

В.П. Пішак
Р.Є. Булик

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ХРОНОМІКРОСКОПІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПІНЕАЛОЦИТІВ В УМОВАХ ГІПОФУНКЦІЇ ШИШКОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Ключові слова: постійне освітлення, шишкоподібна залоза, морфологічна структура.

Резюме. Робота виконана з метою визначення особливостей порушень морфологічної структури пінеалоцитів щурів, які перебували за тривалого світлового режиму. Встановлено, що в умовах цілодобового постійного освітлення мікроскопічна організація пінеалоцитів свідчить про виражені порушення реактивного характеру на тлі пригнічення біосинтетичних внутрішньоклітинних процесів. Зокрема, о 14.00 год виявляються здебільшого темні пінеалоцити, що містять вузький обідок прозорій чи еозинофільній цитоплазми і невелике, неправильної чи округлої форми ядро. Ін'єкції синтетичного епіфізарного тетрапептиду епіталону призвели до покращання функціональної активності пінеалоцитів. Це проявилось збільшенням кількості світлих пінеалоцитів, які характеризувалися інтенсивно прозорою чи помірно базифільною цитоплазмою, ядрами округло-овальної чи еліпсоподібної форми, з чітко помітними ядерцями в їх каріоплазмі.

Вступ

Відомо, що провідним пейсмейкером (водієм ритму) циркадіанного періодизму у ссавців є супрахіазматичні ядра (СХЯ) переднього гіпоталамуса [3]. Інформація про зовнішню освітленість надходить у СХЯ по ретинігіпоталамічному тракту, які в подальшому задають ендогенну ритмічність [10]. У регуляції спряження з фотоперіодизмом біологічних ритмів та адаптаційних процесів до дії різних чинників у ссавців відіграє важливу роль шишкоподібна залоза. Нею синтезується основна кількість хронорегуляторного гормону - мелатоніну, що постачає інформацію про ритми до органів і тканин [1,9]. На продукція мелатоніну шишкоподібною залозою вагомий вплив здійснює зовнішнє освітлення [5,6]. У світловий проміжок доби ГАМК-ергічна проекція з супрахіазматичних ядер на шишкоподібну залозу пригнічує вивільнення медіаторів (норадреналіну, нейропептиду Y) у нейрозалозистих закінченнях і секрецію мелатоніну [11]. Водночас у темряві з симпатичних нервів активно вивільняється нейротрансмітер норадреналін і діє на мембрану пінеалоцитів, що в подальшому призводить до підвищення синтезу епіфізарного мелатоніну, максимум якого спостерігається близько 02.00 год [7,8].

Про важливу роль хроноритморегулювальну роль шишкоподібною залозою свідчать ультраструктурні зміни пінеалоцитів у щурів при впливі світла та інших чинників [6, 14]. Однак механізми порушень діяльності шишкоподібною залозою за умов різної тривалості світлового періоду у циркадіанному аспекті вивчені недостатньо.

© В.П.Пішак, Р.Є. Булик, 2008

На основі аналізу даних про амінокислотний склад пептидів шишкоподібною залозою в Санкт-Петербурзькому Інституті біорегуляції і геронтології ПЗО РАМН сконструйований і синтезований тетрапептид - епіталон. Попередні дослідження показали, що він володіє онкостатичною, антиоксидантною та геропротекторною дією [1]. Відомості, що віддзеркалюють ефекти епіталону на морфологічні зміни в шишкоподібною залозі при тривалій експозиції світлом відсутні.

Мета дослідження

З'ясувати хронорморфологічні зміни пінеалоцитів при гіпофункції шишкоподібною залозою.

Матеріал і методи

Експерименти проведені на 36 статевозрілих самцях безпородних білих щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували в твариннику при сталій температурі, вологості повітря та вільному доступі до води і їжі. Об'єктом дослідження в експериментальних тварин обрано шишкоподібною залозу.

