

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра фармацевтичної ботаніки та фармакогнозії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація»
спеціалізація 226.01 «Фармація (Загальна)» на тему:

**ВПЛИВ ФІТОМЕЛАТОНІНУ НА СТАН ПОКАЗНИКІВ
НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ У СТАРИХ ЩУРІВ ПРИ ВИДАЛЕННІ
ШИШКОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ**

Виконала: студентка 6 курсу, 2 групи
медико-фармацевтичного факультету,
спеціальність 226 «Фармація, промислова
фармація», другого (магістерського) рівня,
заочної форми навчання

МАТАРЖУК Іванна Василівна

Керівник: завідувач кафедри фармацевтичної
ботаніки та фармакогнозії, доктор медичних
наук, професор ЗАХАРЧУК О.І.

Рецензенти:

доцент кафедри медичної біології та генетики,
кандидат медичних наук КРИВЧАНСЬКА М.І.
доцент кафедри біоорганічної та біологічної
хімії і клінічної біохімії, кандидат біологічних
наук ЯРЕМІЙ І.М.

Допущено до захисту:

Протокол №10 від 04 лютого 2026 р.

Завідувач кафедри, професор

ЗАХАРЧУК О.І.

Чернівці - 2026

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1	
ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ/ФІТОМЕЛАТОНІНУ НА СТАН ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЧНОЇ АДАПТАЦІЇ У СТАРИХ ЩУРІВ ПРИ ВИДАЛЕННІ ШИШКОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ.....	6
1.Огляд літератури.....	6
1.1. Механізм та біологічна роль мелатоніну та фітомелатоніну в організмі тварин.....	6
1.2. Фотоперіод як основний показник хроноперіодичної системи.....	8
1.3. Вплив мелатоніну на показники неспецифічної імунологічної адаптації у старих щурів при видаленні шишкоподібної залози.....	12
1.4. Узагальнення та висновки.....	21
РОЗДІЛ 2.....	22
ВИКЛАД ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ Й ОСНОВНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1. Матеріал і методи дослідження.....	22
2.1.1. Характеристика експериментальних тварин.....	25
2.1.2. Дизайн експерименту та групування тварин.....	26
2.1.3. Фітомелатонін у моделях з видаленням шишкоподібної залози.....	27
2.2. Обґрунтування можливості екстраполяції результатів дослідження на людину.....	27
РОЗДІЛ 3.....	28
ВІДОМОСТІ ПРО ПРОВЕДЕНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	28
ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНІНУ/ФІТОМЕЛАТОНІНУ НА ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ У ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЕПІФІЗЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ.....	28

3.1. Вплив мелатоніну на показники неспецифічної адаптації у дорослих епіфізектомованих щурів.....	28
3.2. Вплив мелатоніну на показники неспецифічної адаптації у старих епіфізектомованих щурів.....	39
РОЗДІЛ 4.....	40
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ АВТОРА.....	40
ВИСНОВКИ.....	43
ТЕОРЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ.....	43
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	44
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	45

ВСТУП

Актуальність теми. Старіння організму супроводжується зниженням функції шишкоподібної залози, дефіцитом мелатоніну та порушеннями функції і регуляції імунної системи. Недостатньо вивченими залишаються механізми впливу мелатоніну та його рослинних аналогів (фітомелатоніну) на показники неспецифічної імунологічної адаптації при старінні організму.

Об'єкт дослідження. Старі щури та профіль показників неспецифічного імунітету при старінні організму.

Предмет дослідження. Вплив мелатоніну/фітомелатоніну на показники неспецифічного імунітету при старінні організму та при відсутності чи депресії впливу шишкоподібної залози внаслідок епіфізектомії.

Мета роботи. Вивчити вплив мелатоніну та фітомелатоніну на показники неспецифічної імунологічної адаптації у старих пінеалектомованих щурів.

Завдання дослідження. Розширити сучасні уявлення про роль шишкоподібної залози та мелатоніну/фітомелатоніну як інтегративної ланки між нейроендокринною та імунною системами в умовах старіння організму. Визначити стан вікової дезорганізації та дезінтеграції неспецифічної імунологічної адаптації, можливість її фармакологічної корекції шляхом введення екзогенного мелатоніну/фітомелатоніну. Доповнити теоретичне підґрунтя розвитку імунології, геронтології, геріатрії, фітофармації, у якому організація фізіологічних процесів розглядається як ключовий регуляторний фактор та відіграє суттєву роль в процесах старіння організму. Оцінити ступінь порушення неспецифічного імунного захисту після пінеалектомії; дослідити синхронізуючу дію мелатоніну та фітомелатоніну; обґрунтувати можливість екстраполяції результатів досліджень на людину.

Наукова новизна. У роботі вперше:

1. В умовах експериментальної пінеалектомії у старих щурів здійснено системний аналіз організації та функціонування показників неспецифічної імунологічної адаптації.

2. Встановлено, що вікове та пінеалектомічне порушення імунологічної реактивності має характер дезорганізації, яка проявляється не лише змінами абсолютних показників, але й дезінтеграцією їх структури.
3. Доведено, що мелатонін і фітомелатонін здатні відновлювати структуру і функцію неспецифічної імунологічної адаптації при старінні організму.
4. Показано, що фітомелатонін за синхронізуючою активністю не поступається синтетичному мелатоніну, а це розширює уявлення про можливості використання рослинного мелатоніну в геронтологічних моделях.
5. Обґрунтовано доцільність застосування в наступних дослідженнях хронобіологічного підходу як обов'язкового методологічного елементу при оцінці імуномодулюючих та геропротекторних ефектів мелатоніну (фітомелатоніну).

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ/ФІТОМЕЛАТОНІНУ НА СТАН ПОКАЗНИКІВ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОЛОГІЧНОЇ АДАПТАЦІЇ У СТАРИХ ЩУРІВ ПРИ ВИДАЛЕННІ ШИШКОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізм та біологічна роль мелатоніну та фітоmelatonіну в організмі тварин

Мелатонін – це природний гормон, що синтезується переважно шишкоподібною залозою хребетних, а також іншими тканинами та органами [1, 2]. Він вважається біоактивною молекулою завдяки численным ролям та функціям, які він виконує в організмі тварин та людини. Дослідження, проведені до 2024 року, також показали наявність мелатоніну в широкому спектрі рослин та бактерій [2, 3, 4]. Цей огляд має на меті зібрати деякі наукові дані для ідентифікації та опису основних джерел мелатоніну, а також задокументувати функції та ролі, які він відіграє в організмах тварин, зокрема для щурів.

Мелатонін – це біогенний амін, який міститься в організмі тварин, рослин та мікробів. Саме Aaron B. Lerner з Єльського університету належить заслуга за назву гормону та визначення його хімічної структури в 1958 році [35]. У ссавців мелатонін виробляється шишкоподібною залозою. Шишкоподібна залоза – це невелика ендокринна залоза, розміром приблизно з рисове зерно та за формою схожа на соснову шишку (звідси й назва), розташована в центрі мозку (ростродорсально до верхнього холікулусу), але поза гематоенцефалічним бар'єром [60]. Секреція мелатоніну збільшується в темряві та зменшується під час впливу світла, тим самим регулюючи циркадні ритми кількох біологічних функцій, включаючи цикл сну та неспання. Зокрема, мелатонін регулює цикл сну та неспання, хімічно викликаючи сонливість та знижуючи температуру тіла.

Мелатонін також бере участь у регуляції настрою, навчання та пам'яті, імунної активності, сновидінь, фертильності та розмноження. Крім того, мелатонін є ефективним антиоксидантом. Більшість дій мелатоніну опосередковуються зв'язуванням та активацією рецепторів мелатоніну. Люди з розладами аутистичного спектру (РАС) можуть мати нижчий за норму рівень мелатоніну. Численні дослідження доводять, що здорові батьки осіб з розладом аутистичного спектру (РАС) також мають нижчий рівень мелатоніну, і що цей дефіцит пов'язаний з низькою активністю гена ASMT, який кодує останній фермент синтезу мелатоніну. Знижене вироблення мелатоніну також було запропоновано як ймовірний фактор значно вищих показників раку серед нічних працівників.

Мелатонін є похідним триптофану. Він зв'язується з рецептором мелатоніну типу 1A, який потім діє на аденілатциклазу та пригнічення шляху передачі сигналу цАМФ. Мелатонін не тільки пригнічує аденілатциклазу, але й активує фосфоліпазу С. Це посилює вивільнення арахідонату. Зв'язуючись з рецепторами мелатоніну 1 та 2, каскади сигналізації нижче за течією мають різні ефекти в організмі. Рецептори мелатоніну є рецепторами, пов'язаними з G-білком, і експресуються в різних тканинах організму. У людини існує два підтипи рецептора: рецептор мелатоніну 1 (MT1) та рецептор мелатоніну 2 (MT2). Мелатонін та агоністи рецепторів мелатоніну, що є на ринку або проходять клінічні випробування, зв'язуються та активують обидва типи рецепторів. Зв'язування агоністів з рецепторами досліджується вже понад два десятиліття або з 1986 року [60, 65]. Це певною мірою відомо, але досі не до кінця зрозуміло. Коли агоністи рецепторів мелатоніну зв'язуються та активують свої рецептори, це викликає численні фізіологічні процеси. Як зазначає Żelabowski K et al [96], рецептори MT1 експресуються в багатьох ділянках центральної нервової системи (ЦНС): супрахіазматичному ядрі гіпоталамуса (СЯГ), гіпокампі, чорній субстанції, мозочку, центральних дофамінергічних шляхах, вентральній ділянці покривки та прилеглому ядрі. MT1 також експресується в сітківці, яєчнику, яєчку, молочній залозі, коронарному

кровообігу та аорті, жовчному міхурі, печінці, нирках, шкірі та імунній системі. Рецептори MT2 експресуються переважно в ЦНС, а також у тканинах легень, серця, коронарних артерій та аорти, міометрії та гранульозних клітинах, імунних клітинах, дванадцятипалій кишці та адипоцитах. Зв'язування мелатоніну з рецепторами мелатоніну активує кілька сигнальних шляхів [96].

Отже, у щурів мелатонін регулює циркадні ритми (сон/неспанья, активність), діє як потужний антиоксидант та протизапальний засіб, захищаючи такі органи, як печінка, нирки та яєчники, від стресу (радіація, гіпоксія), впливає на баланс репродуктивних гормонів, допомагає з терморегуляцією (холодостійкість) та демонструє потенціал для відновлення після пошкодження нервів та омолоджувальної дії, впливаючи на метаболізм та якість сну.

1.2. Фотоперіод як основний показник хроноперіодичної системи

Фотоперіод - це основний часовий інтегратор функціональних систем усіх живих організмів [15]. Існує поняття про хроноперіодичну та фотоперіодичну системи людського організму (та тварин) як функціональні системи, дозволяючих синхронізувати хроноритми різноманітних соматичних та вісцеральних функцій й здійснювати координацію та модуляцію механізмів адаптації організму до впливу стресорів [6, 8, 15].

Хроноперіодична система, розташовуючись на всіх рівнях організації живого організму, що генерує коливання власної активності з частотами, наближеними до частот основних зовнішніх геофізичних циклів (добових, місячних, річних), і здатна захоплювати зовнішні часпоказники і, таким чином, синхронізувати свою активність із зовнішніми ритмічними змінами. Таким чином, хроноперіодична система створює універсальну часову основу [26] всіх динамічних процесів, що протікають у біологічних системах різного рівня від клітини до біоценозів.

Головною функцією хроноперіодичної системи є синхронізація вроджених періодичних програм між собою всередині організму та із зовнішніми періодичними змінами.

Для синхронізації власних ритмів із зовнішніми періодичними змінами хроноперіодична система організму повинна орієнтуватися на якісь із цих змін, сприймати їх, "захоплювати" їх ритм власними осциляторами. Такі зовнішні періодичні зміни, здатні впливати на ендогенні ритми організму отримали назву «сонячні педалі» (синхронізатори) [26, 64].

Експериментально встановлено, що з усієї різноманітності зовнішніх періодичних факторів реальний виражений вплив на власні хроноперіодичні ритми системи тварин здійснюють періодичні коливання освітленості, температури, геомагнітного поля та вологості [9, 15, 18]. Ці фактори мають найбільш регулярний періодичний характер [26]. При цьому геомагнітні параметри середовища можуть здійснювати лише модулюючий вплив на хроноперіодичну систему [26, 64]. Коливання вологості є синхронізатором для сезонних ритмів тих організмів, які живуть у тропічній зоні; коливання температури є синхронізатором для пойкилотермних тварин, а для гомойотермних тварин є лише зовнішнім подразнюючим фактором хроноперіодичної системи, тобто лише «суттєвим» фактором [15].

Вплив геомагнітних коливань як синхронізатором для хроноперіодичної системи визнається не всіма дослідниками [47-49], на це зокрема вказують дані про виникнення явища циркадіанності, тобто відхилення циркадіанних ритмів від точної добової періодичності, при ізоляції організму в умовах постійного освітлення; та про відсутність підстроювання ендогенних ритмів до місцевого часу після переміщення тварин і людини в інший часовий пояс при обов'язковому знаходженні їх в умовах постійного освітлення. Для людини також вважають важливими, але відіграють вже другорядну роль у синхронізації ритмів організму, деякі інші фактори: прийняття їжі, фізична активність, соціальні сигнали [72].

Таким чином, для гомойотермних тварин основним датчиком часу або зовнішнім синхронізуючим фактором є фотоперіод [8, 15], тобто добова (або сезонна) тривалість світла й темряви або довжина добової освітленості. Він є найбільш стабільним і надійним з усіх параметрів середовища, стійким до впливу перешкод, що повністю збігається з головним зовнішнім періодичним фактором - обертанням Землі, а також відокремлений у часу від тих «суттєвих» для організму факторів (величина добової температури, кількість доступної їжі), які безпосередньо визначають виживання як окремих індивідів, і виду загалом. Тому фотоперіод у даному випадку є «випереджальним» (предикативним) фактором [27] для хроноперіодичної системи організму.

Роль фотоперіодизму в регуляції розвитку рослин достатньо добре вивчена. При цьому доведено генетичну детермінованість фотоперіодичного типу рослин для їх подальшого морфогенезу [27], адекватного змінам довкілля. У той же час дані про важливість фотоперіоду для синхронізованого функціонування різних органів і систем ссавців тільки починають систематизуватись. Найбільшу увагу дослідників серед регульованих фотоперіодом ритмів отримали ритми репродуктивної активності, що забезпечують продовження виду [64].

За виразністю фотоперіодичних змін у репродуктивній системі іноді всі види тварин ділять на «фотоперіодичні», які мають яскраво виражені сезонні зміни статевих функцій, та «нефотоперіодичні», які не мають таких змін і розмножуються цілий рік [64, 72]. "Фотоперіодичні" (або "сезонні") тварини можуть бути як коротко-, так і довгоденні. До перших серед лабораторних та домашніх ссавців відносять хом'яка, тхора, макаку-резус, вівцю, козу, а до других - білу мишу, кролика, морську свинку, бика. У диких тварин реєструється різний ступінь сезонної регресії статевих залоз: наприклад, у кажана і гірського цапа - в середньому на 10%, у борсука та дикого кролика - в середньому на 50%, а у більшості тропічних тварин, зокрема у дикобраза, африканського слона, бегемота, сезонна регресія мінімальна, хоча й реєструється [64, 72].

