

ЗАЛЕЖНІСТЬ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ПІНЕАЛОЦИТІВ У ЩУРІВ ВІД СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ

Пішак В. П., Булик Р. Є.

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Останнім часом доведено, що всі біологічні ритми ссавців знаходяться в чіткій підпорядкованості основному водію ритмів, розташованому у вентролатеральному відділі супрахіазматичних ядер гіпоталамуса [1]. Через ретиногіпоталамічний тракт ядра одержують інформацію про зовнішню освітленість і задають ендогенну ритмічність [2]. Гормоном, що постачає інформацію про ритми до органів і тканин, є мелатонін [3, 4], який синтезується в шишкоподібній залозі, сітківці, ціліарному тілі ока та в органах шлунково-кишкового тракту [5, 6]. Проте, рівень концентрації його в плазмі залежить, у першу чергу, від епіфізарної активності. На продукцію мелатоніну шишкоподібною залозою вагомий вплив здійснює зовнішнє освітлення [7, 8]. У світловий проміжок доби ГАМК-ергічна проєкція з супрахіазматичних ядер на шишкоподібну залозу пригнічує вивільнення медіаторів (норадреналіну, нейропептиду Y) у нейрозалозистих закінченнях і секрецію мелатоніну [9]. У темряві з симпатичних нервів активно вивільняється нейротранс-

мітер норадреналін і діє на мембрану пінеалоцитів, що в подальшому призводить до підвищення синтезу епіфізарного мелатоніну, максимум якого спостерігається близько 02.00 год [10, 11].

Про важливу роль шишкоподібної залози в регуляції спряження з фотоперіодизмом біологічних ритмів та адаптаційних процесів до дії різних стресорів свідчать ультраструктурні зміни пінеалоцитів у щурів під впливом світла та інших чинників [8]. Критерієм активності шишкоподібної залози на морфологічному рівні є такі показники, як об'єм ядер і ядерець, характер каріоплазми, стан органел, агранулярного, гранулярного та пластівцевоподібного вмісту секреторних міхурців, осміофільні включення пінеалоцитів [12]. Однак, механізми порушень діяльності шишкоподібної залози за умов різної тривалості світлового періоду у циркадіанному аспекті вивчені недостатньо. Метою нашої роботи було з'ясування ультраструктурних змін пінеалоцитів у циркадіанній залежності при різному режимі освітлення.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проведено на 36 статевозрілих самцях безпородних білих щурів вагою 150–180 г. Тварин утримували у твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Об'єктом дослідження в експериментальних тварин обрано шишкоподібну залозу.

Експериментальних тварин було поділено на дві серії, у кожній з яких забір біоматеріалу здійснювався о 14.00 і о 02.00 год. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю шишкоподібної залози у вказані часові періоди доби.

Тварини I серії 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). Щури II серії перебували за умов світлової депривації — тривалої темряви (DD-моделювання гіперфункції шишкоподібної залози) впродовж семи діб. Тварини III серії перебували за умов постійного освітлення (LL-моделювання гіпофункції шишкоподібної залози) впродовж семи діб. Наступного дня після закінчення семиденного експерименту о 14.00 і 02.00 год здійснювали виведення тварин з експе-

рименту шляхом одномоментної декалітації під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревинно).

Для електронно-мікроскопічного дослідження шишкоподібної залози забір матеріалу проводили згідно з загальноприйнятими правилами [13]. Після трепанації вилучали залозу і фіксували її в 2,5% розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією середовища рН 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 [4]. Дослідження у інтактних тварин у нічний період доби та у щурів II серії проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну шишкоподібною залозою [14]. Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Європейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Субмікроскопічні дослідження епіфіза мозку контрольних тварин показали, що у складі його часточок лежать пінеалоцити і астроцити. О 14.00 год в цитоплазмі пінеалоцитів переважають невеликі різної форми осміофільні гранули (круглі, округло-овальні, видовжені). Спостерігається також невелика кількість середніх розмірів і великих гранул, які електроннощільні і неправильної форми. У каріоплазмі округло-овальних ядер є великі ядерця, біля них значна кількість рибосомальних гранул. Вони розсіяні по всьому ядру, грудочок гетерохроматину небагато. Каріолема має відносно рівномірний перинуклеарний простір, проте є локальні його потовщення. Візуа-

лізується багато ядерних пор. Такі ультраструктурні ознаки ядра свідчать про синтетичну активність. Відомо, що у світлий проміжок доби залозою інтенсивно продукується серотонін [1].