Експериментальні тварини поділені на три серії. Тварини першої серії перебували 7 діб за умов стандартного світлового режиму - LD (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 лк). Щури другої серії перебували за умов постійного освітлення (LL - моделювання гіпофункції шишкоподібною залозою) впродовж 7-ми діб. Тварини третьої серії знаходилися в умовах, як і щури другої серії, які щоденно о 19.00 год підшкірно отримували ін'єкцію епіталону (Санкт-Петербурзький інститут біо-

регуляції і геронтології ІІЗО РАМН, Росія) у дозі 0,5 мкг/кг, у 0,5 мл фізіологічного розчину.

З метою виявлення морфологічних відмінностей пінеалоцитів та враховуючи циклічність продукції мелатоніну евтаназію щурів виконували з 12-годинним інтервалом (о 02.00 год, коли функціональна активність шишкоподібної залози максимальна та о 14.00 год, коли спостерігається її гіпофункція) шляхом одномоментної декапітації на 8-му добу під етаміналовим наркозом (40,0 мг/кг внутрішньоочеревинно). Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Гельсінської декларації про гуманне ставлення до тварин.

Шишкоподібні залози фіксували у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 48-ми годин, після чого виконували зневоднювання у спиртах та парафінову заливку. Парафінові зрізи 5 мкм завтовшки фарбували гематоксиліном і еозином. Дослідження в інтактних тварин у нічний період доби та в щурів другої серії проводили при слабкому (2 лк) червоному світлі, яке практично не впливає на біосинтез мелатоніну шишкоподібною залозою [2]. Всі етапи експерименту проведено з дотриманням основних вимог Євро-

пейської конвенції щодо гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986).

Обговорення результатів дослідження

При вивченні структури шишкоподібної залози у статевозрілих тварин виявлено пінеалоцити різних типів, які спостерігаються незалежно від періоду доби. У полі зору мікроскопа виявляються великі світлі, малі темні і перехідні форми пінеалоцитів, однак співвідношення між ними істотно залежить від тривалості фотоперіоду.

Мікроскопічні дослідження шишкоподібної залози тварин в умовах стандартного режиму освітлення показали, що о 14.00 год у складі нейротрансдуктора наявні як світлі, так і темні пінеалоцити. Пінеалоцити малого розміру розташовані щільно. Індоламінпродукувальні пінеалоцити інтенсивно темні, різної форми, ядрця не візуалізуються. Цитоплазма малооб'ємна, у вигляді вузького прозорого обідка оточує невелике неправильної форми ядро. Перикаріони таких клітин невеликі, базофільно забарвлені. Поліпептидпродукувальні пінеалоцити мають великі округлі ядра з помірно базофільною каріоплазмою, а цитоплазма набуває сітчасто-пінистого вигляду (рис. 1 а).

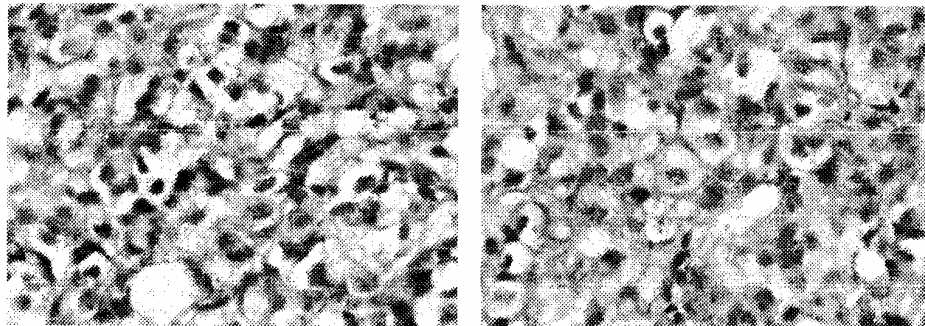


Рис. 1. Мікроскопічна організація шишкоподібної залози тварин в умовах стандартного фотоперіоду: а - о 14.00 год, пригнічення внутрішньоклітинних індоламінпродукувальних процесів у пінеалоцитах; б - о 02.00 год, багато великих клітин з оптично прозорою цитоплазмою. Забарвлення гематоксиліном-еозином. х 600