Такий поділ на «фотоперіодичні» та «нефотоперіодичні» тварин вже на перший погляд не є досить чітким: у «нефотоперіодичних» тварин (зокрема у лабораторних щурів) сезонні або фотоперіодичні зміни у статевих залозах теж реєструються при ретельному дослідженні [5, 6, 8, 15]. Навіть у людей є досить чіткий сезонний підйом статевої активності [64].

Вся різноманітність ступенів сезонної регресії репродуктивної функції у тварин та людини вказує на незадовільність та умовність поділу ссавців на «фотоперіодичні» та «нефотоперіодичних». Тому різниця між видами полягає не в тому, чи є реакція репродуктивної системи на фотоперіод, а в ступені фотоперіодичної реакції репродуктивної системи [64, 70].

У зв'язку з цим слід звернути увагу на поділ тварин на «денних» та «нічних» за руховою активністю відповідно до світлового або темного періоду доби. Іноді під цим поділом розуміють повну інверсію як рухових, так й інших ритмів. Така думка себе не виправдовує [70], адже, з одного боку, не всі ритми у «нічних» і «денних» тварин інвертовані, а з іншого боку, є принципова схожість у всіх ссавців, в тому числі і у людини, у роботі більшості нейроендокринних механізмів, задіяних у сприйнятті фотоперіоду [4, 5, 6, 21].

Фотоперіодичні зміни не обмежуються репродуктивною функцією, вони поширюються інтенсивність багатьох інших процесів в організмі. Зокрема показано значну роль фотоперіоду в формуванні механізмів адаптації гризунів до холоду, а також до екстремальних стресових впливів, зокрема гіпоксії. Так, у хом'яків короткий світловий день збільшує калоригенний ефект норадреналіну, а також масу та вміст білка в мітохондріях бурої жирової тканини, сприяє адаптації до низьких температур. Тривалий світловий день має протилежні ефекти. При цьому біоенергетичні ефекти короткого світлового дня досить повно відтворюються під час введення мелатоніну [2, 3, 7].

У щурів фотоперіодичні ефекти були аналогічними: при короткому світловому дні збільшується калоригенний ефект норадреналіну, а при тривалому він зменшується з одночасним зростанням вазомоторного ефекту норадреналіну [7-10]. Крім того, фотоперіод впливає на загальні темпи

постнатального розвитку та засвоєння їжі у лабораторних тварин: тривалий світловий день збільшує інтенсивність цих процесів, особливо у самців. Після кастрації така дія фотоперіоду зникає, що вказує на його опосередкування за допомогою статевих гормонів [31]. Таким чином, у різних органах та системах організму ссавців, у тому числі людини, можуть виникати фотоперіодичні реакції завдяки надходженню інформації про фотоперіод у мозок і далі в периферичні органи.

1.3. Вплив мелатоніну на показники неспецифічної імунологічної адаптації у старих щурів при видаленні шишкоподібної залози

Синтез та секреція мелатоніну шишкоподібною залозою починається за допомогою норадреналіну, який є основним нейромедіатором, що бере участь в активації групи ферментів шишкоподібною залозою, особливо N-ацетилтрансферази. Ця активація групи ферментів шишкоподібною залозою відбувається завдяки шляхам цАМФ (циклічний аденозинмонофосфат) та цГМФ (циклічний гуанозинмонофосфат), що сприяє активації рецепторів альфа1 ($\alpha 1$), альфа2 ($\alpha 2$) та бета1 ($\beta 1$), розташованих на мембрані пінеалоцитів [31].

Синтез мелатоніну (рис. 1.3) – це послідовний процес, що складається з чотирьох фаз/етапів [31], і починається на першій фазі з перетворення триптофану на 5-гідрокситриптофан, перетворення, яке відбувається завдяки дії ферменту триптофангідроксилази (ТФГ). Згодом 5-гідрокситриптофан трансформується в серотонін (5-НТ), а після трансформації серотонін проходить процес N-ацетилювання в результаті дії арилалкіламін N-ацетилтрансферази (AANAT), утворюючи NAS (N-ацетилсеротонін). На останньому етапі N-ацетилсеротонін трансформується в мелатонін, і цей процес перетворення N-ацетилсеротоніну на мелатонін полегшується ферментом гідроксиіндол-О-метилтрансферазою (HIOMT) [31].

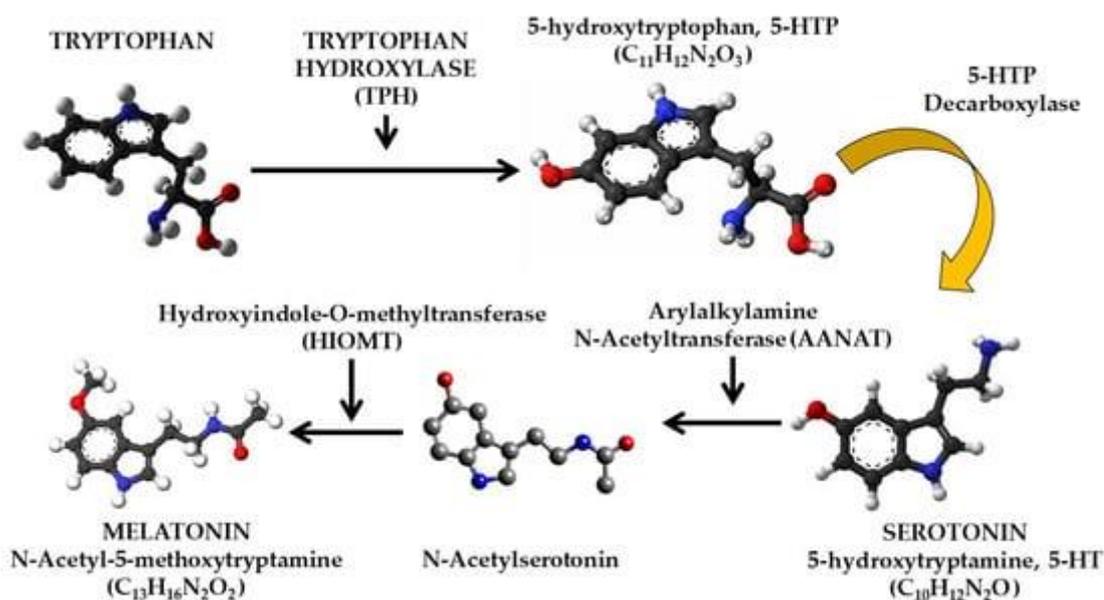
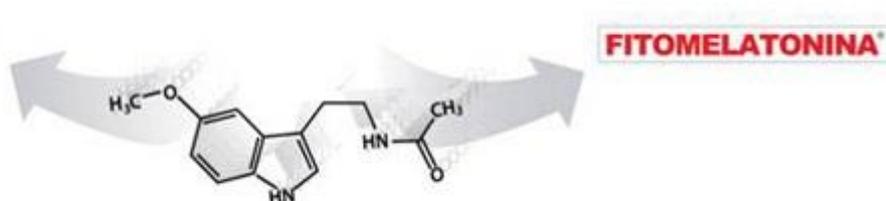


Рис. 1.1. Синтез мелатоніну з лімітуючої незамінної амінокислоти триптофану. Оригінальний оброблений контент. 3D-моделі молекул триптофану, 5-гідрокситриптофану, серотоніну, N-ацетилсеротоніну та мелатоніну

МЕЛАТОНІН



Через те, що фермент арилалкіламін N-ацетилтрансформаза (AANAT), який відіграє роль каталізатора перетворення серотоніну на N-ацетилсеротонін, має мінімальну активність в організмі протягом дня, процес вироблення мелатоніну обмежений, що сприяє накопиченню серотоніну в пінеалоцитах, тоді як синтез мелатоніну вночі зумовлений підвищеною активністю AANAT внаслідок настання темряви [39].

Синтез мелатоніну в шишкоподібній залозі ритмічно регулюється «головним біологічним годинником» організму, розташованим у супрахіазматичному ядрі гіпоталамуса (SCN). Синтез мелатоніну починається з перетворення незамінної амінокислоти триптофану (яка має харчове походження) на серотонін [1-3]. Крім того, деякі дослідження повідомляли, що мітохондрії містять високий рівень мелатоніну [3].

Процес захоплення та передачі світлової інформації від сітківки до шишкоподібної залози починається з фоторецепторних клітин у сітківці, які приймають світлові сигнали (сітківка відповідає за перетворення оптичних сигналів на біологічні сигнали) та передають інформацію до супрахіазматичного ядра гіпоталамуса (SCN) через ретиногіпоталамічний тракт. Основними клітинами на поверхні сітківки, які приймають світлову інформацію, є фоточутливі гангліозні клітини (ipRGC), які мають високу чутливість до синього світла. Супрахіазматичне гіпоталамусне ядро (SCN) є основним біологічним годинником організму, і за допомогою інформації, яку воно отримує від сітківки, воно визначає, день чи ніч на вулиці, залежно від інтенсивності світла, що проникло на поверхню сітківки. У свою чергу, супрахіазматичне гіпоталамусне ядро надсилає отриману інформацію через симпатичні прегангліонарні нейрони, розташовані в стовбурі мозку (особливо в модульній області або в нижній частині стовбура мозку), до верхніх шийних гангліїв (SCG) [4, 5, 8].

У людини синтез мелатоніну починається одразу після заходу сонця, досягаючи піку секреції посеред ночі та поступово знижуючись у другій половині ночі. Близько 80% мелатоніну, присутнього в організмі людини протягом 24 годин, синтезується протягом ночі. Рівень мелатоніну в сироватці крові людини вночі досягає значень від 80 пг/мл до 120 пг/мл відповідно, а протягом дня кількість мелатоніну різко знижується до значень приблизно 10–20 пг/мл [2-4].

Мелатонін екстраінєального походження. Мелатонін також може синтезуватися та секретуватися в організмі тварин та людини, а також в інших тканинах та органах, таких як шкіра, сітківка, певних ділянках мозку, печінка, нирки та жіночі репродуктивні органи, щитовидна залоза, кришталик та кістковий мозок, війчасті тіла, тимус й кохлеа], а також присутній у шлунково-кишковому тракті [35, 39, 40].

Було виявлено, що мелатонін, який синтезується та секретується в інших тканинах та органах, виконує інші ролі в живих організмах, порівняно з тими,

що відіграє пінеальний мелатонін, залежно від тканини або органу, в якому він синтезується та секретується. Ще однією характеристикою екстрапінеального мелатоніну є те, що він не транспортується в організмі через кров і діє лише локально, в тій області, де він був секретований. Наприклад, було виявлено, що екстрапінеальний мелатонін, що синтезується в шкірі, захищає тканини від активних форм кисню (АФК) та активних форм азоту (АФН), які утворюються в результаті впливу на шкіру хімічних токсинів або ультрафіолетового випромінювання [30, 31].

Екстрапінеальний мелатонін, що секретується в шкірі, не здатний безпосередньо нейтралізувати АФК та АФН без сторонньої допомоги [21]. Таким чином, було продемонстровано, що коли мелатонін віддає електрон для інактивації радикального виду, він перетворюється на інший поглинач радикалів, який називається 3-гідроксимелатонін. Це явище перетворення мелатоніну на інші похідні, що відіграють роль у захопленні реактивних видів, зазвичай називають каскадом антиоксидантів мелатоніну або каскадом елімінації вільних радикалів [35].

Численні дослідження, проведені в галузі вивчення механізму дії мелатоніну на хребетні організми, висвітлили низку ролей та функцій, які цей гормон виконує в організмі тварин та людини. Таким чином, залежно від природи мелатоніну (епінеальний чи екстрапінеальний), а також залежно від тканини чи органу, в якому він синтезується та секретується, цей гормон виконує різні ролі та функції на рівні кожного окремого організму.

Роль мелатоніну в організмі тварин. В організмі тварин мелатонін відіграє роль у регулюванні циркадного ритму [33, 47-49], покращує якість сну шляхом регулювання ритму сну та неспання [75, 91, 94], підвищує якість молока у ссавців, опосередковує сезонні репродуктивні зміни [72], модулює енергетичний обмін [73], регулює клітинний окисно-відновний гомеостаз [63] та відіграє роль у розмноженні домашніх видів тварин [28].

Мелатонін ритмічно секретується в організмі тварин в результаті фотостимулюючої дії, спричиненої темрявою, або шляхом пригнічення синтезу

шляхом впливу природного та/або штучного світла на очне яблуко [35]. Після синтезу пінеальний мелатонін вивільняється в спинномозкову рідину третього шлуночка, після чого розподіляється по різних ділянках мозку, щоб сигналізувати про фотоперіодичні зміни в навколишньому середовищі [85, 87].

Дослідження, проведене на щурах, показало, що мелатонін має здатність пригнічувати ріст і розвиток певних ракових пухлин. Були проаналізовані дві групи щурів з пухлинами, яким вводили кров від донорів-людей. Щурам першої групи вводили кров, концентрація якої була специфічною для нічного періоду, а щурам другої групи вводили кров, рівень якої був специфічним для денного періоду. Результати показали, що у випадку щурів, яким вводили кров, багату на мелатонін, ріст пухлини був пригнічений, тоді як перфузія кров'ю з дефіцитом мелатоніну призводила до росту пухлини у досліджуваних щурів.

Участь мелатоніну в репродуктивному процесі тварин є добре відомою та задокументованою функцією цього гормону. Мелатонін діє переважно через рецептори MT1 та MT2, наявність яких була зареєстрована в кількох спеціалізованих дослідженнях, у численних тканинах мозку та периферичних тканинах, включаючи яєчка та яєчники. Спеціалізовані дослідження показали, що рецептор мелатоніну MT1 більш поширений в областях мозку та ендокринних тканинах порівняно з рецептором MT2, який, здається, зазвичай відсутній у гіпофізі та гіпоталамусі [96]. Області мозку та ендокринні тканини є основними зонами реагування на циркадні та фізіологічні ефекти, викликані N-ацетил-5-метокситриптаміном (мелатоніном), і присутність рецептора MT1 у цих органах вказує на те, що цей рецептор (MT1) відіграє важливу роль у фізіологічних репродуктивних процесах ссавців, які модулюються мелатоніном [47-49].

Старіння, універсальне та внутрішнє явище, є спільним досвідом, який впливає на кожну тварину, включаючи людину [2]. Хоча вікові захворювання та дегенеративні стани можуть відрізнятися, вони демонструють разюче схожі закономірності. Хронічне запалення є важливим фактором, що прискорює процес старіння та сприяє різним проблемам зі здоров'ям. Вікові тригери

численних запальних сигнальних шляхів у мозку можуть призвести до зміненої нейрональної функції, зниження пластичності та підвищеної схильності до нейродегенеративних захворювань [2, 51]. З віком мікроглія активується, що призводить до підвищеної реактивності на подразники, а хронічне запалення значно прискорює старіння та сприяє різним проблемам зі здоров'ям. Кілька ключових чинників у запальних реакціях зазнають впливу старіння, включаючи резидентні імунні клітини мозку, зокрема мікроглію та астроцити, фактор транскрипції NF-κB (підсилювач ядерного фактору каппа-легкого ланцюга активованих В-клітин) та шлях Akt (також відомий як шлях протеїнкінази B) [96]. Дослідження підтверджують припущення, що різні фактори, що впливають на передчасне старіння або затримують цей процес, сходяться через сигнальний шлях NF-κB [61, 63, 66].