У цитоплазмі пінеалоцитів багато невеликих і середньої величини довгастої форми мітохондрій, що містять помірно осміофільний матрикс та добре структуровані мембрани і кристи.

Електронно-мікроскопічним дослідженням шишкоподібної залози тварин, які перебували за стандартних умов освітлення о 02.00 год встановлено, що пінеалоцити містять ядра неправильної форми з явищами інвагінацій, деякі з них глибо-

кі, внаслідок чого ядро набуває посіченого вигляду (рис. 1). Наявні окремі грудочки гетерохроматину. Інтенсивно осміюфільне ядрце досить великих розмірів. У каріолемі спостерігається осередково розширений перинуклеарний простір. У цитоплазмі наявні осміюфільні пластівцеподібні різної величини гранули. Осміюфільна гіалоплазма містить нерівномірно розширені каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, дрібні мітохондрії з електроннощільним матриксом і нечіткими кристами.

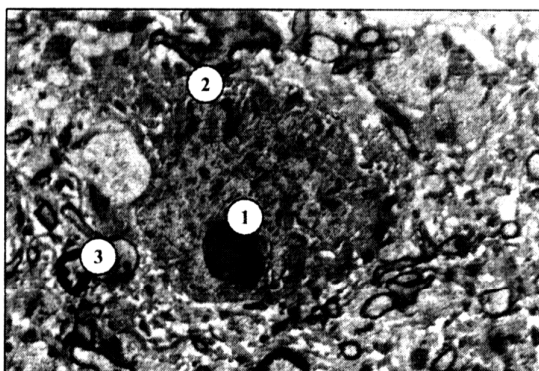


Рис. 1. Субмікроскопічна організація темного пінеалоцита щура контрольної групи о 02.00 год, $\times 10\ 000$.

1 — ядро з ядрцем; 2 — секреторні гранули; 3 — мієлінові нервові волокна.

Субмікроскопічним дослідженням пінеалоцита щура при цілодобовій темряві о 14.00 год експерименту встановлено реактивні зміни компонентів ядра: каріолема втрачає чітку контурованість, утворює інвагінації, погано виражені ядерні пори, помірно розширений перинуклеарний простір. У цитоплазмі спостерігаються пошкоджені мітохондрії з просвітленим матриксом і редукованими кристами, розширеними каналцями ендоплазматичного ретикулуму, окремими лізосомами. Нечисельні секреторні гранули серотоніну не такі електронно щільні, як у контрольній групі. Описані вище ультраструктурні зміни мають реактивний характер і свідчать про порушення секреторної функції пінеалоцитів.

Ультраструктурні дослідження пінеалоцитів о 02.00 год за умов світлової депривації встановили наявність в часточках епіфіза мозку світлих і темних клітин (рис. 2).

Темні пінеалоцити мають субмікроскопічні зміни деструктивного характеру: каріолема втрачає чітку контурованість мембрани, погано виявлені ядерні пори, в каріоплазмі переважає гетерохроматин, цитоплазма містить пошкоджені мітохондрії з електроннощільним матриксом і зруйнованими кристами. В ядрах світлих пінеалоцитів переважає еухроматин, спостерігаються грудочки гетерохроматину. У каріолемі наявні ядерні пори. Цитоплазма пінеалоцитів має гіпертрофовані мітохондрії з просвітленим матриксом і частково редукованими кристами, гранули у вигляді пластівців. Помірно розширені цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулуму і диктіосоми комплексу Гольджі свідчать про функціональну активність світлих пінеалоцитів.