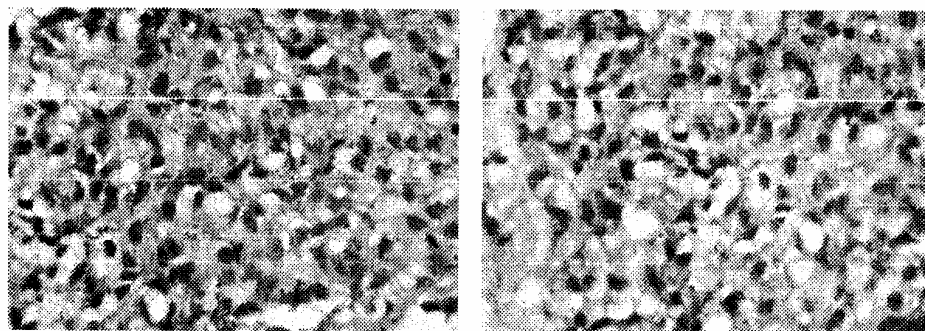


Рис. 2. Зміни структурної організації шишкоподібної залози щурів, викликані світловим стресом: а - о 14.00 год, у полі зору велика кількість темних пінеалоцитів; б - о 02.00 год, у складі залози помітні світлі та темні пінеалоцити. Забарвлення гематоксиліном-еозином. х 600

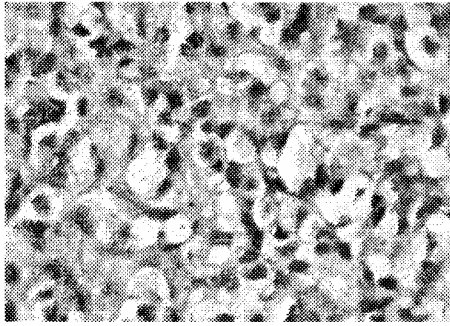


Рис. 3. Гістологічний стан пінеалоцитів тварини при уведенні епіталону на фоні гіпофункції шишкоподібної залози. Багато світлих пінеалоцитів у складі залози. Забарвлення гематоксилином еозином. x 600

Поміж тим, знеживлення тварин о 02.00 год при стандартному світловому періоді дало змогу з'ясувати деякі відмінності структури шишкоподібної залози. Гістологічним дослідженням епіфіза мозку в цей період встановлено значну кількість великих і середнього розміру пінеалоцитів з об'ємними, інтенсивно забарвленими ядрами. Останні оточені світлою цитоплазмою, яка має слабкопінистий вигляд чи оптично прозора. Ядра неправильної форми, у каріоплазмі дифузно розподілений хроматин у дрібнодисперсному стані. Ці нейроендокриноцити концентруються в місцях розташування кровоносних капілярів. Перелічені цитологічні ознаки вказують на вираженість внутрішньоклітинних індоламінсинтезувальних процесів (рис. 1 б). Крім великих трапляються малого розміру пінеалоцити. Ці клітини розташовані у вигляді острівців, містять округле гетерохромне ядро та еозинофільну цитоплазму. Стан цього типу пінеалоцитів свідчить про зниження синтезу пінеальних пептидів у нічний період експерименту.

Дослідження гістологічних препаратів шишкоподібної залози о 14.00 год у тварин, які знаходилися в умовах тривалої світлової стимуляції показали протилежні зміни в структурі шишкоподібної залози. На зрізі виявлено багато темних пінеалоцитів. Вони містять вузький обідок прозорої чи еозинофільної цитоплазми і невелике ядро, відповідно, неправильної чи округлої форми. Високоактивні клітини практично відсутні. Ймовірно, це відображає реакцію на семидобовий світловий стрес і вказує на пригнічення вироблення гормонів (рис. 2 а).

