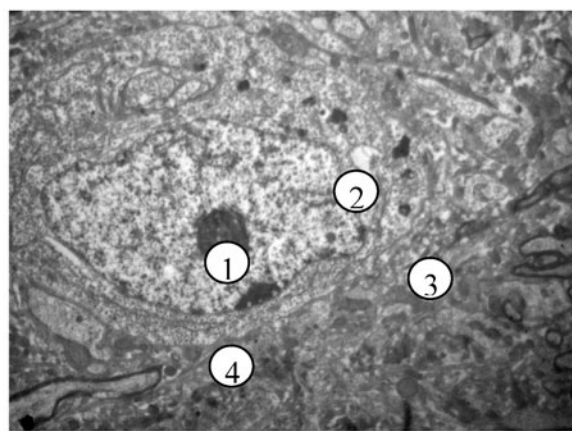
**Рис. 5.** Епіфіз мозку старого щура при стресі за умов гіпофункції шишкоподібної залози. Гематоксилін і еозин. Об.20 $\times$ , ок.10 $\times$



**Рис. 6.** Субмікроскопічний стан пінеалоцитів при іммобілізаційному стресі та семидобовому освітленні. Інвагіноване ядро (1), поодинокі серотонінові гранули (2) x 8 000



**Рис. 7.** Морфологічна картина епіфіза мозку старого щура при уведенні мелатоніну тваринам, що зазнали стресу за умов гіпофункції ШЗ. Гематоксилін і еозин. Об.20 $\times$ , ок.10 $\times$



**Рис. 8.** Субмікроскопічна організація пінеалоцита епіфіза мозку тварин в умовах 24-годинного освітлення та уведення мелатоніну при іммобілізаційному стресі. Ядерце (1), інвагінації каріолеми (2), каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулула (3), гранули серотоніну (4) x 9 000

мелатоніну як антистресового засобу. Водночас застосування мелатоніну, за даних умов експерименту, відновило вищенаведений показник, але це співвідношення у два рази менше відповідно до інтактної групи тварин (рис. 7).

Електронномікроскопічними дослідженнями епіфіза в умовах тижневого цілодобового освітлення, іммобілізаційного стресу та уведення мелатоніну встановлено, що для частини пінеалоцитів характерним є активація ядерця. Це проявляється переважанням у каріоплазмі еухроматину, наявністю великих ядерця, рибосомальних гранул, нечисельними, але глибокими інвагінаціями каріолеми, в яких багато ядерних пор.

У цитоплазмі добре розвинені органели: гранулярний ендоплазматичний ретикулум, комплекс Гольджі, наявні гіпертрофовані мітохондрії. Виявляються електроннощільні різної величини

гранули серотоніну, частина з них великі. Такий стан мелатоніну запобігає пошкодженню й активує секреторну діяльність пінеалоцитів (рис. 8).

## Висновки

1. Внутрішньоочеревинне уведення мелатоніну корегує стрес-індуковані гістологічні та ультрамікроскопічні зміни досліджуваних структур, що викликані знерухомленням на фоні тривалого освітлення.

2. Порівняно з тваринами, яким не проводили корекції постстресорних порушень, застосування мелатоніну віддзеркалилося тенденцією до нормалізації співвідношення світлих та темних пінеалоцитів шишкоподібної залози старих щурів, що вказує на ефективність застосування мелатоніну для відновлення морфологічних перебудов, зумовлених стресовим чинником.

3. Мелатонін у дозі 2,5 мг/кг запобігає інтенсифікації мікро- та субмікроскопічних змін пінеалоцитів стресованих щурів.

### Перспективи подальших досліджень

Експериментальні результати, представлені в даній статті, дозволяють дійти висновку про можливість використання екзогенного мелатоніну за умов гіперфункції шишкоподібної залози. Це може бути підґрунтям для подальших хронобіологічних досліджень у геронтологічній практиці.

