

УДК 591. 481. 3.- 019.

Ю. В. Ломакіна

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці**ЕФЕКТИВНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ
ЕПІТАЛОНУ ЗА УМОВ ЗМІНЕНОГО
ФОТОПЕРІОДУ ТА ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО
СТРЕСУ В СТАРИХ ЩУРІВ****Ключові слова:** пінеальна залоза,
імобілізаційний стрес, фотопері-
од, епіталон.**Резюме.** На світлооптичному та електронномікроскопічному рівнях досліджена структура пінеальної залози старих щурів-самців в умовах стандартного світлового проміжку - LD та на фоні повної семидобової темряви за умов одногодинного імобілізаційного стресу. Проаналізована репаративна дія епіталону. Доведено, що застосування епіталону дозволяє досягти суттєвого корегування гістологічних та ультраструктурних змін пінеалоцитів старих щурів, викликаних імобілізаційним стресом на фоні зміненого фотоперіоду.**Вступ**

Дослідження структурних основ функціонування пінеальної залози як складової частини епіталамо-епіфізарного комплексу в старіючого організму є одним із актуальних напрямків патології та геронтології. Відомо, що вона, будучи осцилятором біологічних ритмів, здатна сприймати зовнішні сигнали, такі як освітленість, температура, електромагнітні коливання тощо, інтегрувати та перетворювати в гуморальні стимули, призводячи рівень регуляції у відповідність до змін пори року, дня та ночі, забезпечуючи таким чином гормональний фон, необхідний організму в кожному конкретному випадку [1, 6, 12].

Відомо, що реакція організму на певний достатньо сильний екзогенний чи ендогенний вплив, на різноманітні порушення гомеостазу супроводжується специфічною та неспецифічною відповідями, що реалізуються гіпоталамо-гіпофізарними, ендокринними та іншими шляхами [2, 10]. Імобілізаційний стрес є одним з екзогенних чинників, який при впливі на організм у безвихідних ситуаціях викликає розвиток інтенсивної стрес-реакції. Остання перетворюється з ланки адаптації на загальну ланку патогенезу так званих ендогенних, або стресорних захворювань, які складають одну із головних проблем сучасної медицини [13].

У свою чергу, епіфіз мозку активно залучається у стресорну відповідь та за допомогою різноманітних механізмів сприяє його обмеженню. За останні роки отримані переконливі дані, які свідчать про присутність в епіфізі мозку пептидів, що здатні здійснювати інформаційний зв'язок між різними клітинними групами і, таким чином, впливати на їх активність, особливо за умов стре-

сування [3,7,10]. Одним із таких пептидів є епіталон – це штучно синтезований тетрапептид із його попередника епіталаміну (фармакопейного пептидного препарату пінеальної залози).

Мета дослідження

Провести аналіз корегуючої дії епіталона на функціональну морфологію та ультраструктуру пінеалоцитів у старих щурів, яких утримували при зміненому фотоперіоді та одногодинному імобілізаційному стресі.

Матеріал і методи

Досліди виконано на 40 старих (20-24 міс.) нелінійних щурах-самцях масою 300±10г. Упродовж 1 місяця до початку та протягом експерименту тварин утримували у виварії за умов сталої температури (18-21°C), вологості повітря (50-55%) в окремих клітках із вільним доступом до води та їжі. Імобілізаційний стрес моделювали утримуванням тварин упродовж 1 год у пластикових клітках-пеналах.

Тварин поділили на чотири групи, по 10 щурів у групі: перша – контрольні тварини, які 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; друга – тварини, які перебували 7 діб за умов постійної темряви – DD (цілодобова світлова депривація; декапітацію за цих умов проводили при червоному світлі, оскільки воно практично не має впливу на реакцію біосинтезу мелатоніну в пінеальній залозі); третя – щури, яких утримували при ідентичному освітленні 7 діб та моделювали 1-годинний імобілізаційний стрес на 8 добу; четверта – щури при тому ж освітленні, яким уп-

родовж 3 діб уводили епіталон (СПб.-кий Інститут біорегуляції та геронтології ПЗО РАМН, Росія) у дозі 0,17 мкг/кг в/м о 14.00 год, останнє уведення проводили за 1 год до іммобілізаційного стресу.

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. Парафінові зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином [16]. Документацію морфологічних змін здійснювали за допомогою цифрового фотоапарата Olympus C740UZ та мікроскопа ЛЮМАМ-8.

Кількісний аналіз цифрових зображень виконували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0 (Санкт-Петербург, Росія, 2000 г.). 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, двосторонній). Враховуючи малий об'єм порівнюваних вибірок, для надійності висновків додатково застосували непараметричний критерій Mann-Whitney, який давав значення вірогідності близькі до критерію Стьюдента.

