

УДК 591.481.3.-019

Ю.В. Ломакіна, Р.Є. Булик

*Кафедра медичної біології та генетики (зав. – проф. Р.Є. Булик) ВДНЗ України
“Буковинський державний медичний університет”, м. Чернівці*

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ШИШКОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА СТАНДАРТНОГО РЕЖИМУ ОСВІТЛЕННЯ У СТАРИХ ЩУРІВ

Резюме. Проведені експерименти дозволяють встановити морфофункціональний стан епіфіза мозку старих щурів за умов стандартного освітлення, враховуючи концентрацію мелатоніну у плазмі крові з паралельним вивченням гістохімічної характеристики окиснювальної модифікації білків пінеальної залози. Основним напрямком цієї серії досліджень обрано вивчення вищезазначених параметрів на фоні одногодинного іммобілізаційного стресу.

Ключові слова: шишкоподібна залоза, старі щури, іммобілізаційний стрес, морфологія.

Виключно важлива роль шишкоподібної залози (ШЗ) як синхронізатора біологічних ритмів в організмі людини та тварин сприяла тому, що фізіологія, біохімія та морфологія, а також ультраструктура цього органа широко досліджується впродовж останніх десятиріч [1]. Відомо, що пінеальна залоза є частиною фотоперіодичної системи, яка здатна сприймати зміни рівня освітленості навколишнього середовища через сітківку, звідки по ретиногіпоталамічному шляху імпульси надходять до супрахіазматичного, і в меншому ступені – до супраоптичного ядер гіпоталамуса. Експериментально доведено, що з широкого комплексу періодичних коливань реальний вплив на власні ритми хроноперіодичної системи здійснюють зміни освітленості, температури, геомагнітного поля та вологості [2-4].

Мета дослідження: з'ясувати морфофункціональні особливості пінеальної залози у старих щурів за стандартного режиму освітлення та іммобілізаційного стресу (ІС).

Матеріал і методи. Експериментальні дослідження проведені на 32 старих (у віці 20-24 міс.) нелінійних самцях білих щурів масою 0,28-0,36 кг. Вивчали морфофункціональний стан ШЗ на тлі фізіологічної функції ШЗ під дією ІС. Тварини знаходилися на повноцінному раціоні віварію з вільним доступом до їжі та води за сталої температури (18-21⁰С) та вологості повітря по 8 тварин в окремих клітках.

Всі експерименти проведені у весняно-літній період для уникнення розбіжностей параметрів, чутливих до впливу сезонної ритмічності.

У зв'язку з тим, що адаптивні системи самок

більш динамічні, надійні і мають більшу резервну потужність, а отже, саме у самців легше виявити нейрохімічні, ендокринні та морфологічні кореляти зрушень, викликаних впливом стресу, нами були обрані старі щури самці для з'ясування поставленої мети.

По закінченні кожного дослідження під легкою ефірною анестезією здійснювали евтаназію щурів о 14.00 год шляхом декапітації. У момент декапітації тварин збирали кров в охолоджені центрифужні пробірки з гепарином, який використовувався як стабілізатор-антикоагулянт. Кров центрифугували впродовж 20 хв при 3000 об/хв, відбирали плазму для визначення відповідних показників.

Для моделювання фізіологічної функції пінеальної залози у дослідних тварин застосовували універсальний люмінесцентний підхід. Для контролю щурів утримували 7 діб за умов стандартного світлового режиму – LD (світло з 08.00 до 20.00 год, освітленість люмінесцентними лампами на рівні кліток 500 Лк).

Після декапітації о 14.00 год у дослідних тварин видаляли епіфіз за загальноприйнятою методикою. Для гістологічних досліджень шматочки тканини фіксували впродовж 48 годин у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї спиртів та парафінову заливку при температурі 56⁰С. На парафінових зрізах виконували методику забарвлення гематоксилином і еозином (Venerucci F., 2001).

Документацію морфологічних змін здійснювали за допомогою цифрового фотоапарата

Olympus C740UZ та мікроскопа ЛЮМАМ-8.