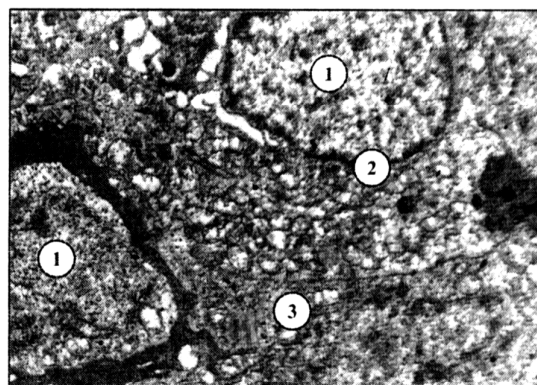


Рис. 2. Ультраструктура пінеалоцита щура о 02.00 год при цілодобовій темряві, $\times 13\ 000$.

1 — ядро з грудками гетерохроматину; 2 — розширений перинуклеарний простір; 3 — пошкоджені мітохондрії.

Цілодобове освітлення як стресовий чинник пригнічує секреторну активність пінеалоцитів щурів. О 14.00 год експерименту ядра темних пінеалоцитів невеликих розмірів, посічені інвагінаціями, у каріолемі нечітко виявляються ядерні пори, у каріоплазмі переважає гетерохроматин. Гіпертрофоване ядрце ущільнене і різко осміюфільне. Цитоплазма темних клітин має електронно щільну гіалоплазму, заповнена зруйнованими органелами різної електронної щільності.

У каріоплазмі ядер світлих пінеалоцитів переважає еухроматин, а у каріолемі спостерігається невелика кількість ядерних пор.

ядерце — ущільнене, осміофільне. У цитоплазмі наявні поодинокі дрібні осміофільні гранули, мітохондрії неправильної форми містять просвітлений матрикс і короткі кристи. Такий морфологічний стан підтверджує зниження функціональної активності світлих пінеалоцитів при цілодобовому освітленні.

О 02.00 год експерименту при цілодобовому освітленні у світлих пінеалоцитах щурів субмікроскопічно встановлені реактивні зміни (рис. 3). Каріолема пронизана глибокими інвагінаціями, місцями розширюється перинуклеарний простір, гіпертрофоване ядерце електроннощільного вигляду. Примембранний гетерохроматин утворює вузьку смужку. Ядерна оболонка має чіткі мембрани, наявні поодинокі ядерні пори. У світлій цитоплазмі розташовані помірно розширені цистерни комплексу Гольджі і каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, невеликі і окремі гіпертрофовані мітохондрії, поодинокі рибосоми, незначна кількість дрібних гранул, які нагадують пластівці, а також мієліноподібні структури. У цей термін дослідження в часточках шишкоподібної залози наявні також темні пінеалоцити, які за субмікроскопічною організацією подібні до клітин попереднього дослідження. Вказані ультраструктурні ознаки свідчать про істотне зменшення секреторних процесів шишкоподібної залози в нічний часовий інтервал, порівняно з контрольною групою щурів.

Порівнюючи гістологічні препарати слід зазначити, що більш істотні зміни ультраструктурної організації пінеалоцитів спостерігаються у тварин, які перебували за умов

постійного тривалого освітлення, ніж при світловій депривації. Загальновідомо, що секреція епіфізарного індоламіну мелатоніну підпорядкована чіткій циркадіанній періодичності з максимумом вночі та мінімумом вдень [3, 6]. Десинхроноз діяльності секретуювальних клітин шишкоподібної залози при різній тривалості фотоперіоду, ймовірно, зумовлений порушеннями добового ритму пейсмейкера (супрахіазматичних ядер) і продукції епіфізарного хронорегуляторного гормону мелатоніну, який синхронізує організм із світловим і темновим проміжком доби.