Загалом, наслідки тривалого нейрозапалення можуть призвести до позитивного зворотного зв'язку тісно пов'язаних руйнівних подій, а саме:

- порушення синаптичних функцій, викликане цитокінами, через зміну вивільнення нейромедіаторів та порушення синаптичної пластичності;
- втрату нейронів через підвищений оксидативний стрес та супутній апоптоз;
- когнітивне зниження та прогресуюча нейродегенерація, пов'язані з такими захворюваннями, як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та розсіяний склероз [63, 66].

Старіння та мелатонін тісно пов'язані, оскільки мелатонін необхідний для процесів, пов'язаних зі старінням, які з часом погіршуються, таких як контроль циркадних ритмів, якість сну, посилення антиоксидантного захисту та нейропротекція [61, 63, 66]. Розуміння цього зв'язку підкреслює важливість мелатоніну для підтримки нашого здоров'я та життєвої сили з віком. Рівень мелатоніну знижується з віком, починаючи вже із середнього віку, і це зниження може мати значні наслідки для загального здоров'я та самопочуття [63].

Гормон впливає на супрахіазматичне ядро гіпоталамуса через механізм зворотного зв'язку, який синхронізує внутрішній час із зовнішнім циклом світло-темрява [47]. Зі старінням цей важливий зв'язок послаблюється, і «годинник» мозку стає менш чутливим до мелатоніну і навпаки [51]. Дефіцит мелатоніну, що виникає внаслідок старіння, призводить до високого ризику безсоння через схильність до фазових зсувів та фрагментації сну. Старіння може знижувати експресію або чутливість рецепторів мелатоніну MT1 та MT2, впливаючи на передачу сигналів [61, 66].

Було продемонстровано, що мелатонін має багатогранний вплив на імунну систему, функціонуючи як мішень, так і прямий агент [16, 17]. Крім того, шишкоподібна залоза може бути мішенню для запальних сигнальних молекул, таких як інтерферон-гамма [21] та фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α) [21, 22]. І цей процес впливає на синтез мелатоніну як гормону. Адаптивна активність гормону здійснюється через шляхи виживання PI3K/Akt та SIRT1 або пов'язані із запаленням TLR4/NF- κ B та MAPK [21, 22]. Крім того, було продемонстровано, що мелатонін взаємодіє з мікроглією та пом'якшує їх активацію в мозку]. Дослідження підтверджують припущення, що дефіцит мелатоніну може призвести до посилення нейрозапалення [21,22,23].

Низка сучасних досліджень та різні звіти вказують на те, що зв'язок між дефіцитом мелатоніну та старінням є складним [18, 51, 63, 67, 80]. Загалом, встановлено, що пінеалектомія у молодих тварин прискорює старіння, що є результатом підвищеного оксидативного стресу, дисфункції метаболічних процесів, когнітивного зниження та погіршення емоційного благополуччя. І навпаки, дефіцит мелатоніну у старших тварин, здається, не впливає на темпи старіння. Однак результати досліджень щодо гризунів середнього віку з дефіцитом мелатоніну були суперечливими: деякі дослідження вказують на захисні ефекти, а інші - на дисфункцію [85-87]. Ця суперечливість підкреслює важливість цієї вікової групи для розуміння ролі мелатоніну та свідчить про необхідність подальших досліджень. У цьому огляді ми проаналізували запальні маркери старіння, зокрема, активні мікрогліальні клітини та

астроцити, сигналізацію NF- κ B та Akt, використовуючи імуногістохімію в різних ділянках дорсального гіпокампу щурів (dHipp) у трьох вікових групах: молоді дорослі, щури середнього віку та старі щури. За основу взято припущення, що дефіцит мелатоніну внаслідок пінеалектомії посилюватиме ці нейрозапальні маркери залежно від віку. І аналіз досліджень підтверджує, що молодий дорослий вік є найбільш вразливою стадією, протягом якої дисфункція мелатоніну може прискорити старіння через посилення нейрозапалення. На противагу цьому, нейрозапальна реакція, пов'язана з пінеалектомією у щурів середнього віку, була більш складною, що свідчить про залучення додаткових механізмів, які взаємодіють з цим процесом [85-87, 89].

Очевидно, що молоді дорослі щури, здається, особливо схильні до запалення в гіпокампі через дефіцит мелатоніну в крові. Фаза середнього віку життя, здається, є ключовим моментом, де виникають альтернативні, поки що неідентифіковані механізми, які потенційно протидіють підвищеній вразливості до запалення, пов'язаному з дефіцитом мелатоніну. Отже, ця вікова група демонструє певний ступінь стійкості до таких запальних впливів.

Загальновизнано, що хронічне запалення є важливим механізмом, який сприяє процесу біологічного старіння. Шишкоподібна залоза вважається тісно пов'язаною з контролем «життєвого годинника» [89]. Пінеалектомія викликає мікрогліоз як у молодих, так і у старих щурів, але щури середнього віку більш стійкі до активації мікроглії. Варто зазначити, що молоді дорослі щури продемонстрували найвищий ступінь вразливості до запалення, пов'язаного з втратою мелатоніну як гормону. Навпаки, щури середнього віку з пінеалектомією демонстрували складну та часткову адаптивну реакцію. Ці дані підкреслюють динамічний та віковий характер нейрозапалення після пінеалектомії, підкреслюючи стадію розвитку як критичний фактор схильності до запалення.

Після видалення шишкоподібної залози (пінеалектомії) старі щури демонструють складні, віково-залежні адаптації, включаючи порушення циркадних ритмів (менша варіація активності), змінене нейрозапалення

(мікрогліоз, астрогліоз), зміни в метаболізмі ліпідів (наприклад, сфінголіпідів у гіпокампі) та різні емоційні реакції порівняно з молодими щурами, причому деякі дослідження свідчать про підвищену чутливість до інсуліну, але підвищені маркери оксидативного стресу в певних ділянках мозку [50, 62, 87]. Їхні реакції підкреслюють різноманітні ролі мелатоніну, причому старші тварини часто демонструють менш виражені поведінкові порушення, ніж молодші, але все ще відчувають значні метаболічні та запальні зміни.

Таблиця 1.1.

Порівняльна характеристика мелатоніну та фітомелатоніну

Ознака	Мелатонін (ендогенний/синтетичний)	Фітомелатонін
Джерело	Епіфіз, фармакологічні препарати	Рослинні продукти та екстракти
Концентрації	Фізіологічні або фармакологічні	Фізіологічно низькі
Механізм дії	Рецепторний і нерцепторний	Переважно м'який рецепторний та антиоксидантний
Вплив на циркадіанні ритми	Виражена фазова перебудова	Поступова ресинхронізація
Ризик побічних ефектів	Можливий при тривалому застосуванні	Мінімальний
Перспективи при старінні	Корекція вираженої десинхронізації	Довготривала профілактика імуносенесценції

Таблиця 1.2.

Вплив фітомелатоніну на показники неспецифічного імунітету при старінні

Показник	Вікові зміни	Вплив фітомелатоніну
Фагоцитарна активність	Зниження	Підвищення, нормалізація ритму
НК-клітини	Зниження цитотоксичності	Посилення активності
Комплемент	Дисбаланс	Стабілізація рівнів

1.4. Узагальнення та висновки до розділу

Аналіз літературних даних свідчить, що старіння організму супроводжується глибокими порушеннями структури неспецифічного імунітету. Фітомелатонін розглядається як перспективний природний коректор, здатний відновлювати організацію імунних показників та підвищувати адаптаційні можливості організму.

Отримані дані обґрунтовують доцільність подальших експериментальних і клінічних досліджень фітомелатоніну як геропротекторного та імуномодуючого засобу у медичній практиці.

РОЗДІЛ 2

ВИКЛАД ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДИКИ Й ОСНОВНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріал і методи дослідження

З метою вивчення впливу шишкоподібної залози на показники неспецифічної імунологічної адаптації при старінні організму для експериментальних досліджень використовували білих лабораторних нелінійних щурів-самців (*Rattus norvegicus. var. alb. L.*) двох вікових груп (дорослі і старі). Відповідно до поставлених завдань проведено наступні серії експериментів: 1. Вивчення показників неспецифічної адаптації у дорослих і старих інтактних, хибнооперованих контрольних та епіфізектомованих щурів. 2. Визначення ефекту впливу синтетичного гормону шишкоподібної залози мелатоніну/фітомелатоніну на динаміку показників неспецифічної адаптації організму в дорослих і старих щурів, позбавлених шишкоподібної залози.

У щурів визначали рівень сироваткового комплекменту фотометричним методом по 50% гемолізу (од/мл), вміст лізоциму в сироватці крові (мкг/мл), загальну кількість лейкоцитів периферичної крові (10^9 /л), функціональну активність нейтрофільних лейкоцитів крові за показниками НСТ-тесту (%), вміст глікогену в лейкоцитах крові (од), рівень мієлопероксилазної активності крові (од), фагоцитарну активність нейтрофілів (%) та фагоцитарний індекс (од).

У дослід брали і псевдооперованих щурів, які, поряд з інтактними, служили контролем, та епіфізектомованих тварин на 15-20 день після операції.

Епіфізектомію у щурів проводили Y.Kitay, M.Altshule в модифікації В.П.Пішака. Операція проводилася під загальним ефірним наркозом. Пацюка фіксували на операційному столику спиною вгору. Після обробки операційного поля робили розріз по серединній лінії голови довжиною 2 см. Оголювали дах черепа з ясно видимим розташуванням синусів твердої мозкової оболонки. Трепаначію черепа здійснювали зуболікарським бором з подальшим з'єднанням отворів очними ножицями. Вирізали прямокутну пластинку, яка зберігалася

зв'язок з черепом за допомогою м'язового клаптя. Пластинку обережно піднімали. шишкоподібне тіло, що знаходиться в мостом-мозочковому заглибленні безпосередньо під confluence sinuum, видаляли за допомогою спеціального тонко заточеного корцангу. Кісткову пластинку укладали на місце. Кровотечу зупиняли гомостатичною губкою. Тканини пошарово ушивали. Післяопераційний догляд полягав в ізоляції тварини, зігріванні, уведенні ізотонічного розчину хлориду натрію.

Післяопераційний період супроводжувався щоденним моніторингом загального стану тварин. Експериментальні дослідження розпочинали після стабілізації стану щурів.

Титр сироваткового комплементу визначали фотометричним методом за 50% гемолізом. Попередньо отримували калібрувальну криву, що відображає залежність коефіцієнта екстинкції від ступеня гемолізу. За оптичною щільністю визначали відсоток гемолізу в різних дозах сироватки. Для побудови калібрувальної кривої використовували 5% наважку еритроцитів, стандартизованих по оптичній щільності гемоглобіну при максимальному ступені гемолізу (100%). Із щільного осаду готували 5% наважку на веронал-мединаловому буферному розчині: одну частину осаду еритроцитів та 19 частин буферного розчину, 1 мл якої змішували з 3 мл дистильованої води. Після центрифугування при 2000 об/хв протягом 10 хв надосадову рідину, що містить гемоглобін, калориметрували при довжині хвилі 400-480 нм (синій фільтр) і встановлювали коефіцієнт екстинкції, відповідний 100% гемолізу. За цих умов коефіцієнт екстинкції дорівнює 1.08. Тоді, коли він більший або менший цієї величини, знаходять об'єм буфера (V_x), необхідний для приготування стандартизованої 5% суспензії з еритроцитів. Виходячи з розрахованого обсягу буферного розчину готували стандартизовану 5% наважку еритроцитів. Потім частину суспензії лізували, змішуючи 1 мл з 3 мл дистильованої води, центрифугували і отримували надосадову рідину з максимальним (100%) ступенем гемолізу. Готували стандартну шкалу гемолізу, вимірювали оптичну щільність розчину на ФЕК-56М і будували графік

залежності коефіцієнта екстинкції від відсотка гемолізу - калібрувальну криву. Для оцінки рівня комплементу досліджену сироватку розводили 1:10, розливали у 10 пробірок. Об'єм рідини в пробірках доводили буферним розчином до 1 мл і додавали по 1 мл гемолітичної системи. Після струшування пробірки інкубували при 37°C протягом 60 хв, охолоджували 10 хв при 2-5°C і центрифугували 5 хв при 2000 об/хв. На ФЕК-56М визначали коефіцієнт екстинкції надосадової рідини, що містить різні дози сироватки, і по калібрувальній кривій встановлювали відсоток гемолізу. Титр комплементу в 50% гемолітичних одиницях (С'Н50) розраховували виходячи з отриманого гемолізу, користуючись таблицею поправочних коефіцієнтів Крота.

Визначення сироваткового лізоциму проводили турбодиметричним методом Перрі в модифікації Грант. Як тест-культуру застосовували *Micgococcus lysodeicticus*, що має найбільшу чутливість до лізоциму. За результатами вимірювання стандартних розчинів будували калібрувальну криву, що показує залежність величини екстинкції від концентрації лізоциму, за якою визначали кількість лізоциму в дослідних субстратах.

Визначення загальної кількості лейкоцитів проводили за Альтгаузенем за загальноприйнятою методикою в камері Горяєва.

Принцип визначення НСТ-тесту полягає в тому, що при активації фагоцитуючих клітин відбувається відновлення розчинного безкольорового тетразолію нітросинього в диформадин, який розподіляється в цитоплазмі або на поверхні фагоцитів у вигляді гранул, зафарбованих у темно-синій колір. Перегляд препаратів проводили під світловим мікроскопом. До товстої краплі з гепарином додавали розчин тетразолію синього і об'єкт фагоцитозу (стафілококковий штам 209р, густина 2 млрд мікробних тіл в 1 мл). Після культивування у вологій камері при 37°C протягом 10 хв і фарбування препарату метиленовим зеленим, оцінювали реакцію за кількістю НСТ-позитивних клітин, підраховуючи відсоток фагоцитів, що містять диформадин.

Мієлопероксидазу визначили за методом Т.Попова і Л.Нейковської, заснованим на фотометричній реєстрації зниження концентрації індигокарміну, який окислюється пероксидом водню в присутності мієлопероксидази.

Рівень глікогену в лейкоцитах периферичної крові визначили за І.Т. Тодоровим. Досліджену пробу кип'ятили з концентрованим розчином їдкою натрію або калію. При цьому вся органічна матерія руйнувалася, крім глікогену. Глікоген осаджували спиртом і гідролізували сульфатною кислотою до глюкози. Визначали калориметрично з орциновим розчином на фотоелектрокалориметрі при довжині хвилі 530 нм проти контролю.

Фагоцитарну активність поліморфноядерних лейкоцитів досліджували в присутності об'єкта фагоцитозу (жива добова культура стафілококу штам 209-Р). 0,2 мл крові перемішували з 0,1 мл 2% лимоннокислого натрію і 0,1 мл наважки. Витримували в терностаті при 37⁰С 30 хв, центрифугували 3 хв при 1000 об/хв. З верхнього шару плівки робили мазок, який фіксували сумішшю Никифорова і фарбували за Романовським-Гімзе. Зі 100 клітин підраховували фагоцитуючі (відсоток фагоцитарної активності) та визначали кількість мікробів, поглинених у середньому 1 лейкоцитом (фагоцитарний індекс).