**Література.** 1. Арушанян Э.Б. Влияние разрушения гиппокампа и удаления эпифиза на суточную динамику подвижности стрессированных крыс / Э. Б. Арушанян, Э.В. Бейер // Высш. нервная деятельность ж. им. И.П. Павлова. — 1998. — Т. 32, №6. — С. 2065-2072. 2. Влияние эпифизэктомии и введения мелатонина на суточную динамику митотического эпителия крипт тощей кишки белых крыс / В. Арав, А. Бутов, В. Журавлев [и др.] // Вест. нов. мед. техн. — 2002. — Т. 9, №2. — С. 23-24. 3. Коррекция пептидами эпифиза нарушений суточных биоритмов секреции мелатонина и тимического сывороточного фактора у практически здоровых людей пожилого возраста / О. В. Коркушко, Г. М. Бутенко, И. Ф. Лабунец [и др.] // Пробл. старения и долголетия. — 2006. — Т. 15, № 1. — С. 23—25. 4. Лемко О. І. Роль циркадіанних ритмів в адаптаційних реакціях організму та розвитку патології / О. І. Лемко, М. М. Сливканич, І. І. Лемко, В. М. Турлик // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту, серія “Медицина”. — 2002. — Вип. 17. — С. 91—97. 5. Пішак В. П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації / В. П. Пішак. — Чернівці: Медакадемія, 2003. — 152 с. 6. Писарук А.В. Регуляторные ритмы гемодинамики: возрастные изменения / А.В. Писарук // Пробл. старения и долголетия. — 2002. — Т. 11, №11. — С. 3-11. 7. Рендаков Н. А. Влияние возраста, различных режимов освещения, мелатонина и эпифиза / Н. А. Рендаков, Н. Н. Тютюнник, И. А. Виноградова // Успехи геронтологии. — 2006. — Вып. 19. — С. 72 — 78. 8. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease / G. Benitez-King // J. Pineal Res. — 2006. — Vol. 40, N 1. — P. 1—9. 9. Melatonin: potential utility for improving public health / J. Reiter, F. Gultekin, J. Flores [et al.] // The Preventive Medicine Bulletin. — 2006. — Vol. 5. — P. 131—158. 10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy / E.S. Reynolds // J. Cell. Biol. - 1993. - Vol.17. - P. 208-212. 11. Touitou Y. Human aging and melatonin. Clinical relevance / Y. Touitou // Exp. Gerontol. — 2001. — Vol. 36, N 7. — P. 1083 — 1100. 12. Venerucci F. Histopathology kits: methods and applications / F. Venerucci. — Bologna, Milan: Bio-Optica, 2001. — 95p.

### КОРРЕКЦИЯ МЕЛАТОНИНОМ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРО- И УЛЬТРАМИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭПИФИЗА МОЗГА СТАРЫХ КРЫС ПРИ УСЛОВИИ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Ю. В. Ломакина, Н. В. Черновская

**Резюме.** Работа выполнена с целью определения особенностей нарушения морфологической структуры пинеалоцитов старых крыс, которые находились в условиях длительного светового режима и иммобилизационного стресса. Установлено, что в условиях круглосуточного постоянного освещения микро- и ультрамикроскопическая организация пинеалоцитов свидетельствует о выраженных нарушениях реактивного характера. В частности, количество темных пинеалоцитов при гиподисфункции шишковидной железы увеличивается вдвое в сравнении с контрольной группой животных. Субмикроскопические изменения характеризуют угнетение функциональной активности эпифиза мозга. У стрессированных крыс на фоне гиподисфункции шишковидной железы количество светлых клеток еще более прогрессивно уменьшается при доминировании темных, что подтверждается на электронномикроскопическом уровне. Введение мелатонина улучшило функциональную активность пинеалоцитов.

**Ключевые слова:** шишковидная железа, мелатонин, микро- и ультрамикроскопическое строение, гиподисфункция эпифиза, старые крысы.

### MELATONIN CORRECTION OF STRESS-INDUCED MICRO- AND MACRO ULTRASCOPIC CHANGES OF THE PINEAL GLAND OF OLD RATS UNDER THE CONDITIONS OF PERMANENT LIGHTING

Yu. V. Lomakina, N. V. Chernovskaya

**Abstract.** The paper has been carried out for the purpose of determining the specific characteristics of the morphologic structure of rat pinealocytes which were exposed to a prolonged photoperiod and immobilizing stress. It has been established that the micro- and ultramicroscopic organization of pinealocytes under conditions of a round-the-clock permanent lighting is indicative of marked disturbances of a reactive nature. In particular, the number of dark pinealocytes increases twice compared with the control group of animals in case of pineal hypofunction. Submicroscopic changes characterize an inhibition of the functional activity of the cerebral epiphysis. In stressed animals with underlying pineal hypofunction the number of light cells still progressively diminishes with a predominance of the dark ones, the latter being confirmed at the electron microscopic level. Melatonin injections have brought about an improvement of the functional activity of pinealocytes.

**Key words:** pineal gland, melatonin, micro- and ultramicroscopic structure, hypofunction of pineal gland, old rats.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

*Clin. and experim. pathol.* - 2009. - Vol.8, №3. - P.43-47.

Надійшла до редакції 20.09.2009

Рецензент – проф. І. І. Заморський

© Ю. В. Ломакіна, Н. В. Черновська, 2009