Кількісний аналіз цифрових зображень виконували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми ВидеоТест – Размер 5.0 (Санкт-Петербург, Россия, 2000г.). Різницю в середніх тенденціях між групами дослідження, враховуючи нормальний розподіл даних (за критерієм Shapiro-Wilk), оцінювали за допомогою параметричного критерію Стьюдента (непарний для незалежних вибірок, двосторонній). Враховуючи малий об'єм порівнюваних вибірок, для надійності висновків додатково застосували непараметричний критерій Mann-Whitney, який давав значення вірогідності близькі до критерію Стьюдента.

З метою оцінки внутрішньоклітинних змін у пінеалоцитах та тканині нирок вивчали ультраструктуру цих клітин. Для електронномікроскопічних досліджень одразу після знеживлення тварин пінеальну залозу та нирку обробляли стандартним шляхом: після трепанації черепа вилучали залозу і фіксували її в 2,5% розчині глютаральдегіду, який готували на фосфатному буфері Міллонга з активною реакцією середовища рН 7,2-7,4. Фіксований матеріал переносили у буферний розчин і промивали протягом 20-30 хв. Після цього впродовж 60 хв здійснювали постфіксацію матеріалу, використовуючи для цього 1% розчин чотириокису осмію на буфері Міллонга. Далі проводили дегідратацію матеріалу в спиртах і ацетоні та заливали в суміші епоксидних смол відповідно до загальноприйнятої методики.

На мікротомах УМІТ-7 та ЛКБ-III виготовляли ультратонкі зрізи, які зафарбовували 1% водним розчином уранілу ацетату. Ультраструктурні особливості будови клітин ШЗ вивчали в електронному мікроскопі ЕМВ-100 ЛМ.

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

Для визначення функціонального стану пінеальної залози під час стресу та оцінки напруженості тест-систем визначали в плазмі крові контрольних та дослідних тварин вміст мелатоніну. Одразу після декапітації кров тварин забирали у центрифужні пробірки, додаючи до неї гепарин в якості стабілізатора. Кров центрифугували, відбирали плазму і заморожували.

Дослідження кількісної оцінки концентрації в плазмі крові мелатоніну виконували на запрограмованих апаратах "Wellwash 4 Mk 2", iEms Incubator/ Shaker "MULTISCAN ASCENT" із використанням тест-системи Direct Saliva MELATONIN ELISA фірми BUGELMANN (Швейцарія). У тест-системі застосовано принцип конкурентного варіанту методу імуноферментного аналізу. Концентрацію мелатоніну позначали у пг/мл. Отримані цифрові дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою пакету програм "Biostat" та "Excel" з використанням для оцінки вірогідності різниць окремих груп даних критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

При гістологічному дослідженні тканини ШЗ щурів виявлялися пінеалоцити зі світлою та темною цитоплазмою (світлий тип та темний тип клітин), що є звичайним для цього органа, і розцінюється як морфологічне віддзеркалення різного функціонального стану вказаних паренхіматозних клітин. Стосовно окремих пінеалоцитів суб'єктивно візуально важко було визначитися в тому, до якого типу їх віднести. У зв'язку із вказаним для об'єктивізації способу прийняття рішення щодо віднесення пінеалоцитів до світлого чи темного типу клітин здійснили попередні експерименти щодо встановлення емпіричної межі, яку визначали мікроденситометричним методом на цифрових копіях зображень тканини шишкоподібної залози за допомогою комп'ютерної програми ВидеоТест-Размер 5.0 (Санкт-Петербург, Россия, 2000 г.) (рис. 1).

У результаті таких експериментів межею обрана величина оптичної густини забарвлення цитоплазми пінеалоцита у 0,065 відн.од. оптичної густини (величина оптичної густини забарвлення "0" відн. од. – абсолютна оптична прозорість, величина "1" відн.од. – оптична непрозорість). Пінеалоцити із середньою густиною забарвлення цитоплазми менше, ніж 0,065 відн. од. оптичної густини відносили до світлих пінеалоцитів, а із середньою густиною забарвлення цитоплазми у 0,065 відн. од. оптичної густини та вище – до темних пінеалоцитів відповідно.