Результати, отримані під час експериментальних досліджень, піддані математичному аналізу з визначенням середнього значення, стандартного відхилення від середнього значення, достовірності різниці між середніми величинами за критерієм Стьюдента. Вся обробка цифрового матеріалу проведена на ПК з використанням спеціальних програм статобробки Statistica / SPSS / GraphPad Prism. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

2.1.1. Характеристика експериментальних тварин

Першу групу склали дорослі щури-самці у віці 12-15 міс масою 140-200 г, другу групу склали старі щури віком 24 міс і старше масою 250 г і більше. Загалом використано в експериментах 42 тварини. Тварини утримувалися у віварії при постійному температурному режимі та штучному освітленні. Світловий режим був відповідно: 12 год світло - 12 год темрява. У всі періоди дослідження щури перебували на постійному харчовому режимі з вільним

доступом до води. Експериментальні дослідження проводилися в один час доби. Усі тварини утримувалися в умовах контрольованого мікроклімату:

- температура повітря — 22 ± 2 °С,
- відносна вологість — 50–60 %,
- світловий режим — 12:12 (світло:темрява),
- час увімкнення світла — 08:00, вимкнення — 20:00.

Адаптація тварин до умов експерименту тривала не менше 14 діб.

Експериментальні дослідження виконували відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (ETS №123) та вимог локального біоетичного комітету.

2.1.2. Дизайн експерименту та групування тварин

З метою вивчення стану показників неспецифічної імунологічної адаптації організму досліди проводилися на дорослих та старих пацюках самцях. Дослідженням піддавалися по три групи дорослих та старих тварин: контрольні (інтактні), псевдооперовані та епіфізектомовані.

З метою вивчення ефекту дії на функцію системи неспецифічної імунологічної адаптації організму гормону шишкоподібної залози мелатоніну епіфізектомованим, хибнооперованим та контрольним щурам двох вікових груп вводили внутрішньочеревинно синтетичний мелатонін у дозі 100 мкг на 100 г маси тіла, розведений в 0,2 мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

Мелатонін/фітомелатонін вводили тваринам один раз на добу протягом 7 діб у строго фіксований час - за 30 хвилин до початку темної фази (19:30), що відповідає фізіологічному піку ендогенної секреції мелатоніну у інтактних тварин. Контрольна група отримувала відповідний об'єм розчинника у той самий часовий проміжок.

Такий режим введення дозволяв оцінити синхронізуючий ефект екзогенного мелатоніну та його рослинного аналога в умовах відсутності власної епіфізарної секреції.

Ефективність мелатоніну та фітомелатоніну визначали за ступенем відновлення структури показників неспецифічної імунологічної адаптації.

2.1.3. Фітомелатонін у моделях з видаленням/пригніченням шишкоподібної залози

У більшості експериментів з пінеалектомованими (pinealectomized, PINX) тваринами використовують чистий мелатонін (лабораторного/фармацевтичного походження — наприклад, Sigma-Aldrich та ін.) для відновлення/заміни.

Під «фітомелатоніном» зазвичай мають на увазі мелатонін, виділений або отриманий з рослинних екстрактів (plant-derived melatonin) або суміші рослинних концентратів, що містять мелатонін. Тому в контрольованих експериментах частіше застосовують стандартизований синтетичний мелатонін.

2.2. Обґрунтування можливості екстраполяції результатів дослідження на людину

Вибір моделі старих щурів зумовлений подібністю вікових змін функції шишкоподібної залози та неспецифічної імунологічної реактивності у гризунів і людини, що дозволяє розглядати отримані результати як експериментальне обґрунтування потенційних геропротекторних та хронобіологічних ефектів мелатоніну.

Застосування моделі пінеалектомії сприяє розгляду отриманих результатів як експериментального обґрунтування ролі мелатоніну у віковій регуляції неспецифічної імунологічної адаптації та створює передумови для екстраполяції отриманих даних на процеси старіння організму людини, дозволяє формувати оптимальний вектор корекції неспецифічного імунітету в геронтології та геріатрії.

РОЗДІЛ 3
ВІДОМОСТІ ПРО ПРОВЕДЕНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ
ДОСЛІДЖЕННЯ.
ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНІНУ/ФІТОМЕЛАТОНІНУ НА
ПОКАЗНИКИ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ У ДОРΟΣЛИХ І
СТАРИХ ЕПІФІЗЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ

Літературні дані свідчать, що діяльність системи неспецифічного імунітету змінюється при видаленні шишкоподібної залози і певною мірою залежить від віку тварин [1,14,20,63,65,77].

У наших експериментах представляв інтерес вивчити функціонування системи неспецифічної імунологічної адаптації з урахуванням віку тварин після введення синтетичного аналога гормону шишкоподібної залози – мелатоніну/фітомелатоніну. В досліджах використовували 6 груп тварин, по 7 щурів у кожній. Перша група – контрольні, друга – хибнооперовані, третя – епіфізектомовані тварини. Четверта група – контрольні, п'ята – хибнооперовані, шоста - епіфізектомовані тварини, яким вводили мелатонін внутрішньоочеревинно в дозі 100 мкг на 100 г маси тіла, розведений в 0,2 мл ізотонічного розчину натрію хлориду.

3.1. Вплив мелатоніну на показники неспецифічної адаптації у дорослих епіфізектомованих щурів

Вміст сироваткового комплементу у дорослих щурів при внутрішньоочеревинному введенні мелатоніну представлено на рис. 3.1. У контрольних тварин введення мелатоніну призводило до збільшення рівня показника (55,7 од/мл). Характерна картина спостерігалася і у хибнооперованих тварин, комплементарна активність зростала. У групі епіфізектомованих щурів після введення мелатоніну картина відповідала контрольним. Отже, екзогенний мелатонін призводить до збільшення вмісту сироваткового комплементу у всіх групах щурів. Характерних відмінностей не відзначалося.

На рис. 3.2 представлено вплив мелатоніну на вміст сироваткового лізоциму. У контрольних тварин рівень показника зростав (37,8 мкг/мл). У

хибнооперованих тварин рівень лізоциму також збільшувався (36,5 мкг/мл), порівняно з величинами до введення мелатоніну. Видалення шишкоподібної залози призводить до підвищення рівня сироваткового лізоциму. Введення екзогенного мелатоніну викликає у цих груп зниження показника до 32,1 мкг/мл, що наближається до значень у контрольних групах. Таким чином, у дорослих щурів мелатонін нормалізує рівень сироваткового лізоциму.

Вплив мелатоніну на вміст загальної кількості лейкоцитів у дорослих щурів представлено на рис. 3.3. У інтактних щурів рівень лейкоцитів мав тенденцію до збільшення. У хибнооперованих тварин не спостерігалось суттєвої зміни кількості лейкоцитів. У епіфізектомованих щурів достовірних змін не реєструвалося. Значення показника лише дещо знижувалися. Отже, введення мелатоніну епіфізектомованим щурам не змінює середніх значень показника, а призводить до недостовірного зниження рівня лейкоцитів.

Вплив мелатоніну на рівень НСТ-тесту у дорослих щурів представлено на рис. 3.4. У інтактних тварин мелатонін спричиняв незначне зниження рівня НСТ-тесту (5,9%). Тоді як у хибнооперованих щурів знижувався рівень показника до значень, характерних для контрольних тварин. У групі епіфізектомованих тварин мелатонін дещо підвищував рівень НСТ-тесту (6,3%). Отже, збільшення рівня НСТ-тесту у дорослих щурів виявляється тільки при відсутності шишкоподібної залози.

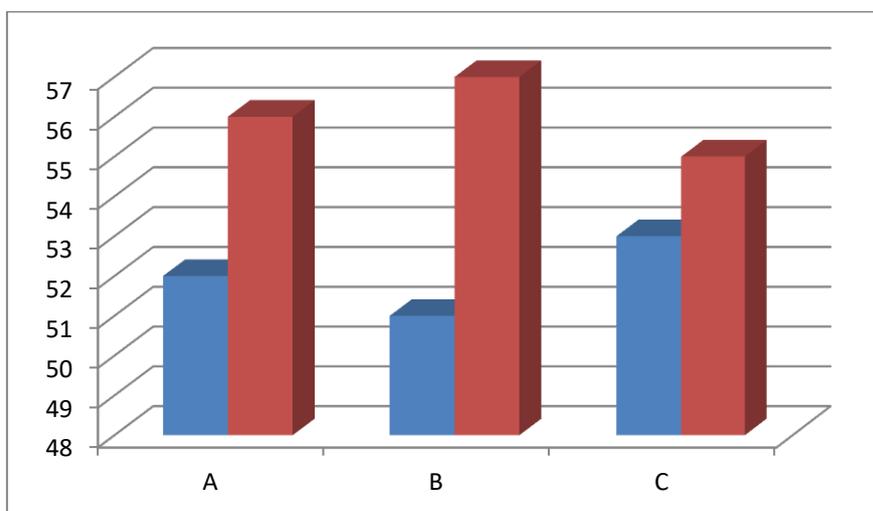


Рис. 3.1. Вплив мелатоніну на активність сироваткового комплексу (од/мл) у дорослих епіфізектомованих щурів
Примітка:

A – інтактні; B – хибнооперовані; C – епіфізектомовані щури; I – без мелатоніну; II – з мелатоніном.

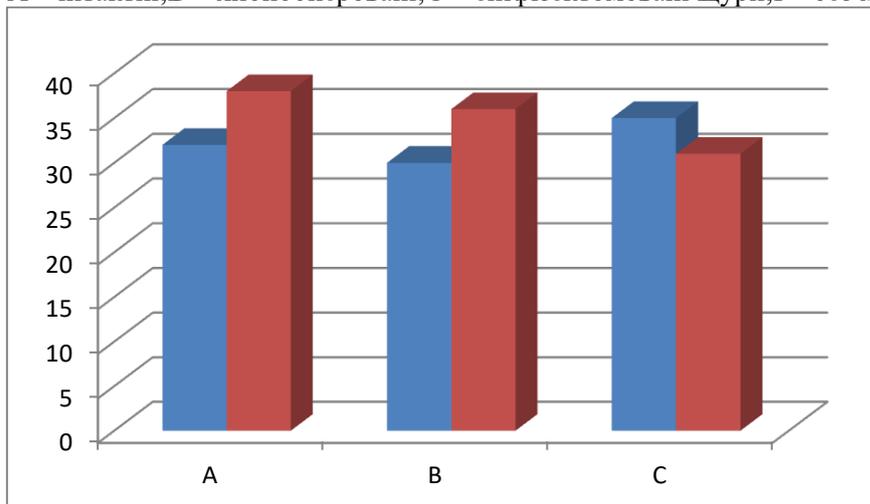


Рис. 3.2. Вплив мелатоніну на вміст сироваткового лізоциму (мкг/мл) у дорослих епіфізектомованих щурів

Примітка: див. рис. 3.1.

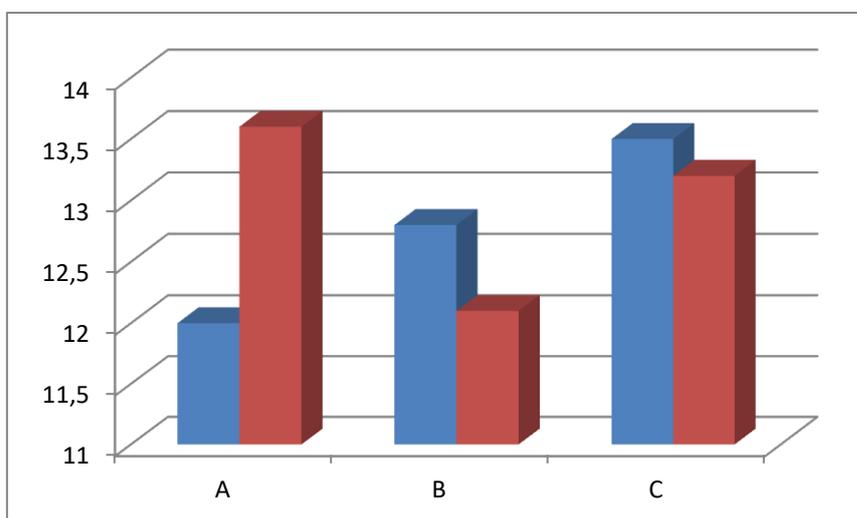


Рис. 3.3. Вплив мелатоніну на вміст загальної кількості лейкоцитів ($10^9/\text{л}$) у дорослих епіфізектомованих щурів

Примітка: див. рис. 3.1.

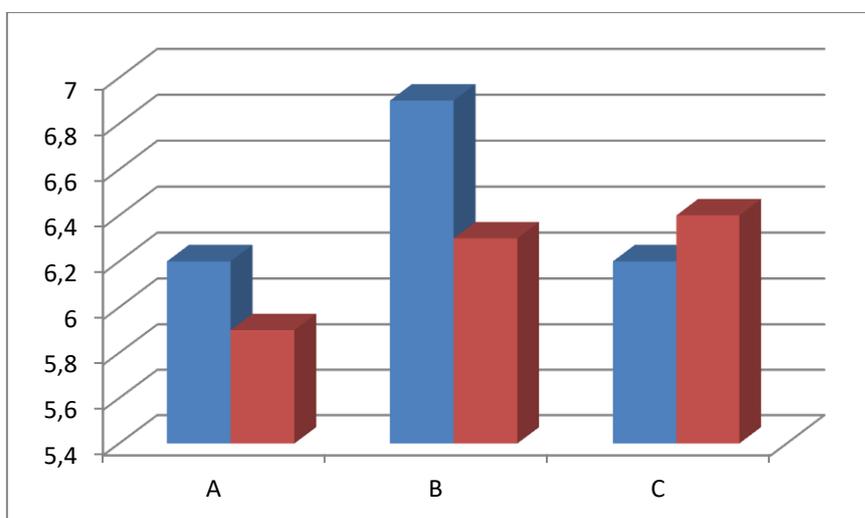


Рис. 3.4. Вплив мелатоніну на показник НСТ-тесту (χ) у дорослих епіфізектомованих щурів

Примітка: див. рис. 3.1.

Вплив мелатоніну на вміст глікогену в нейтрофілах у дорослих щурів представлено на рис. 3.5. У інтактних тварин достовірно ($P < 0,05$) знижується рівень показника (42,4 од). Аналогічна картина спостерігалася і в групі хибнооперованих щурів. У епіфізектомованих щурів після введення препарату достовірного зниження рівня показника, як у контрольних груп, не відзначалося. Значення відповідали рівню вмісту глікогену у щурів, яким мелатонін не вводився. Таким чином, введення мелатоніну дорослим епіфізектомованим щурам змінює вміст глікогену.

Вплив мелатоніну на вміст мієлопероксидази в нейтрофілах у дорослих щурів представлено на рис. 3.6. У групі контрольних тварин рівень показника після введення препарату знижувався (221,7 од). Аналогічні зміни відзначалися і в групі хибнооперованих щурів. Для епіфізектомованих тварин була характерна інша картина. Видалення шишкоподібної залози знижувало рівень показника (217,2 од). Після введення мелатоніну не тільки нормалізувався, а навіть підвищувався вміст мієлопероксидази (220,1 од). Таким чином, у контрольних групах мелатонін виявляє інгібуючу дію на вміст мієлопероксидази і нормалізує значення показника після епіфізектомії.

Після введення екзогенного мелатоніну (рис. 3.7) відбувалося збільшення показника фагоцитарної активності нейтрофілів у контрольних щурів (78,3 %). У хибнооперованих тварин характер впливу мелатоніну не відрізнявся від такого у контрольних щурів. У епіфізектомованих тварин після введення препарату рівень показника достовірно ($P < 0,05$) збільшувався (78,5 %). Отже, екзогенний мелатонін, поряд з деяким зниженням фагоцитарної активності в групах контрольних щурів, призводить до достовірного збільшення показника у дорослих епіфізектомованих тварин.