Для електронномікроскопічного дослідження шишкоподібної залози забір матеріалу проводили згідно з загальноприйнятими правилами. Після трепанації черепа вилучали залозу і фіксували її в 2,5 % розчині глутар-альдегіду, який готували 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, упродовж 60 хв здійснювали постфіксацію матеріалу, використавуючи 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

Шляхом мікроденситометричного методу на цифрових копіях зображень тканини шишкоподібної залози за допомогою комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0 здійснили попередні експерименти щодо встановлення емпіричної межі щодо віднесення пінеалоцитів до світлого чи темного типу клітин. У результаті таких експериментів межею обрана величина оптичної густини забарвлення цитоплазми пінеалоцита у 0,065 відн.од. оптичної густини (величина оптичної густини забарвлення «0» відн.од. відповідає абсолютній оптичній прозорості, величина «1» відн.од. – абсолютній оптичній непрозорості). Пінеалоцити із середньою густиною забарвлення цитоплазми менше, ніж 0,065 відн.од. оптичної густини відносили до світлих пінеалоцитів, а із середньою густиною забарвлення цитоплазми у 0,065 відн.од. оптичної густини та вище – до темних пінеалоцитів відповідно.

У контрольній групі співвідношення між світлими та темними пінеалоцитами у середньому становило $64 \pm 0,9\%$: $36 \pm 0,8\%$ (рис. 1 А).

Субмікроскопічні дослідження показали, що для більшості пінеалоцитів характерні округло-овальні ядра з великими осміофільними ядерцями. У каріоплазмі містилися невеликі грудочки гетерохроматину. Каріолема не забулена, має відносно рівномірний перинуклеарний простір, чіткі ядерні пори. У цитоплазмі наявні різної величини, круглі осміофільні гранули серотоніну. Цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулулу розширені, утворюють вакуолеподібні

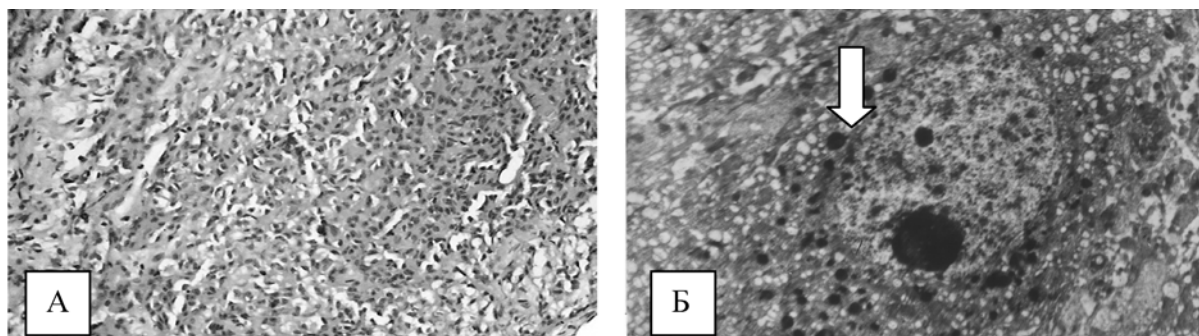


Рис. 1. Гістологічна структура епіфізів старих щурів за умов стандартного світлового проміжку.

А). Контроль. Пояснення в тексті. Мікрофотографії. Об.20^x, Ок.10^x, забарвлення гематоксилін-еозином;

Б). Ультраструктура пінеалоцитів старих щурів x 10 000. Стрілками позначені ядра клітин.

Пояснення в тексті

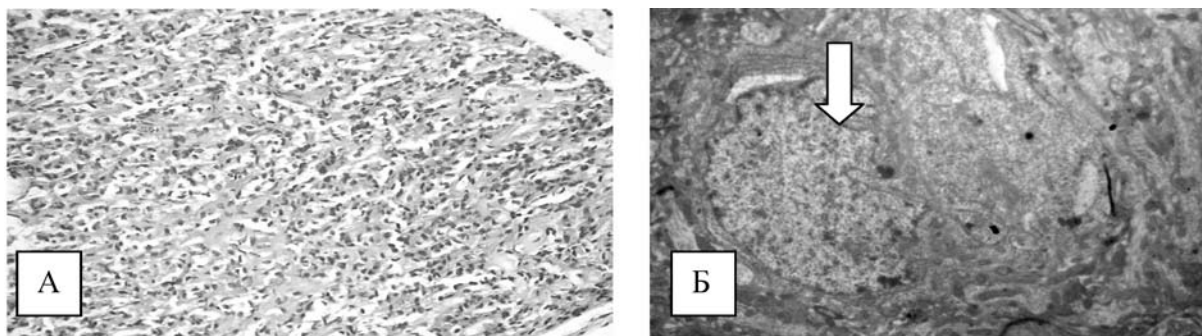


Рис. 2. Гістологічна структура епіфізів старих щурів за умов гіперфункції шишкоподібної залози. А). Пояснення в тексті. Мікрофотографії. Об. 20^{\times} , Ок. 10^{\times} , забарвлення гематоксилін-еозинном; Б). Ультраструктура пінеалоцитів старих щурів х 9 000. Пояснення в тексті. Стрілками позначені ядра клітин

структури, великі мітохондрії, які мають осміофільний матрикс, наявні кристи (рис. 1 Б).