Пінеальна залоза старого щура за стандартного

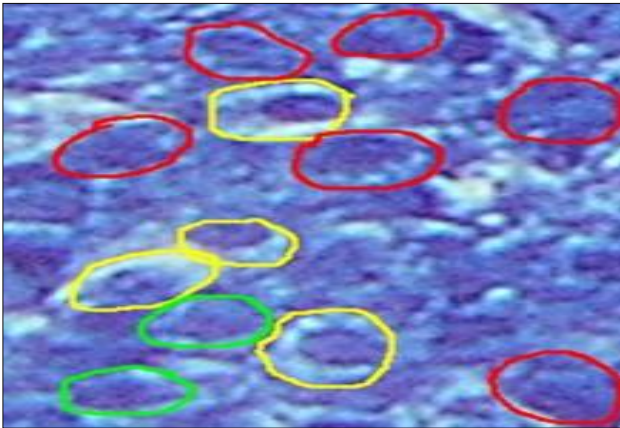


Рис. 1. Морфологічний стан епіфіза мозку старого щура за умов звичайного світлового проміжку. Забарвлення бромфеноловим синім за методом Мікель-Кальво на "кислі" та "основні" білки. Жовті – світлі, червоні – темні, зелені – проміжний стан пінеалоцита Об.40^х, ок.10^х

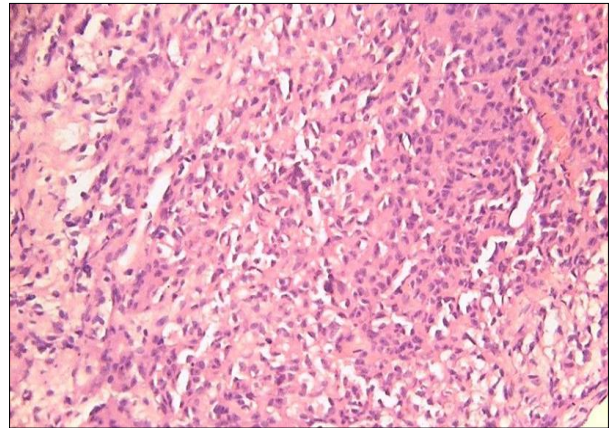


Рис. 2. Морфологічний стан епіфіза мозку старого щура за умов звичайного світлового проміжку. Гематоксилін і еозин. Об. 20^х, ок. 10^х

режиму освітлення має конусоподібну чи краплеподібну форму. Вивчення морфофункціонального стану показало, що паренхіма органа недостатньо збережена, з несуттєвими ознаками вікової інволюції у вигляді незначної кількості апоптотичних тілець, які утворені внаслідок вікового навантаження на фоні зниження біосинтезу мелатоніну та зменшення його концентрації в крові. Індоламінпродукувальні пінеалоцити інтенсивно темні, різної форми, ядрця не візуалізуються. Цитоплазма малооб'ємна, у вигляді вузького прозорого обідка оточує невелике неправильної форми ядро. Перикаріони таких клітин невеликі, базofilно забарвлені. При гістологічному дослідженні епіфіза мозку встановлено, що співвідношення між світлими та темними пінеалоцитами складало $1,77 \pm 0,028$ (світлих пінеалоцитів $64 \pm 0,9\%$, темних $36 \pm 0,9\%$). Загалом морфологічна картина відповідала літературним даним щодо такої в інтактних тварин (рис. 2).

Мікроспектрометрично при використанні гістохімічної методики з бромфеноловим синім за методом Мікель-Кальво встановлено, що коефіцієнт Р, який кількісно характеризує співвідношення між "кислими" та "основними" білками, становив у світлих пінеалоцитах $0,94 \pm 0,002$, а у темних – $1,19 \pm 0,012$ (рис. 3). Наведені дані свідчать про достатньо збережений баланс анти- та прооксидантної системи пінеалоцита старого щура.