Вплив мелатоніну на рівень фагоцитарного індексу (рис. 3.8) у інтактних тварин супроводжувався зниженням рівня показника. У групі хибнооперованих щурів рівень фагоцитарного індексу суттєвих змін не зазнавав як до, так і після введення мелатоніну. Мелатонін у дорослих епіфізектомованих щурів також не призводить до достовірної зміни рівня фагоцитарного індексу.

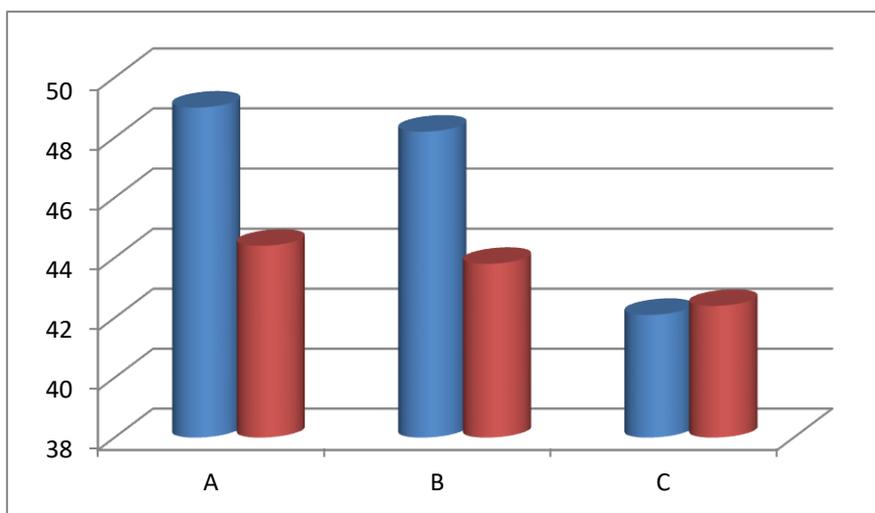


Рис. 3.5. Вплив мелатоніну на вміст глікогену (од) у дорослих епіфісектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

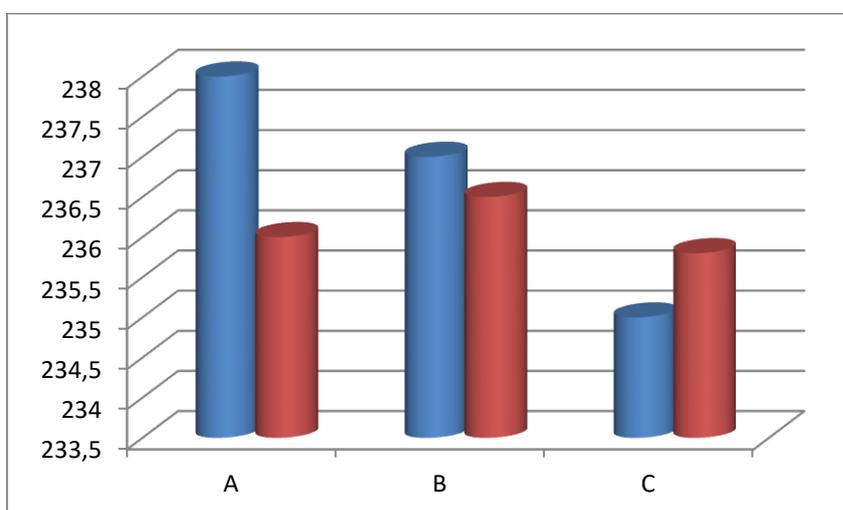


Рис. 3.6. Вплив мелатоніну на активність мієлопероксидази (од) у дорослих епіфісектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

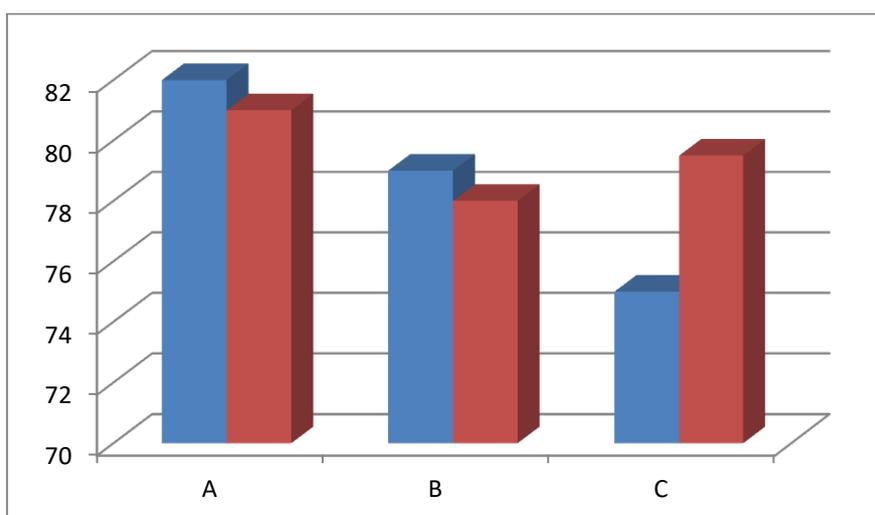


Рис. 3.7. Вплив мелатоніну на фагоцитарну активність (%) у дорослих епіфісектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

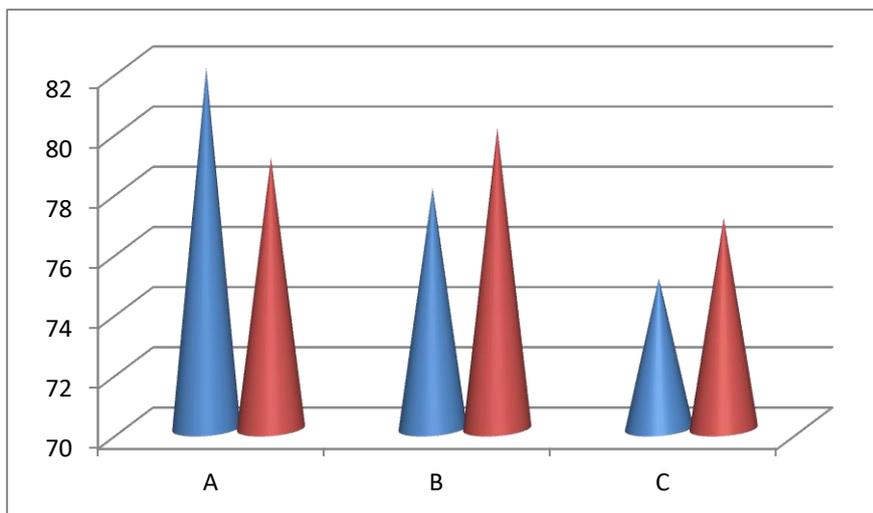


Рис. 3.8. Вплив мелатоніну на рівень фагоцитарного індексу (од) у дорослих епіфізектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

Можна резюмувати, що результати показників неспецифічної адаптації у дорослих контрольних та епіфізектомованих щурів після введення екзогенного мелатоніну змінюються по-різному: збільшується комплементарна активність сироватки в контрольних групах і у епіфізектомованих щурів, збільшується рівень сироваткового лізоциму в контрольних групах і нормалізується значення у епіфізектомованих тварин. Це не впливає на рівень вмісту лейкоцитів як у контролі, так і у епіфізектомованих щурів. Зниження рівня в контрольних групах і нормалізація показника у епіфізектомованих щурів характерна для НСТ-тесту, глікогену в нейтрофілах і вмісту мієлопероксидази. Збільшуються показники фагоцитозу у щурів з видаленим шишкоподібним тілом, поряд з незначним зниженням рівня в групах інтактних і хибнооперованих тварин.

Висновок. Таким чином, введений екзогенний мелатонін в умовах епіфізектомії у дорослих щурів усуває деякі наслідки видалення шишкоподібної залози. Нормалізуються значення сироваткового комплементу, НСТ-тесту, вмісту глікогену, мієлопероксидази, фагоцитарної активності.

3.2. Вплив мелатоніну на показники неспецифічної адаптації у старих епіфізектомованих щурів

Вплив мелатоніну на вміст сироваткового комплементу у старих інтактних тварин (рис. 3.9) призводив до достовірного ($P < 0,05$) збільшення

рівня показника (45,3 од/мл). У хибнооперованих щурів також збільшувався рівень комплементарної активності (44,4 од/мл). Після введення мелатоніну епіфізектомованим щурам відбувалася нормалізація комплементарної активності, порушення якої відзначалося в результаті епіфізектомії. Отже, мелатонін підвищує вміст комплементу у старих щурів і нормалізує рівень показника у епіфізектомованих тварин.

Введення мелатоніну інтактним тваринам (рис. 3.10) підвищує вміст лізоциму (48,5 мкг/мл). Збільшення рівня показника спостерігається і у хибнооперованих щурів. У епіфізектомованих щурів при старінні відзначалося достовірне ($P < 0,05$) зниження вмісту лізоциму (46,0 мкг/мл). Після введення мелатоніну відбувалося ще більше підвищення рівня лізоциму (50,7 мкг/мл).

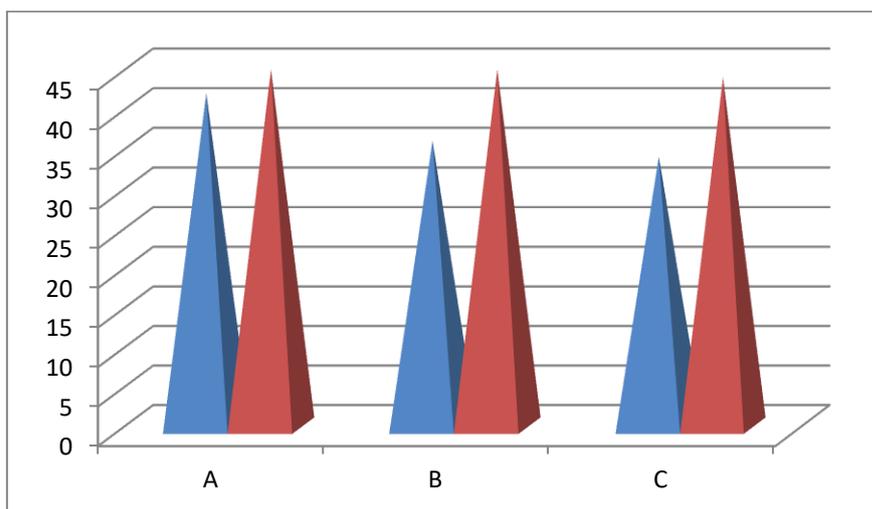


Рис. 3.9. Вплив мелатоніну на активність сироваткового комплементу (од/мл) у старих епіфізектомованих щурів

Примітка: див. рис. 3.1.

Загальна кількість лейкоцитів у старих інтактних тварин зменшувалася після введення мелатоніну ($11,3 \cdot 10^9/\text{л}$), порівняно з групою інтактних щурів, яким препарат не вводився (рис. 3.11). У хибнооперованих тварин після введення мелатоніну також знижувалася кількість лейкоцитів ($11,9 \cdot 10^9/\text{л}$). Аналогічна картина спостерігалася і у старих епіфізектомованих щурів.

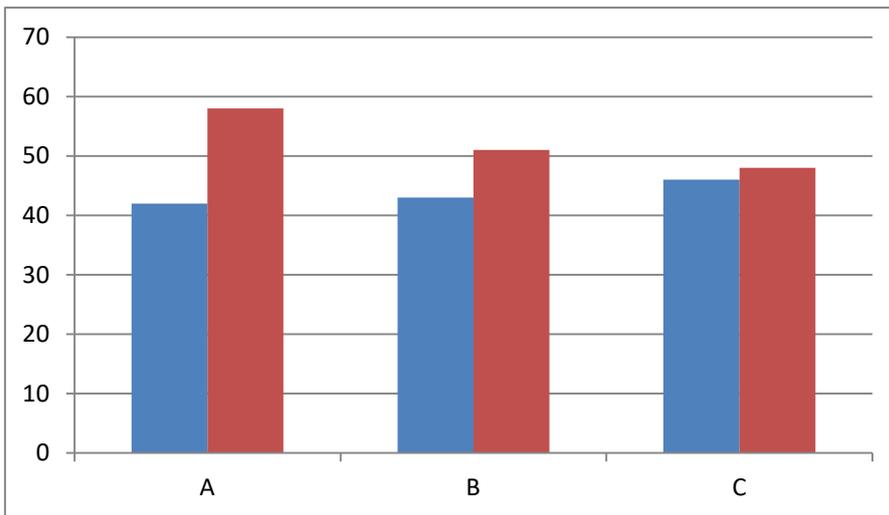


Рис. 3.10. Вплив мелатоніну на вміст сироваткового лізоциму (мкг/мл) у старих епіфізектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

На рис. 3.12 наведено гістограми впливу мелатоніну на рівень НСТ-тесту у старих щурів. У групі інтактних тварин мелатонін не змінює величину показника. У хібнооперованих тварин рівень показника достовірно ($P < 0,05$) зростав з 5,2 % до 6,2 %. Суттєве підвищення рівня НСТ-тесту відбувалося і у епіфізектомованих щурів. Таким чином, мелатонін у інтактних щурів не змінює рівень НСТ-тесту, у хібнооперованих призводить до достовірного його підвищення, а при епіфізектомії призводить до зростання показника до норми.

У старих інтактних тварин введення мелатоніну призводило до незначного зниження вмісту глікогену (рис. 3.13). В групі хібнооперованих тварин характер впливу мелатоніну на рівень глікогену не носив достовірних відмінностей. Рівень показника дорівнював 34,5 од. Спостерігалось збільшення цього показника у епіфізектомованих щурів.

Відсутні достовірні відмінності у вмісті мієлопероксидази до і після введення мелатоніну контрольним щурам (195,9 – 198,7 од). Після хібної операції показники рівня мієлопероксидази під впливом мелатоніну не зазнавали суттєвих відмінностей (рис. 3.14). Епіфізектомія достовірно ($P < 0,05$) знижувала вміст мієлопероксидази у старих щурів (172,5 од). Введення мелатоніну нормалізує цей показник. Таким чином, у старих щурів мелатонін не впливає на рівень мієлопероксидази в крові контрольних груп і

призводить до нормалізації показника у епіфізектомованих тварин. Це вказує на роль мелатоніну в усуненні наслідків епіфізектомії у старих щурів щодо зниження мієлопероксидази в крові.