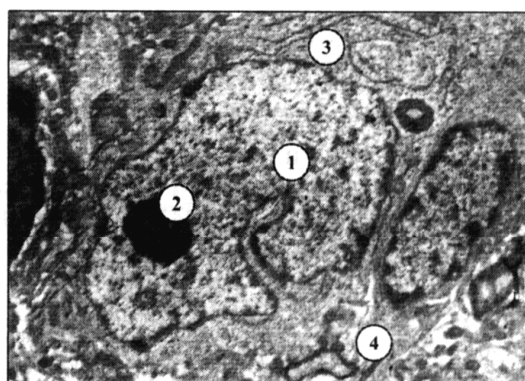


Рис. 3. Ультраструктурні зміни пінеалоцита щура при цілодобовому освітленні о 02.00 год, $\times 10\ 000$.

1 — інвагіноване ядро; 2 — електроннощільне ядерце; 3 — каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму; 4 — мієліноподібні структури.

Отримані результати дозволять у подальшому глибше пізнати участь центральних апаратів у механізмах циркадіанних ритмів головного мозку ссавців.

ВИСНОВКИ

1. У щурів, що перебували за умов світлової депривації, ультраструктурна організація шишкоподібної залози характеризується збереженням ритмічності та зростанням функціональної активності світлих пінеалоцитів о 02.00 години і зниженням о 14.00 години.

2. За умов цілодобового постійного освітлення субмікроскопічна організація піне-

алоцитів характеризується більш вираженими порушеннями реактивного характеру на тлі пригнічення біосинтетичних внутрішньоклітинних процесів. Зокрема, о 02.00 год це структурно проявляється гіпертрофованими мітохондріями і зменшенням числа рибосом, помірно розширеними цистернами комплексу Гольджі і каналцями гранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Заморский И. И.* Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга / И. И. Заморский, В. П. Пишак // Успехи физиол. наук. — 2003. — Т. 34, № 4. — С. 37–53.
2. *Neurochemistry of mammalian entrainment: Signal transduction pathways in the suprachiasmatic nuclei* / D. A. Golombek, G. A. Ferreyra, M. E. Katz et al. // *Biol. Rhythm Res.* — 2000. — Vol. 31, № 1. — P. 56–70.
3. *Анисимов В. Н.* Мелатонин: перспективы применения для профилактики рака и преждевременного старения // Вестник восстановительной медицины. — 2007. — № 1 (19). — С. 4–7.
4. *Ekmekcioglu C.* Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance // *Biomed. Pharmacother.* — 2006. — Vol. 60, № 3. — P. 97–108.
5. *Li X. D.* Molecular rhythms in the pineal gland / X. D. Li, J. Borjigin, S. H. Snyder // *Current Opinion in Neurobiol.* — 1998. — Vol. 8, № 5. — P. 648–651.
6. *Reiter R. J.* Melatonin: clinical relevance // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metabol.* — 2003. — Vol. 17, № 2. — P. 273–28.
7. *Комаров Ф. И.* Мелатонин в норме и патологии // Ф. И. Комаров, С. И. Рапопорт, Н. К. Малиновская, В. Н. Анисимов. — М.: ИД Медпрактика-М, 2004. — 308 с.
8. *Копылова Г. Ф.* Влияние фотопериодов на ультраструктуру пинеалоцитов мышей разного возраста: выявление мелатонина / Г. Ф. Копылова, И. Ф. Лабунец // Пробл. старения и долголетия. — 2004. — Т. 13, № 4. — С. 486–493.
9. *GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat* / A. Kalsbeek, R. Cutrera, G. van Heerikhuizen et al. // *Neuroscience.* — 1999. — Vol. 91. — P. 453–461.
10. *Пишак В. П.* Механізми участі шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанної ритмічності фізіологічних функцій / В. П. Пишак, Р. Є. Булик // Бук. мед. вісник. — 2006. — Т. 10, № 4. — С. 5–8.
11. *Arendt J.* Melatonin: characteristics, concerns, and prospects // *J. Biol. Rhythms.* — 2005. — Vol. 20. — P. 291–303.
12. *Comparative histology of pineal calcification* / B. Vight, A. Szel, C. Debrececi et al. // *Histol. Histochemol.* — 1998. — Vol. 13, № 3. — P. 851–870.
13. *Каруту В. Я.* Электронная микроскопия. — К.: Вища школа, 1984. — 208 с.
14. *Бондаренко Л. А.* Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру пинеальной железы у кроликов / Л. А. Бондаренко, Г. И. Губина-Вакулик, Н. Н. Сотник, А. Р. Геворкян // Пробл. эндокрин. пат. — 2005. — № 4. — С. 38–45.