Субмікроскопічні дослідження за умов 12С:12Т показали, що для більшості пінеалоцитів характерні округло-овальні ядра з великими осміофільними ядрцями. У каріоплазмі округло-овальних ядер містяться великі ядрця, біля яких

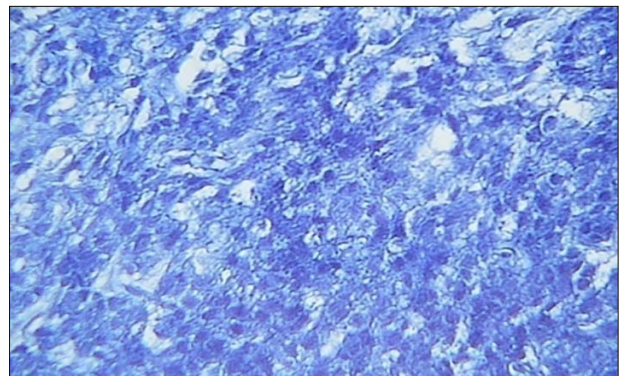


Рис. 3. Забарвлення бромфеноловим синім за методом Мікель-Кальво на "кислі" та "основні" білки. Об. 40^х, ок. 10^х

значна кількість рибосомальних гранул. Вони розсіяні по всьому ядру, невеликих грудочок гетерохроматину небагато. Каріолема рівна і має відносно рівномірний перинуклеарний простір, проте є локальні його потовщення, чіткі ядерні пори. У цитоплазмі наявні різної величини, округлі осміофільні гранули серотоніну (рис. 4). Цистерни гранулярного ендоплазматичного ретикулулу розширені, утворюють вакуолоподібні структури, великі мітохондрії мають осміофільний матрикс, наявні кристи.

У подальшому визначали рівень мелатоніну і процеси вільнорадикального окиснення ліпідів та біополімерів у крові. За умов звичайного світлового періоду рівень мелатоніну у плазмі крові, перебував у межах $21,0 \pm 1,8$ пг/мл, що свідчить про зниження біосинтезу мелатоніну у пінеальній залозі зі зменшенням поступлення його у кров старих щурів.

Дослідження структури пінеальної залози за умов іммобілізаційного стресу виявило суттєві зміни, які характеризувалися зменшенням активних пінеалоцитів та утворення на місці загиблих

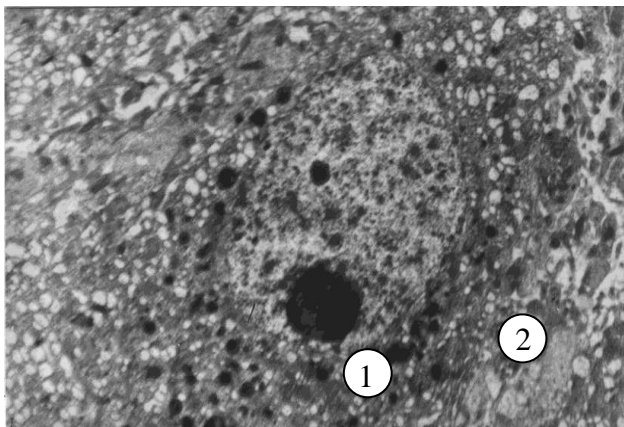


Рис. 4. Ультраструктура пінеалоцита при звичайному освітленні. Овальне ядро (1) з ядерцем. Гранули серотоніну (2). $\times 10\ 000$

клітин пустот. Разом з тим нами були виявлені пінеалоцити, в ядрах яких відмічено маргінацію хроматину, що вказує на початкову стадію форсованого апоптозу. При гістологічному дослідженні епіфіза мозку стресованих тварин виявлені зміни у співвідношенні між світлими та темними пінеалоцитами порівняно з інтактною групою, яке становило $1,12 \pm 0,024$ (світлих пінеалоцитів – $53 \pm 1,6\%$, що зменшилося на 11% щодо показників інтактних тварин, а темних навпаки зросло на 11% , що становило $47 \pm 1,5\%$). Розбіжність із інтактними тваринами становила $p < 0,001$ (рис. 5).