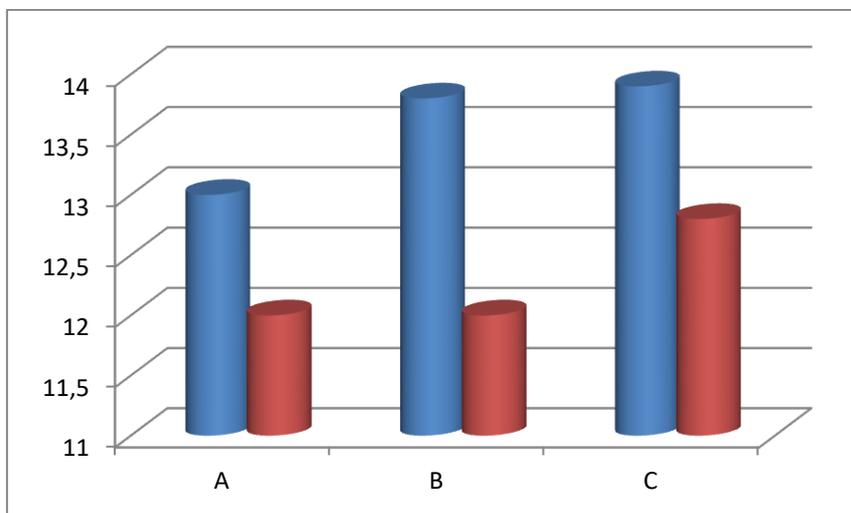


Рис. 3.11. Вплив мелатоніну на вміст загальної кількості лейкоцитів ($10^9/\text{л}$) у старих епіфізектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

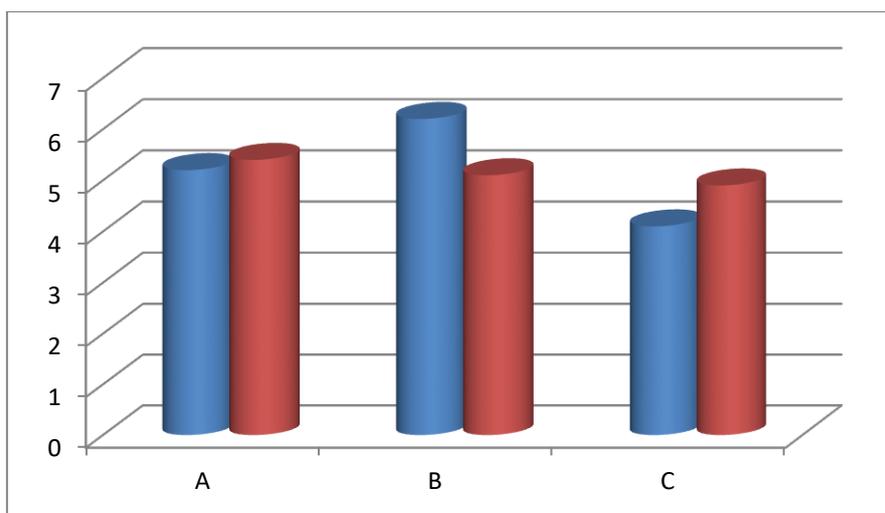


Рис. 3.12. Вплив мелатоніну на показник НСТ-тесту (%) у старих епіфізектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

Фагоцитарна активність нейтрофілів у старих інтактних щурів зберігається досить стабільною після введення мелатоніну (рис. 3.15). Не спостерігається суттєвих змін після введення мелатоніну і у хібнооперованих щурів (60,0 %). Епіфізектомія достовірно ($P < 0,05$) знижувала рівень фагоцитарної активності (49,1 %). Цей показник збільшувався під впливом введення мелатоніну (58,9 %) і досягав значень, характерних для щурів, не підданих видаленню залози.

У інтактних тварин середні значення фагоцитарного індексу після введення мелатоніну (рис. 3.16) не змінювалися (5,1 од), дещо зростали (4,9 од) у хибнооперованих і достовірно підвищувались у епіфізектомованих щурів.

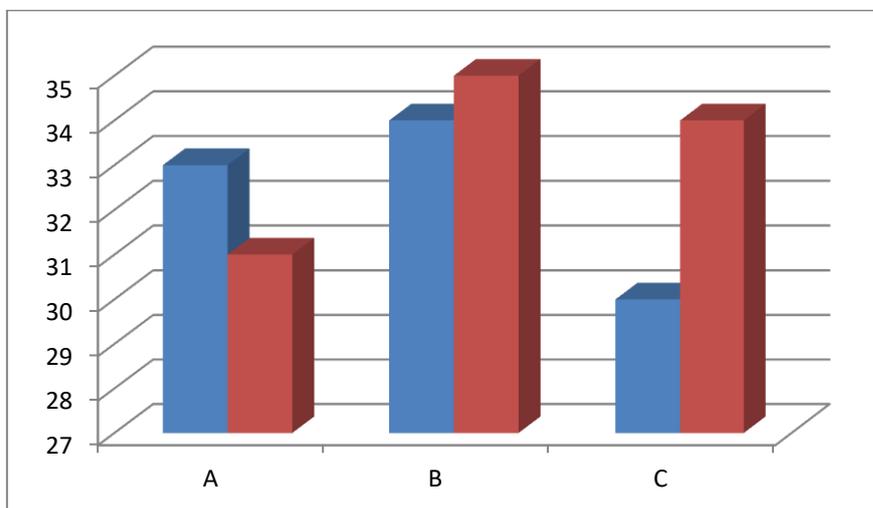


Рис. 3.13. Вплив мелатоніну на вміст глікогену (од) у старих епіфізектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

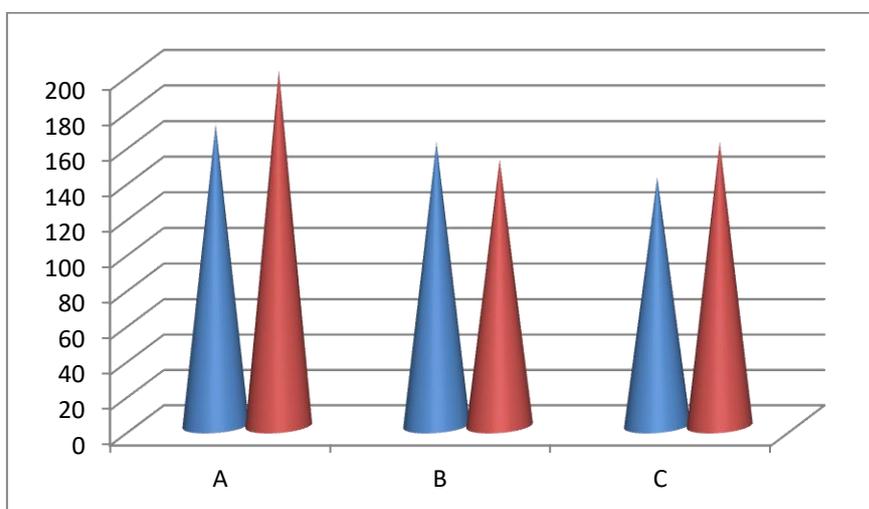


Рис. 3.14. Вплив мелатоніну на активність мієлопероксидази (од) у старих епіфізектомованих щурів
Примітка: див. рис. 3.1.

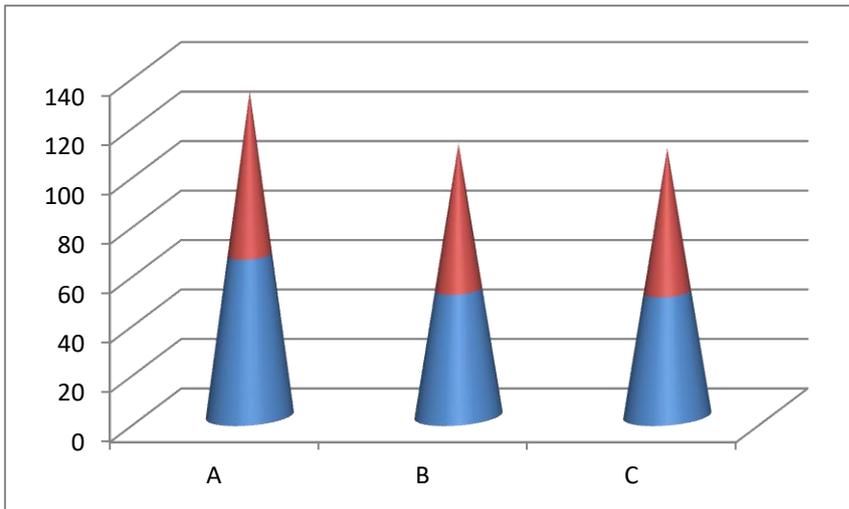


Рис. 3.15. Вплив мелатоніну на фагоцитарну активність (%) у старих епіфізектомованих щурів

Примітка: див. рис. 3.1.

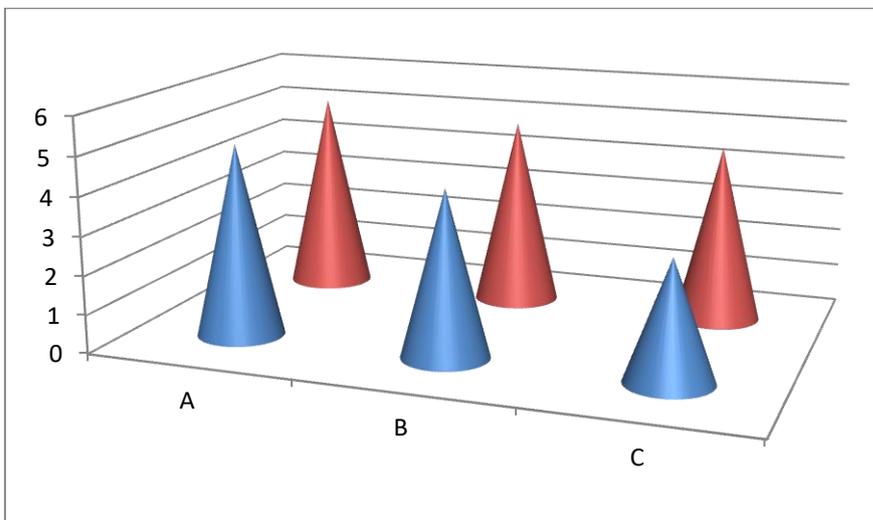


Рис. 3.16. Вплив мелатоніну на рівень фагоцитарного індексу (од) у старих епіфізектомованих щурів

Примітка: див. рис. 3.1.

Отже, у старих щурів мелатонін не чинить суттєвого впливу на рівень фагоцитарного індексу в групі інтактних, дещо зменшує вміст у хібнооперованих і призводить до достовірного підвищення рівня фагоцитарного індексу у епіфізектомованих щурів, що, очевидно, свідчить про дію мелатоніну як стимулятора інтенсивності роботи мікрофагів у старих тварин, позбавлених шишкоподібної залози.

Таким чином, введення внутрішньочеревно мелатоніну у старих щурів має певні особливості. Так, екзогенний мелатонін призводить до підвищення комплементарної активності та вмісту лізоциму в сироватці крові у контрольних та епіфізектомованих тварин. Відсутність ефекту в контрольних групах і приведення рівня показників до значення норми характерно при дослідженні впливу мелатоніну на вміст глікогену, мієлопероксидази, фагоцитарної активності та НСТ-тесту. Не виявлено впливу мелатоніну на вміст лейкоцитів як у контрольних, так і у епіфізектомованих щурів. Отже, можна припустити суттєву імуностимулюючу дію мелатоніну на деякі показники неспецифічного захисту у щурів, що особливо рельєфно виявлялося у епіфізектомованих тварин.

Можна зробити **висновок**, що мелатонін діє цілеспрямовано на показники неспецифічної адаптації у щурів, позбавлених шишкоподібної залози. У дорослих щурів мелатонін призводить до нормалізації змінених показників в результаті епіфізектомії комплементарної активності сироватки крові, рівня НСТ-тесту, вмісту глікогену, мієлопероксидази, показників фагоцитозу. У старих щурів після ін'єкцій мелатоніну до контрольних цифр наближалися значення показників вмісту глікогену, мієлопероксидази, рівня НСТ-тесту, фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ АВТОРА

У представленому дослідженні вперше здійснено комплексний аналіз впливу мелатоніну та фітомелатоніну на стан показників неспецифічної імунологічної адаптації в умовах експериментальної пінеалектомії у старих щурів. Видалення шишкоподібної залози у старих тварин призводило до порушень структури показників неспецифічного імунного захисту, які певною мірою піддавалися корекції після застосування штучного гормону мелатоніну/фітомелатоніну. Отримані дані узгоджуються з сучасними уявленнями про провідну роль шишкоподібної залози і мелатоніну у підтриманні узгодженості при функціонуванні системи неспецифічного імунного захисту, особливо в умовах вікового зниження нейроендокринної регуляції [14].

З метою з'ясування механізмів впливу шишкоподібної залози на систему неспецифічної адаптації організму при старінні дорослим і старим щурам вводили синтетичний аналог гормону епіфізу мелатонін. У дорослих щурів зі збереженим шишкоподібним тілом і у епіфізектованих тварин показники мали різноспрямовану тенденцію. На рівень одних показників впливає наявність чи відсутність шишкоподібної залози, для інших – присутність залози не має значення. Мелатонін призводив до зростання рівня комплементарної активності сироватки крові в контрольних групах і у епіфізектованих щурів. Збільшення рівня показника у контрольних груп і зниження (нормалізація) значення у епіфізектованих характерні для показників сироваткового лізоциму. Не зареєстровано достовірного впливу гормону на рівень кількості лейкоцитів як у досліді, так і в контролі. Зниження рівня в контрольних групах і нормалізація показника у епіфізектованих щурів були властиві динаміці НСТ-тесту, рівню глікогену і активності мієлопероксидази. Збільшувалися показники фагоцитозу у щурів, позбавлених шишкоподібного тіла, поряд з деяким зміщенням рівня в контролі. Таким чином, екзогенний мелатонін у дорослих щурів при

півнеалектомії усуває лише деякі її наслідки. Нормалізуються значення рівня сироваткового комплементу, НСТ-тесту, вмісту глікогену, мієлопероксидази та фагоцитарної активності нейтрофілів.

Вплив введеного внутрішньочеревинно мелатоніну у старих щурів має певні особливості. Підвищувався вміст комплементу та сироваткового лізоциму в групах дослідних та контрольних тварин. Відсутність ефекту в контрольних групах та приведення показника до значень норми було характерно при дослідженні впливу мелатоніну на вміст глікогену, мієлопероксидази, фагоцитарної активності та НСТ-тесту. Не виявлено впливу мелатоніну на кількість лейкоцитів як у контрольних, так і у епіфізектомованих щурів. Отже, можна припустити наявність імуностимулюючого впливу екзогенного мелатоніну на деякі показники неспецифічної адаптації у старих щурів, що особливо добре було виражено у дослідних тварин, коли відбувалася нормалізація показників глікогену, мієлопероксидази, НСТ-тесту, фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу, які суттєво змінювалися внаслідок епіфізектомії.

Визначено, що введення синтетичного гормону мелатоніну має різноспрямовану дію на показники неспецифічної адаптації у щурів при позбавленні їх шишкоподібного тіла. Чітко прослідковується наявність вікової залежності.

Підсумовуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що шишкоподібна залоза причетна до регуляції системи неспецифічної імунологічної адаптації організму, цей вплив має вікові особливості та зберігається до старості. Регулюючий вплив пінеальної залози на імуноструктурний гомеостаз здійснюється за допомогою одного з основних інгредієнтів – гормоном мелатоніном, хоча його парентеральне введення призводить до відновлення лише деяких порушень, що виникли внаслідок епіфізектомії. Це дозволяє вважати, що вплив шишкоподібної залози на процеси неспецифічної імунологічної адаптації здійснюється всім комплексом біологічно активних речовин, що продукуються цією залозою. Важливим

чинником профілактики зниження активності системи неспецифічного імунного захисту при старінні організму є застосування препаратів які мітять мелатонін та фітомелатонін.

Виявлені зміни неспецифічної імунологічної адаптації після пінеалектомії відображають стан дезорганізації системи неспецифічного імунітету, який за своїми характеристиками наближається до вікової дезінтеграції у людини. Це підтверджує адекватність обраної експериментальної моделі для вивчення механізмів старіння та терапевтичних підходів до його корекції. Введення мелатоніну сприяло частковому або повному відновленню нормального стану досліджуваних показників. Нормалізація та синхронізуюча дія мелатоніну вказують, що протекторна дія реалізується не лише через прямий вплив на імунокомпетентні клітини, але й через відновлення центральних механізмів координації неспецифічного імунного захисту при старінні організму.