Досліджуючи зміни в пінеалоцитах за умов постійної семидобової темряви встановлено, що співвідношення світлих та темних клітин вірогідно відрізняється від середніх показників контрольної групи тварин та складає $72 \pm 1,3\%$: $28 \pm 1,2\%$ ($p=0,0023$), (рис. 2 А).

Субмікроскопічні результати дослідження пінеалоцитів епіфіза мозку в умовах тривалої темряви дали змогу виявити еухроматин у каріоплазмі, невеликі гранули гетерохроматину. Каріолема нерівна, утворює окремі глибокі інвагінації. У цитоплазмі переважають вузькі каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, проте окремі значно розширені, включають матеріал форми пластівців, невисокої електронної щільності. Ймовірно, це мелатонін, що синтезувався. Мітохондрії переважно витягнутої форми, помірних розмірів. Частина органел має частково просвітлений матрикс (рис. 2 Б). Дані ультраструктурної організації вказують на перевантаження мелатоніном.

Дослідження за умов іммобілізаційного стресу та гіперфункції шишкоподібної залози виявило виражену реакцію пінеалоцитів щурів на вказані умови експерименту. Зокрема, співвідношення між світлими та темними пінеалоцитами змінилося порівняно з контролем на величини $56 \pm 1,2\%$: $44 \pm 1,0\%$ ($p=0,0019$). В ядрах пінеалоцитів відмічено конденсацію ядерного хроматину. Субмікроскопічно, пінеалоцити в таких умовах досліду мають невеликі неправильної форми ядра, у каріолемі яких є багато осміофільних гранул гетерохроматину. Перинуклеарні простори невеликі, ядерних пор мало. У цитоплазмі наявні нерівномірно потовщені, фрагментовані каналці гранулярного ендоплазматичного ретикулуму та цистерни комплексу Гольджі. Довгастої або округло-овальної форми мітохондрії мають небагато крист у помірно електроннощільному матриксі. Спостерігаються лише поодинокі мелатоніновмісні

структури у вигляді пластівців. Низька функціональна активність пінеалоцитів підтверджена описаними змінами субмікроскопічної будови.

За умов корекції представлених змін епіталоном виявлено, що співвідношення світлих до темних клітин змінилося у бік контролю $60 \pm 1,6\%$: $40 \pm 1,5\%$ ($p=0,035$). Субмікроскопічне дослідження також вказує на позитивну динаміку внаслідок уведення епіталоно, що характеризується відновленням форми ядер та структури ядерного хроматину. Каріолема лише місцями зазублена, має відносно рівномірний перинуклеарний простір, чіткі ядерні пори, але їхня кількість менша порівняно з контрольною групою. У цитоплазмі наявні різної величини, круглі осміофільні гранули серотоніну. Цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулуму розширені, утворюють вакуолеподібні структури, великі мітохондрії, мають осміофільний матрикс, але небагато крист. Спостерігаються лише поодинокі мелатоніновмісні структури у вигляді пластівців. Тобто, наведений опис характеризує часткове відновлення ультрамікроскопічних структур після змодельованого іммобілізаційного стресу.

Висновки

1. Зміна фотоперіоду порушує мікроскопічну будову пінеальної залози, зокрема: кількість світлих клітин навпаки збільшилася на 8%, а темних відповідно зменшилась – що вказує на підвищену активність пінеальної залози;

2. Вплив іммобілізаційного стресу характеризується зменшенням світлих клітин ШЗ на 10%, обумовлюючи спад активності досліджуваної залози, що характеризується неправильною формою ядер, у каріолемі яких є багато осміофільних гранул гетерохроматину; в цитоплазмі виявляються лише поодинокі мелатоніновмісні структури у вигляді пластівців.

3. Корекція епіталоном стрес-індукованих змін пінеалоцитів старих щурів на світлооптичному та

ультраструктурному рівнях сприяє ефективному відновленню співвідношення світлих до темних клітин, що змінилося у бік контролю, а також відновленню форми ядер та структури ядерного хроматину, що особливо було виражено за умов іммобілізаційного стресу.

Перспективи подальших досліджень

Дослідити корегуючий вплив мелатоніну на ультра – та мікроскопічні зміни шишкоподібної залози за умов повного освітлення.