При утримуванні щурів в умовах тривалого фотоперіоду о 02.00 год мікроскопічно спостерігається картина, подібна до попереднього проміжку дослідження. Переважають пінеалоцити з інтенсивним забарвленням цитоплазми і ядер.

Проте наявні поодинокі світлі клітини, що мають більші розміри й оптично прозору цитоплазму. При цьому зменшується розмір ядер цих клітин, хроматин набуває грубодисперсного характеру, а ядерця погано диференціюються. Подібні зміни ймовірно свідчать про гальмування внутрішньоклітинних синтетичних процесів, зокрема мелатоніну (рис. 2 б).

При щоденному уведенні синтетичного тетрапептиду епіталону щурам, які перебували при постійному освітленні виявлено ознаки покращання функціональної активності пінеалоцитів. У складі досліджуваної структури менше темних клітин, ніж при аналізі мікропрепарату епіфіза мозку тварин, які зазнали дії світлового стресу без ін'єкцій епіталону. Наявні світлі пінеалоцити як з інтенсивно прозорою цитоплазмою, так і помірно базофільною. Ядра таких клітин мають округло-овальну чи еліпсоподібну форми, помірно базофільно зафарбовані. В їх каріоплазмі спостерігаються ядерця. Наведена картина дозволяє дійти висновку про підвищення епіталонем синтетичної активності пінеалоцитів (рис. 3).

Висновки

1. У тварин, що перебували в умовах стандартного фотоперіоду у нічний період експерименту структурна організація шишкоподібної залози віддзеркалює вираженість внутрішньоклітинних індоламінсинтезувальних процесів та зниження синтезу пінеальних пептидів. О 14.00 год морфологічна будова відзначається зворотним характером.

2. В умовах цілодобового постійного освітлення мікроскопічна організація пінеалоцитів свідчить про виражені порушення реактивного характеру на тлі пригнічення біосинтетичних внутрішньоклітинних процесів. Зокрема, о 14.00 год виявляються здебільшого темні пінеалоцити, що містять вузький обідок прозорої чи еозинофільної цитоплазми і невелике, неправильної чи округлої форми ядро.

3. Ін'єкції синтетичного епіфізарного тетрапептиду епіталону призвели до покращання функціональної активності пінеалоцитів. Це проявилось збільшенням кількості світлих пінеалоцитів, які характеризувалися інтенсивно прозорою чи помірно базофільною цитоплазмою, ядрами округло-овальної чи еліпсоподібної форми, з чіткими помітними ядерцями в їх каріоплазмі.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується провести ультрамікроскопічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження структури шишкоподібної залози за

зміненого фотоперіоду з метою глибшого розуміння місця і ролі цього провідного нейроендокринного трансдуктора у механізмах циркадіанних ритмів головного мозку вищих хребетних.