Особливу увагу заслуговує встановлений ефект фітомелатоніну, який у більшості випадків не поступався синтетичному аналогу за здатністю відновлювати структуру показників неспецифічної імунологічної адаптації. Це дозволяє припустити, що рослинний мелатонін зберігає біологічну активність, характерну для ендогенного гормону, та може розглядатися як потенційний хронобіотик у геронтологічних моделях, що свідчить про системний адаптогенний ефект мелатоніну та фітомелатоніну в умовах вікової і пінеалектомічної дезадаптації.

Отримані результати розширюють сучасні уявлення про роль мелатоніну(фітомелатоніну) як інтегративного регулятора, який забезпечує узгодження між нейроендокринною та імунною системами в умовах старіння організму, та підтверджують доцільність використання досліджуваного методу та підходу при оцінці ефективності потенційних геропротекторних засобів.

ВИСНОВКИ

1. При старінні процеси неспецифічної імунологічної адаптації організму щурів характеризуються зниженням комплементарної активності сироватки крові, НСТ-тесту, показників фагоцитозу, вмісту глікогену в нейтрофільних лейкоцитах та активності мієлопероксидази крові; збільшенням загальної кількості лейкоцитів та вмісту сироваткового лізоциму.
2. Екзогенний мелатонін виявляє свою дію залежно від віку тварин. При інтактній шишкоподібній залозі мелатонін у дорослих щурів збільшує активність комплементу, вміст сироваткового лізоциму, зменшує рівень НСТ-тесту, вміст глікогену, активність мієлопероксидази та показників фагоцитозу. У старих щурів після введення мелатоніну збільшується лише комплементарна активність та вміст лізоциму.
3. У епіфізектомованих дорослих щурів мелатонін нормалізує комплементарну активність, рівень НСТ-тесту, вміст глікогену, мієлопероксидазну активність та активність фагоцитів. У старих пінеалектомованих щурів нормальних величин досягає вміст глікогену. НСТ-тест, активність мієлопероксидази та фагоцитарна активність.
4. Отримані результати експериментально обґрунтовують доцільність застосування мелатоніну та фітомелатоніну як потенційних хронотерапевтичних і геропротекторних засобів для корекції вікових порушень неспецифічної імунологічної адаптації.

ТЕОРЕТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РОБОТИ

Результати дослідження суттєво розширюють сучасні уявлення про роль шишкоподібної залози та мелатоніну як інтегративної ланки між нейроендокринною та імунною системами в умовах старіння організму. Отримані дані поглиблюють теорію вікової дезорганізації, доповнюючи її положеннями про дезінтеграцію неспецифічної імунологічної адаптації та можливість її фармакологічної корекції. Пінеалектомія призводила до дезорганізації імунологічних показників. Введення мелатоніну та

фітомелатоніну сприяло відновленню структури неспецифічної імунологічної адаптації організму. Мелатонін і фітомелатонін є ефективними синхронізуючими чинниками в умовах вікової і нейроендокринної дезадаптації.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Отримані експериментальні дані доцільно використовувати при розробці обґрунтованих підходів до корекції вікових порушень неспецифічної імунологічної адаптації, асоційованих зі зниженням функції шишкоподібної залози.
2. Мелатонін та фітомелатонін можуть розглядатися як терапевтичні засоби, здатні відновлювати структуру імунологічних показників у літньому та старечому віці.
3. При екстраполяції експериментальних результатів на людину доцільно орієнтуватися на дози мелатоніну в межах 3–6 мг/добу, які відповідають фізіологічно релевантним концентраціям і мають потенціал імуномодулюючої дії.
4. Отримані результати можуть бути використані:
 - у геронтології - для обґрунтування хронотерапії вікових порушень адаптації;
 - у клінічній імунології - як експериментальна основа для корекції неспецифічної резистентності;
 - у хронобіології та хрономедицині - для оптимізації часу призначення мелатонінвмісних засобів.

Підтверджую, що дана робота пройшла перевірку на академічну доброчесність і відповідає її принципам.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антонюк-Щеглова ІА. Корекція порушеної мелатонін-утворювальної функції епіфіза у літніх людей замісними дозами мелатоніну і пептидними препаратами епіфіза. Проблеми ендокринної патології. 2013;4:7-17. doi: 10.21856/j-PER.2013.4.01
2. Антонюк-Щеглова ІА. Мелатонін-утворювальна функція епіфіза при старінні. Шляхи корекції [дисертація]. Київ; 2014. 340 с.
3. Боцюрко ВІ. Мелатонін – «гормон ночі» і не тільки ... Здоров'я України. Діабетологія. Тиреоїдологія. Метаболічні розлади. 2015;2:204.
4. Булик РЄ, Бурачик АІ, Булик ТС, Кривчанська МІ, Власова КВ. Морфофункціональні перетворення в нейронах супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів на фоні різної тривалості освітлення і при корекції мелатоніном. Вісник проблем біології і медицини. 2021;1:245-8. doi: 10.29254/2077-4214-2021-3-161-245-248
5. Булик РЄ, Власова КВ, Бурачик АІ. Оцінка динаміки морфофункціонального стану нейронів супрахіазматичних ядер гіпоталамуса щурів за тривалої світлової експозиції. Буковинський медичний вісник. 2016;20(4):30-3. doi: 10.24061/24130737.XX.4.80.2016.186
6. Булик РЄ, Заморський П, Пішак ВП. Участь пептидів шишкоподібної залози у забезпеченні функцій фотоперіодичної системи головного мозку та нирок (огляд літератури та власні дослідження). Буковинський медичний вісник. 2012;16(2):67-71. doi: 10.24061/223185
7. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Аналіз щільності мелатонінових рецепторів типу 1А у нейронах передньо-бічного передзорового ядра гіпоталамуса щурів за різного світлового режиму. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2020;3:45-9. doi: 10.11603/18112471.2020.v.i3.11581
8. Булик РЄ, Йосипенко ВР. Морфометрична характеристика вентролатерального преоптичного ядра гіпоталамуса зрілих щурів за модифікації фотоперіоду. Буковинський медичний вісник. 2020;24(2):9-14. doi: 10.24061/2413-0737.XXIV.2.94.2020.36

9. Булик РЄ, Сметанюк ОВ, Власова КВ, Кривчанська МІ. Вплив різного режиму освітлення на морфометричну характеристику нейронів паравентрикулярних ядер гіпоталамуса щурів. Клінічна та експериментальна патологія. 2021;20(3):11-8. doi: 10.24061/1727 4338.XX.3.77.2021.2
10. Булик РЄ, Булик ТС, Сметанюк ОВ, Власова КВ, Кривчанська МІ. Ефекти мелатоніну на щільність мелатонінових рецепторів у надзоровому ядрі гіпоталамуса щурів за умов стресу. Вісник проблем біології і медицини. 2021;3:245-8. doi: 10.29254/2077421420213161245248
11. Вислоцька ЛВ, Гутий БВ, Вервега БМ, Мартишук ТВ, Гута ЗА. Динаміка показників антиоксидантної системи крові щурів за умов оксидативного стресу та дії ліпосомального препарату. Клінічна та експериментальна патологія. 2023;4(86):3-10. doi: 10.24061/1727-4338.XXII.4.86.2023.01
12. Власова КВ. Ультрамیکроскопічна організація супраоптичного ядра гіпоталамуса щурів за умов гіперліюмінізації. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2015;14(4):87-90. doi: 10.24061/1727 0847.14.4.2015.19
13. Дубенко ФЄ, Реміняк ІВ, Бабкіна ЮА, Реміняк ЮК. Порушення циркадного ритму сну. *НейроNews*. 2020;2:28-33.
14. Захарчук ОІ, Пішак ОВ. Вікова залежність зв'язків шишкоподібної залози з хроноритмічними змінами імуноструктурного гомеостазу. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2013;6(54):162-4.
15. Йосипенко ВР. Онтогенетичні особливості структур переднього гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду [дисертація]. Чернівці; 2022. 222с.
16. Комісаренко СВ, редактор. Під знаком Нобеля: лідери наукового прогресу або роздуми вченого-біохіміка й імунолога про розвиток і значення наук про життя. Київ; 2020. Розділ, Для чого потрібні циркадні ритми, або як змінити хід «біологічного годинника»; с. 150-67.
17. Кривчанська МІ, Пішак ОВ, Пішак ВП. Реакція шишкоподібної залози на деякі агоністи та антагоністи бета-адренорецепторів у постнатальному онтогенезі. Клінічна та експериментальна патологія. 2018;17(3):156-61.

18. Ломакіна ЮВ, Булик РЄ. Морфо-функціональний стан шишкоподібної залози за стандартного режиму освітлення у старих щурів. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2016;15(2):50-4. doi: 10.24061/1727-0847.15.2.2016.40
19. Макарчук ВА, Ушакова ГО, Крилова ОО. Стан Системи глутатіону в крові щурів та особливості морфологічних змін тканини підшлункової залози в умовах експериментального гострого та хронічного панкреатиту. Український біохімічний журнал. 2013;85(1):45-52.
20. Пішак ВП, Булик РЄ, Кривчанська МІ, Громик ОО, Пішак ОВ. Основні фізіологічні властивості мелатоніну. Інтегративна Антропологія. 2015;1:32-8.
21. Пшиченко ВВ, Черно ВС. Вплив хронічного стресу на морфометричні показники пінеальних клітин щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2018;4(2):298-300. doi: 10.29254/2077-4214-2018-4-2-147-298-300
22. Пшиченко ВВ, Лабенко, ВВ. Вплив хронічного стресу на гістофізіологічний стан шишкоподібної залози щурів. Науковий вісник Миколаївського державного університету імені В.О. Сухомлинського. 2014;6.3(113):86-9.
23. Пшиченко ВВ, Волобуєв МА. Морфологічний стан екстраорганного кровоносного русла шишкоподібної залози щурів за умов гострого іммобілізаційного стресу та цілодобового освітлення. Світ медицини та біології. 2013;3(39):32-5.
24. Сметанюк ОВ, Булик РЄ, Власова КВ, Волошин ВЛ. Морфо-функціональна активність нейронів надзорних ядер гіпоталамуса щурів під дією стресу. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2019;18(3):12-6. doi: 10.24061/1727-0847.18.3.2019.23
25. Сметанюк ОВ, Булик РЄ, Булик ТС, Кривчанська МІ. Вплив світлової депривації на морфо-функціональний стан нейронів надзорних ядер гіпоталамуса щурів. Клінічна та експериментальна патологія. 2020;19(4):61-7. doi: 10.24061/17274338.XIX.4.74.2020.9

26. Сметанюк ОВ. Характер змін активності великоклітинних ядер гіпоталамуса щурів за модифікації фотоперіоду. Клінічна та експериментальна патологія. 2021;20(4):87-92. doi: 10.24061/1727 4338.XX.4.78.2021.0
27. Тимофій ОВ. Патогенез порушень гіпоталамоепіфізарних взаємовідносин, індукованих змінами фотоперіоду [дисертація]. Чернівці; 2016. 198 с.
28. Френкель ЮД. NO-залежні механізми розладів окиснювального метаболізму головного мозку щурів при порушенні утворення мелатоніну [дисертація]. Миколаїв; 2015. 148 с.
29. Adamantidis AR, de Lecea L. Sleep and the hypothalamus. *Science*. 2023;382(6669):405-12. doi: 10.1126/science.adh8285
30. Ahmad SB, Ali A, Bilal M, Rashid SM, Wani AB, Bhat RR, et al. Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders. *Cell Mol Neurobiol*. 2023;43(6):2437-58. doi: 10.1007/s10571-023-01324-w
31. Atanasova D, Krushovlieva D, Rashev P, Mourdjeva M, Pupaki D, Tchekalarova J. Pinealectomy-Induced Neuroinflammation Varies with Age in Rats. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2025[cited 2025 Oct 20];26(16):8093. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/16/8093> doi: 10.3390/ijms26168093
32. Batın S, Ekinci Y, Gürbüz K, Payas A, Kurtoğlu E, Uçar İ, et al. The role of pineal gland volume in the development of scoliosis. *Eur Spine J*. 2023;32(1):181-9. doi: 10.1007/s00586-022-07452-z
33. Berger CA, Tarrant AM. Sensory conflict disrupts circadian rhythms in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Elife* [Internet]. 2023[cited 2025 Oct 13];12:e81084. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10188108/pdf/elife-81084.pdf> doi: 10.7554/eLife.81084
34. Berkhout JB, Poormoghadam D, Yi C, Kalsbeek A, Meijer OC, Mahfouz A. An integrated single-cell RNA-seq atlas of the mouse hypothalamic paraventricular nucleus links transcriptomic and functional types. *J Neuroendocrinol* [Internet].

- 2024[cited 2025 Oct 18];36(2):e13367. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jne.13367> doi: 10.1111/jne.13367
35. Britannica, editors. Melatonin. Encyclopedia Britannica [Internet]. 2025[cited 2025 Oct 13]. Available from: <https://www.britannica.com/science/melatonin>
36. Cai G, Lu Y, Chen J, Yang D, Yan R, Ren M, et al. Brain-wide mapping of c-Fos expression with fluorescence micro-optical sectioning tomography in a chronic sleep deprivation mouse model. *Neurobiol Stress Elife* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 14];20:100478. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9389418/pdf/main.pdf> doi: 10.1016/j.ynstr.2022.100478
37. Campbell I, Sharifpour R, Vandewalle G. Light as a Modulator of Non-Image-Forming Brain Functions-Positive and Negative Impacts of Increasing Light Availability. *Clocks Sleep*. 2023;5(1):116-40. doi: 10.3390/CLOCKSSLEEP5010012
38. Chen Y, Yu T, Deuster P. Astaxanthin Protects Against Heat-induced Mitochondrial Alterations in Mouse Hypothalamus. *Neuroscience*. 2021;476:12-20. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.09.010
39. Cipolla-Neto J, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr Rev*. 2018;39(6):990-1028. doi: 10.1210/er.2018-00084
40. Comai S, Gobbi G. Melatonin, Melatonin Receptors and Sleep: Moving Beyond Traditional Views. *J Pineal Res* [Internet]. 2024[cited 2025 Oct 10];76(7):e13011. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpi.13011> doi: 10.1111/jpi.13011
41. Cvikova D, Sutovska H, Babarikova K, Molcan L. Hypotensive effects of melatonin in rats: Focus on the model, measurement, application, and main mechanisms. *Hypertens Res*. 2022;45(12):1929-44. doi: 10.1038/s41440-022-01031-x
42. Daëron M. The immune system as a system of relations. *Front Immunol* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 10];13:984678. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9513551/pdf/fimmu-13-984678.pdf> doi: 10.3389/fimmu.2022.984678