ЗАЛЕЖНІСТЬ УЛЬТРАСТРУКТУРИ ПІНЕАЛОЦИТІВ
У ЩУРІВ ВІД СВІТЛОВОГО РЕЖИМУ

Пишак В. П., Булик Р. Є.

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Досліджено особливості ультраструктурних порушень клітин шишкоподібної залози щурів, які перебували за різної тривалості світлового режиму. Встановлено, що при постійній темряві ультраструктурна організація шишкоподібної залози характеризується збереженням ритмічності та зростанням функціональної активності світлих пинеалоцитів о 02.00 години і зниженням о 14.00 години. За умов цілодобового постійного освітлення субмікроскопічна організація пинеалоцитів характеризується більш вираженими порушеннями реактивного характеру на тлі пригнічення біосинтетичних внутрішньоклітинних процесів. Зокрема, о 02.00 години це структурно проявляється гіпертрофованими мітохондріями і зменшенням числа рибосом, помірно розширеними цистернами комплексу Гольджі і канальцями гранулярного ендоплазматичного ретикулуму.

К л ю ч о в і с л о в а : фотоперіод, шишкоподібна залоза, ультраструктура.

ЗАВИСИМОСТЬ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ПИНЕАЛОЦИТОВ У КРЫС ОТ СВЕТОВОГО РЕЖИМА

Пишак В. П., Булык Р. Е.

Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы

Изучены особенности ультраструктурных нарушений шишковидной железы крыс, находящихся в условиях разной длительности светового режима. Установлено, что при постоянной темноте ультраструктурная организация шишковидной железы характеризуется сохраненной ритмичностью и возрастанием функциональной активности светлых пинеалоцитов в 02.00 ч и снижением в 14.00 ч. В условиях круглосуточного постоянного освещения субмикроскопическая организация пинеалоцитов характеризуется более выраженными нарушениями реактивного характера на фоне угнетения биосинтетических внутриклеточных процессов. В 02.00 ч это структурно проявляется гипертрофированными митохондриями и уменьшением числа рибосом, умеренно расширенными цистернами комплекса Гольджи и канальцами гранулярного эндоплазматического ретикулума.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фотопериод, шишковидная железа, ультраструктура.

DEPENDENCE OF THE ULTRASTRUCTURE OF PINEALOCYTES IN RATS ON THE LIGHT REGIMEN

Pishak V. P., Bulyk R. Ye.

Bukovinian State Medical University, Chernivtsi

The paper has been carried out for the purpose of ascertaining the specific characteristics of ultrastructural abnormalities of the pineal gland in rats under a diverse duration of the photoperiod. It has been established that the ultrastructural organization of the pineal gland under permanent darkness is characterized by preserved rhythmicity and an increase of the functional activity of light pinealocytes at 02.00 a. m. and a decrease at 02.00 p. m. The submicroscopic organization of pinealocytes is reflected with more marked disturbances of the reactive type under conditions of round-the-clock permanent lighting against a background of inhibiting biosynthetic intracellular processes. In particular, it is structurally manifested by hypertrophic mitochondria and a decrease of the number of ribosomes, moderately dilated cisterns of the Golgi complex and the tubules of the granular endoplasmic reticulum.

Key words: photoperiod, pineal gland, ultrastructure.