Література. 1. Бондаренко Л.О. Значення взаємодії факторів зовнішнього середовища в регуляції функціональної активності пінеальної залози: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук. – Київ, 2003. – 36с. 2. Дмитриева Н.В. Электрофизиологические и информационные аспекты развития стресса / Н.В. Дмитриева, О.С. Глазачев // Успехи физиол. наук. – 2005. – Т. 36, №4. – С. 57-74. 3. Каладзе Н.Н. Физиологические свойства, патогенетическое значение и клиническое применение эпифизарного гормона – мела тонина / Н.Н. Каладзе, Е.М. Соболева // Вест. физиотерап. и курорт. – 2004. – Т.10, №3. – С. 91-98. 4. Кузник Б.И. Цитомедины / Б. Кузник, В. Морозов, В. Хавинсон (25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований). – СПб.: Наука, 1998. – 310 с. 5. Логвинов С.В. Ультраструктура пинеалоцитов у крыс при воздействии света и радиации / С.В. Логвинов, А.В. Герасимов, В.П. Костюченко // Морфология. – 2004. – №1. – С. 71-75. 6. Лысенко А.С. Роль эпифиза в защите организма от повреждения / А.С. Лысенко, Ю.В. Редькин // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т.34, №2. – С. 26-36. 7. Мещишен І.Ф., Пішак В.П., Заморський І.І. Мелатонін: обмін та механізм дії / І.Ф. Мещишен, В.П. Пішак, І.І. Заморський // Бук. мед. вісник. – 2001. – Т.5, №2. – С.3-15. 8. Пішак В.П. Шишкоподібне тіло і біохімічні основи адаптації. – Чернівці, 2003. – 152 с. 9. Ткачук С.С. Нейроендокринні та біохімічні механізми порушень стрес-реалізуючої та стрес-лімітуючої систем мозку щурів із синдромом перинатального стресу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук. – Київ, 2000. – 35с. 10. Хавинсон В.Х. Пептидные биорегуляторы и старение / В. Хавинсон, В. Анисимов – Санкт-Петербург: Наука, 2003. – 223 с. 11. Bondarenko L.A. Morphofunctional changes in the pineal gland during dynamic adaptation to hypothermia / L.A. Bondarenko, G. I. Gubina-Vakulik // Neurosc. and Behav. Physiol. – 2003. – Vol. 33, №4. – P. 405-409. 12. Johnson E. O. Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis / E. O. Johnson, T. S. Kamilaris, G. P. Chrousos, P. W. Gold // Neurosc. Biobehav. Rev. – 1992. – Vol. 16, №2. – P. 115-130.

13. Efficacy of the concomitant administration of the pineal hormone melatonin in cancer immunotherapy with low dose IL-2 in patients with advanced solid tumors who had progressed on IL-2 alone / P. Lissoni, S. Barni, M. Cazzaniga [et al.] // Oncology. – 1994. – Vol. 51, №4. – P.344-347. 14. Melatonin: lowering the high price of free radicals / R.J. Reiter // News Physiol. Sci. – 2000. – P. 246-250. 15. Venerucci F. Histopathology kits: methods and applications / F. Venerucci - Bologna, Milan: Bio-Optica. – 2001. – 95p.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭПИТАЛОНА ПРИ ИЗМЕНЕННОМ ФОТОПЕРИОДЕ И ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ У СТАРЫХ КРЫС

Ю. В. Ломакина

Резюме. На светооптическом и электронномикроскопическом уровнях исследована структура пинеальной железы старых крыс-самцов в условиях обычного светового промежутка – LD, на фоне полной семидневной темноты при одностороннем иммобилизационном стрессе. Проанализировано репаративное действие эпیتالона. Доказано, что эпیتالон позволяет достичь существенной коррекции гистологических и ультраструктурных изменений пинеалоцитов старых крыс, вызванных иммобилизационным стрессом.

Ключевые слова: пинеальная железа, иммобилизационный стресс, фотопериод, эпیتالон.

EFFECTIVENESS OF THE EPITHALON USAGE AT ALTERED PHOTOPERIOD AND IMMOBILIZED STRESS IN OLD RATS

Yu. V. Lomakina

Abstract. Was investigated the structure of the pineal gland of old rat-males on microscopic and electron-microscopic levels under conditions of ordinary light interval - LD, against a background of 7 day complete darkness at 1-hour immobilized stress. The reparative action of epithalon was analyzed. It has been proved that epithalon allows attaining the substantial correction of histological and ultrastructural changes of pinealocytes of the old rats caused by the immobilized stress.

Key words: pineal gland, immobilization stress, photoperiod, epithalon.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2012. - Vol.11, №3(41). - P.118-121.

Надійшла до редакції 25.08.2012

Рецензент – проф. Г.І.Ходоровський

© Ю.В. Ломакина, 2012