43. Dalhäuser AK, Rössler OG, Thiel G. Regulation of c-Fos gene transcription by stimulus-responsive protein kinases. *Gene* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 14];821:146284. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111922001032?via%3DiHub> doi: 10.1016/j.gene.2022.146284
44. Dasdelen MF, Er S, Kaplan B, Celik S, Beker MC, Orhan C, et al. A Novel Theanine Complex, Mg-L-Theanine Improves Sleep Quality *via* Regulating Brain Electrochemical Activity. *Front Nutr* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 19];9:874254. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9017334/pdf/fnut-09-874254.pdf> doi: 10.3389/fnut.2022.874254
45. Davoudian PA, Shao LX, Kwan AC. Shared and Distinct Brain Regions Targeted for Immediate Early Gene Expression by Ketamine and Psilocybin. *ACS Chem Neurosci*. 2023;14(3):468-80. doi: 10.1021/acchemneuro.2c00637
46. de Souza CAP, Nishino FA, do Amaral FG, Cipolla-Neto J. Pineal Microdialysis. *Methods Mol Biol*. 2022;2550:63-74. doi: 10.1007/978-1-0716-2593-4_9
47. Duffield GE, Han S, Hou TY, de la Iglesia HO, McDonald KA, Mecklenburg KL, et al. Inhibitor of DNA binding 2 (Id2) Regulates Photic Entrainment Responses in Mice: Differential Responses of the Id2^{-/-} Mouse Circadian System Are Dependent on Circadian Phase and on Duration and Intensity of Light. *J Biol Rhythms*. 2020;35(6):555-75. doi: 10.1177/0748730420957504
48. Fagiani F, Di Marino D, Romagnoli A, Travelli C, Voltan D, Di Cesare Mannelli L, et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 18];7(1):41. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8825842/pdf/41392_2022_Article_899.pdf doi: 10.1038/s41392-022-00899-y
49. Fatima N, Rana S. Metabolic implications of circadian disruption. *Pflugers Arch*. 2020;472(5):513-26. doi: 10.1007/s00424-020-02381-6
50. Gallo CC, Nishino FA, do Amaral FG, Cipolla-Neto J. Pinealectomy in Rats. *Methods Mol Biol*. 2022;2550:45-51. doi: 10.1007/978-1-0716-2593-4_7

51. García-García VA, Alameda JP, Page A, Casanova ML. Role of NF- κ B in Ageing and Age-Related Diseases: Lessons from Genetically Modified Mouse Models. *Cells* [Internet]. 2021[cited 2025 Oct 20];10(8):1906. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8394846/pdf/cells-10-01906.pdf> doi: 10.3390/cells10081906
52. Gerbier R, Jockers R. GTP γ S Binding Assay for Melatonin Receptors in Mouse Brain Tissue. *Methods Mol Biol*. 2022;2550:163-9. doi: 10.1007/978-1-0716-2593-4_20
53. Gregory K, Warner T, Cardona JJ, Chaiyamoong A, Iwanaga J, Dumont AS, et al. Innervation of pineal gland by the nervus conarii: a review of this almost forgotten structure. *Anat Cell Biol*. 2023;56(3):304-7. doi: 10.5115/acb.23.037
54. Gutyj BV, Voloshyn RV, Stybel VV, Verveha BM, Sachuk RM, Starostenko IS, et al. The state of the immune system of rats under conditions of oxidative stress and the influence of the feed additive “Sylymevit”. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*. Серія: Економічні науки. 2023;25(110):131-6. doi: 10.32718/nvlvet11022
55. Hauns B. The Importance of the Pineal Gland. *Dtsch Arztebl Int* [Internet]. 2024[cited 2025 Oct 13];121(16):549. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11542581/pdf/Dtsch_Arztebl_Int-121_549b.pdf doi: 10.3238/arztebl.m2024.0028
56. Helfrich-Förster C, Rieger D. A clock for all seasons. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*. 2024;210(4):473-80. doi: 10.1007/s00359-024-01711-8
57. Hendry E, McCallister B, Elman DJ, Freeman R, Borsook D, Elman I. Validity of mental and physical stress models. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2024[cited 2025 Oct 10];158:105566. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11082879/pdf/nihms-1966690.pdf> doi: 10.1016/j.neubiorev.2024.105566

58. Hryntsova N, Romaniuk A, Kiptenko L, Sulym L. Morphological changes of sexually mature rat's pineal gland and cerebellar cortex under long-term exposure to heavy metal salts. *Вісник морфології*. 2022;28(4):54-63. doi: 10.31393/morphology-journal-2022-28(4)-08
59. Hussein HMA. Deciphering the complex biological functions and regulatory mechanisms of melatonin. *Hormones (Athens)*. 2025;24(2):565-7. doi: 10.1007/s42000-024-00623-1
60. Ilahi S, Beriwal N, Ilahi TB. *Physiology, Pineal Gland* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023[cited 2025 Oct 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525955/>
61. Illnerová H. From the Pineal Gland to the Central Clock in the Brain: Beginning of Studies of the Mammalian Biological Rhythms in the Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences. *Physiol Res*. 2024;73(Suppl 1):S1-S21. doi: 10.33549/physiolres.935377
62. Jana T, Tzveta S, Zlatina N, Natasha I, Dimitrinka A, Milena A, et al. Effect of endurance training on diurnal rhythms of superoxide dismutase activity, glutathione and lipid peroxidation in plasma of pinealectomized rats. *Neurosci Lett* [Internet]. 2020[cited 2025 Oct 20];716:134637. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304394019307402?via%3Di> hub doi: 10.1016/j.neulet.2019.134637
63. Jenwitheesuk A, Boontem P, Wongchitrat P, Tocharus J, Mukda S, Govitrapong P. Melatonin regulates the aging mouse hippocampal homeostasis via the sirtuin1-FOXO1 pathway. *EXCLI J*. 2017;16:340-53. doi: 10.17179/excli2016-852
64. Jiang DL, Xu YL, Pan JQ, Fan D, Shen X, Li WY, et al. Effects of melatonin on testicular function in adult male mice under different photoperiods. *Anim Reprod* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 11];19(3):e20220038. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9524057/pdf/1984-3143-ar-19-3-e20220038.pdf> doi: 10.1590/1984-3143-AR2022-0038

65. Junemann O, Bukreeva I, Otylga DA, Cedola A, Fratini M, Saveliev SV. Human Pineal Gland Involutionary Process: New Findings. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2023;78(9):1558-60. doi: 10.1093/gerona/glad091
66. Kim YJ, Park BS, Song N, Tu TH, Lee S, Kim JK, et al. Metabolic profiling in the hypothalamus of aged mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;599:134-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.02.042
67. Kuban W, Daniel WA. Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metab Rev*. 2021;53(1):1-29. doi: 10.1080/03602532.2020.1858856
68. Kubiak CA, Grochmal J, Kung TA, Cederna PS, Midha R, Kemp SWP. Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve*. 2020;61(4):449-59. doi: 10.1002/mus.26760
69. Kulsoom K, Ali W, Saba Z, Hussain S, Zahra S, Irshad M, et al. Revealing Melatonin's Mysteries: Receptors, Signaling Pathways, and Therapeutics Applications. *Horm Metab Res*. 2024;56(6):405-18. doi: 10.1055/a-2226-3971
70. Lankinen P, Kastally C, Hoikkala A. Nanda-Hamner Curves Show Huge Latitudinal Variation but No Circadian Components in *Drosophila Montana* Photoperiodism. *J Biol Rhythms*. 2021;36(3):226-38. doi: 10.1177/0748730421997265
71. Lara Aparicio SY, Laureani Fierro ÁJ, Aranda Abreu GE, Toledo Cárdenas R, García Hernández LI, Coria Ávila GA, et al. Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci*. 2022;3(4):687-702. doi: 10.3390/neurosci3040050
72. Lateef OM, Akintubosun MO. Sleep and reproductive health. *J Circadian Rhythms* [Internet]. 2020[cited 2025 Oct 10];18(1):1. Available from: <https://jcircadianrhythms.com/articles/10.5334/jcr.190> doi: 10.5334/jcr.190
73. Lee Y, Field JM, Sehgal A. Circadian Rhythms, Disease and Chronotherapy. *J Biol Rhythms*. 2021;36(6):503-31. doi: 10.1177/07487304211044301
74. Li S, Kim HE. Implications of Sphingolipids on Aging and Age-Related Diseases. *Front Aging* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 14];2:797320. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9261390/pdf/fragi-02-797320.pdf> doi: 10.3389/fragi.2021.797320

75. Lu J, Chatterjee E, Xiao J. Immune-Mediated Denervation of the Pineal Gland: a Potential Mechanism for Sleep Disturbance in Cardiac Disease. *J Cardiovasc Transl Res.* 2024;17(2):476-7. doi: 10.1007/s12265-023-10446-x
76. Markus RP, Sousa KS, Ulrich H, Ferreira ZS. Partners in health and disease: pineal gland and purinergic signalling. *Purinergic Signal.* 2025;21(1):99-112. doi: 10.1007/s11302-024-10037-8
77. Müller L, Di Benedetto S, Pawelec G. The Immune System and Its Dysregulation with Aging. *Subcell Biochem.* 2019;91:21-43. doi: 10.1007/978-981-13-3681-2_2
78. Munk R, Anerillas C, Rossi M, Tsitsipatis D, Martindale JL, Herman AB, et al. Acid ceramidase promotes senescent cell survival. *Aging (Albany NY).* 2021;13(12):15750-69. doi: 10.18632/aging.203170
79. Rajkhowa B, Mehan S, Sethi P, Prajapati A. Activation of SIRT-1 Signalling in the Prevention of Bipolar Disorder and Related Neurocomplications: Target Activators and Influences on Neurological Dysfunctions. *Neurotox Res.* 2022;40(2):670-86. doi: 10.1007/s12640-022-00480-z
80. Ramírez-Rodríguez G, Vega-Rivera NM, Benítez-King G, Castro-García M, Ortiz-López L. Melatonin supplementation delays the decline of adult hippocampal neurogenesis during normal aging of mice. *Neurosci Lett.* 2012;530(1):53-8. doi: 10.1016/j.neulet.2012.09.045
81. Romaniuk AM, Hryntsova NB, Karpenko LI, Kiptenko LI, Ustianskii OO, Dunaieva MM. The long-term effect of the complex of heavy metal salts on the morphofunctional changes in the structural components of the intermediate lobe of the mature rat's pituitary gland-the female. *Problems Endocrinol. Pathol.* 2019;2:98-103. doi: 10.21856/j-PEP.2019.2.14
82. Sameri S, Samadi P, Dehghan R, Salem E, Fayazi N, Amini R. Stem Cell Aging in Lifespan and Disease: A State-of-the-Art Review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020;15(4):362-78. doi: 10.2174/1574888X15666200213105155
83. Songkiatisak P, Rahman SMT, Aqdas M, Sung MH. NF- κ B, a culprit of both inflamm-ageing and declining immunity? *Immun Ageing Molecules [Internet].* 2022[cited 2025 Oct 14];19(1):20. Available from:

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9112493/pdf/12979_2022_Article_277.pdf
doi: 10.1186/s12979-022-00277-w

84. Tan DX, Xu B, Zhou X, Reiter RJ. Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland. *Molecules* [Internet]. 2018[cited 2025 Oct 14];23(2):301. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6017004/pdf/molecules-23-00301.pdf> doi: 10.3390/molecules23020301

85. Tchekalarova J, Georgieva I, Vukova T, Apostolova S, Tzoneva R. Pinealectomy-Induced Melatonin Deficiency Exerts Age-Specific Effects on Sphingolipid Turnover in Rats. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2025[cited 2025 Oct 14];26(4):1694. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/4/1694> doi: 10.3390/ijms26041694

86. Tchekalarova J, Nenčovska Z, Kortenska L, Uzunova V, Georgieva I, Tzoneva R. Impact of Melatonin Deficit on Emotional Status and Oxidative Stress-Induced Changes in Sphingomyelin and Cholesterol Level in Young Adult, Mature, and Aged Rats. *IJMS* [Internet]. 2022[cited 2025 Oct 14];23:2809. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/5/2809> doi: 10.3390/ijms23052809

87. Tchekalarova J, Krushovlieva D, Ivanova P, Nenčovska Z, Toteva G, Atanasova M. The Role of Melatonin Deficiency Induced by Pinealectomy on Motor Activity and Anxiety Responses in Young Adult, Middle-Aged and Old Rats. *Behav. Brain Funct* [Internet]. 2024[cited 2025 Oct 14];20:3. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12993-024-00229-y#citeas> doi: 10.1186/s12993-024-00229-y

88. Unal O, Akgun-Unal N, Baltaci AK. Unveiling mysteries of aging: the potential of melatonin in preventing neurodegenerative diseases in older adults. *Biogerontology* [Internet]. 2025[cited 2025 Oct 14];26:125. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10522-025-10254-7#citeas> doi: 10.1007/s10522-025-10254-7

89. Üstün A, Köykun Z, Gümüş H, Yılmaz B, Moğulkoç R, Baltacı AK. Pineal Gland and Melatonin are Associated with Serum Element Metabolism in Rats. *Noro Psikiyatı Ars.* 2025;62(3):270-3. doi: 10.29399/npa.28765
90. Wang L, Xu M, Wang Y, Wang F, Deng J, Wang X, et al. Melatonin Improves Synapse Development by PI3K/Akt Signaling in a Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Neural Regen. Res.* 2024;19:1618–24. doi: 10.4103/1673-5374.387973
91. Wang X, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Melatonin alleviates acute sleep deprivation-induced memory loss in mice by suppressing hippocampal ferroptosis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021[cited 2025 Oct 11];12:708645. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8322577/pdf/fphar-12-708645.pdf> doi: 10.3389/fphar.2021.708645
92. Wurtman, RJ. Age-Related Decreases in Melatonin Secretion-Clinical Consequences. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(6):2135-6. doi: 10.1210/jcem.85.6.6660
93. Yin C, Zhang M, Jin S, Zhou Y, Ding L, Lv Q, et al. Mechanism of *Salvia miltiorrhiza* Bunge extract to alleviate Chronic Sleep Deprivation-Induced cognitive dysfunction in rats. *Phytomedicine* [Internet]. 2024[cited 2025 Oct 14];130:155725. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711324003842?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.phymed.2024.155725
94. Yin C, Zhang M, Cheng L, Ding L, Lv Q, Huang Z, et al. Melatonin modulates TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway to ameliorate cognitive impairment in sleep-deprived rats. *Front Pharmacol* [Internet]. 2024[cited 2025 Oct 14];15:1430599. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11294086/pdf/fphar-15-1430599.pdf> doi: 10.3389/fphar.2024.1430599
95. Yin J, Li Y, Han H, Ma J, Liu G, Wu X, et al. Administration of Exogenous Melatonin Improves the Diurnal Rhythms of the Gut Microbiota in Mice Fed a High-Fat Diet. *mSystems.* 2020;5(3):e00002-20. doi: 10.1128/mSystems.00002-20
96. Żełabowski K, Pichowicz W, Skowron I, Szwach J, Biedka K, Wesołowski M, et al. The Efficacy of Melatonergic Receptor Agonists Used in Clinical Practice in

Insomnia Treatment: Melatonin, Tasimelteon, Ramelteon, Agomelatine, and Selected Herbs. *Molecules Pharmacol* [Internet]. 2025[cited 2025 Oct 14];30(18):3814. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/30/18/3814> doi: 10.3390/molecules30183814

97. Zhao B, Liu P, Wei M, Li Y, Liu J, Ma L, et al. Chronic Sleep Restriction Induces A β Accumulation by Disrupting the Balance of A β Production and Clearance in Rats. *Neurochem Res*. 2019;44(4):859-73. doi: 10.1007/s11064-019-02719-2

98. Zhu CZ, Li GZ, Lyu HF, Lu YY, Li Y, Zhang XN. Modulation of autophagy by melatonin and its receptors: implications in brain disorders. *Acta Pharmacol Sin*. 2025;46(3):525-38. doi: 10.1038/s41401-024-01398-2