Література. 1. *Анисимов В.Н.* Мелатонин: перспективы применения для профилактики рака и преждевременного старения // *Вестник восстановительной медицины.* - 2007. - №1 (19). - С.4-7. 2. *Бондаренко Л.А., Губина-Вакулик Г.И., Сотник Н.Н., Геворкян А.Р.* Влияние постоянного освещения на суточный ритм мелатонина и структуру pineальной железы у кроликов // *Пробл. эндокринной патологии.* - 2005. - №4. - С.38-45. 3. *Заморский И.И., Пишак В.П.* Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга // *Успехи физиол. наук.* - 2003. - Т.34, №4. - С.37-53. 4. *Каруну В.Я.* Электронная микроскопия. - К.: Вища школа / Головное изд-во, 1984. - 208 с. 5. *Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., Малиновская Н.К., Анисимов В.Н.* Мелатонин в норме и патологии. - М.: ИД Медпрактика-М, 2004. - 308 с. 6. *Копылова Г.Ф., Лабунец И.Ф.* Влияние фотопериодов на ультраструктуру pineалоцитов мышей разного возраста: выявление мелатонина // *Пробл. старения и долголетия.* - Т.13, №4. - С.486-493. 7. *Пишак В.П., Булик Р.С.* Механізми участі шишкоподібної залози в забезпеченні циркадіанної ритмічності фізіологічних функцій // *Бук. мед. вісник.* - 2006. - Т.10, №4. - С. 5-8. 8. *Arendt J.* Melatonin: characteristics, concerns, and prospects // *J. Biol. Rhythms.* - 2005. - Vol.20. - P.291-303. 9. *Ekmekcioglu C.* Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance // *Biomed. Pharmacother.* - 2006. - Vol.60, N3. - P.97-108. 10. *Golombek D.A., Ferreyra G.A., Katz M.E. et al.* Neurochemistry of mammalian entrainment: Signal transduction pathways in the suprachiasmatic nuclei // *Biol. Rhythm Res.* - 2000. - Vol.31, N1. - P.56-70. 11. *Kalsbeek A., Cutrera R., van Heerikhuizen G. et al.* GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals in necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat // *Neuroscience.* - 1999. Vol.91. - P.453-461. 12. *Li X.D., Borjigin J., Snyder S.H.* Molecular rhythms in the pineal gland // *Current Opinion in Neurobiol.* - 1998. - Vol.8, N5. - P.648-651. 13. *Reiter R.J.* Melatonin: clinical relevance // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2003. - Vol. 17, N 2. - P.273-280. 14. *Vight B., Szel A., Debreceni C. et al.* Comparative histology of pineal calcification // *Histol. Histopathol.* - 1998. - Vol.13, N3. - P.851-870.

ХРОНОМИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПИНЕАЛОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ГИПОФУНКЦИИ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В.П. Пишак, Р.Е. Булик

Резюме. Работа выполнена с целью определения особенностей нарушения морфологического строения шишковид-

ной железы крыс, находящихся в условиях длительного светового режима. Установлено, что в условиях круглосуточного постоянного освещения микроскопическая организация pineалоцитов свидетельствует о выраженных нарушениях реактивного характера на фоне угнетения биосинтетических внутриклеточных процессов. В частности, в 14.00 ч проявляются преимущественно темные pineалоциты, содержащие узкий ободок прозрачной или эозинофильной цитоплазмы и небольшое, неправильной или округлой формы ядро. Инъекции синтетического эпифизарного тетрапептида эпифалона привели к улучшению функциональной активности pineалоцитов. Это проявилось увеличением количества светлых pineалоцитов, характеризующихся интенсивно прозрачной или умеренно базофильной цитоплазмой, ядрами округло-овальной или эллипсоидной формы, с четкими ядрышками в кариоплазме.

Ключевые слова: постоянное освещение, шишковидная железа, морфологическая структура.

CHRONOMICROSCOPIC CHARACTERISTIC OF PINEALOCYTES AT CONDITIONS OF PINEAL GLAND HYPOFUNCTION

V.P. Pishak, R.Ye. Bulyk

Abstract. The article has been conducted to determine peculiarities of violation of morphological structure of rats pinealocytes, who were at condition of protracted light regime. It was proved, that at constant day-night time lighting the microscopic organization of pinealocytes shows distinct violations of reactive character on the background of depression of biosynthetic intracellular processes. Thus, at 14.00 p.m. the dark pinealocytes are mostly revealed, they contain thin turn of transparent or eosinophilic cytoplasm and small, irregular or ovoid in shape nucleus. Injections of synthetic epiphysial tetrapeptide - epithalon - lead to improvement of the functional activity of pinealocytes. It was proved by increased amount of light pinealocytes, which were characterized by intensively transparent or moderately basophilic cytoplasm, nuclei oval-round or ellipsoid in shape with distinct nucleoli in karyoplasm.

Key words: constant lighting, pineal gland, morphological structure.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2008. - Vol.7, №2. - P.91-94.

Надійшла до редакції 18.03.2008

Рецензент - проф. В.Ф. Мислицький