При комп'ютерній мікроспектрометрії з використанням гістохімічної методики з бромфеноловим синім за методом Мікель-Кальво коефіцієнт R, порівняно із значеннями контрольних тварин зріс і становив у світлих пінеалоцитах $1,12 \pm 0,014$, $p < 0,001$ (в інтактній групі – $0,94 \pm 0,008$), у темних пінеалоцитах – $1,24 \pm 0,016$, $p = 0,029$ (в інтактних – $1,19 \pm 0,012$), що вказує на порушення рівноваги між “кислими” та “основними” білками пінеалоцитів та зменшенням клітинного антиоксидантного захисту.

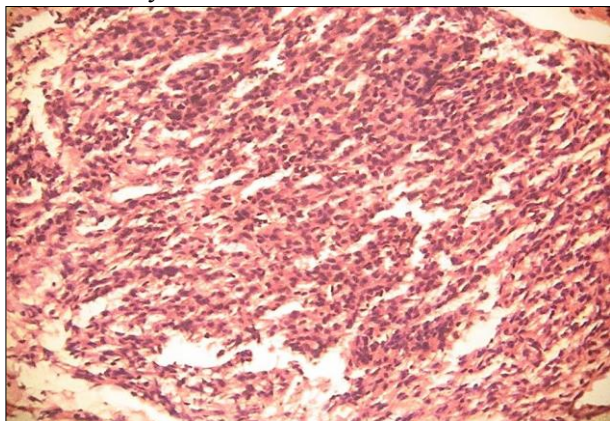


Рис. 5. Морфологічний стан епіфіза мозку старого щура при стресі. Гематоксилін і еозин. Об. $20\times$, ок. $10\times$

При ультрамікроскопічному дослідженні ШЗ за умов іммобілізаційного стресу показано, що в ядрах більшості пінеалоцитів зростають величини інвагінації, проте їх площа зменшена. У каріоплазмі наявні гранули гетерохроматину. Цитоплазма клітин компактна, щільно розташовані органели. Осміофільні гранули серотоніну поодинокі, невеликі. Канальці гранулярного ЕПР вузькі, як і цистерни комплексу Гольджі. Видовженої форми мітохондрії, мають електроннощільний матрикс, тому кристи погано виявляються (рис. 6). Такий субмікроскопічний стан свідчить про гіпофункцію пінеалоцитів внаслідок їхнього надлишкового навантаження стресовим чинником.

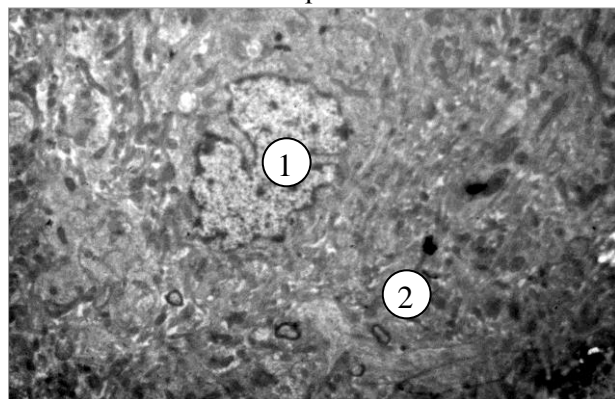


Рис. 6. Субмікроскопічний стан епіфіза мозку за умов іммобілізаційного стресу. Ядро з інвагінаціями (1), осміофільні гранули серотоніну (2). $\times 7\ 000$

Біохімічними дослідженнями встановлено, що моделювання ІС призвело до вірогідного зниження порівняно з інтактною групою щурів концентрації мелатоніну у крові майже на 17% до $17,5 \pm 1,0$ пг/мл ($p = 0,03$) внаслідок зниження його синтезу у пінеалоцитах ШЗ.

Висновок. За стандартного режиму освітлення у старих щурів спостерігається більша кількість світлих пінеалоцитів, ніж темних. Паренхіма органа недостатньо збережена, з незначними ознаками вікової інволюції у вигляді певної кількості апоптотичних тілець. У світлих пінеалоцитах переважають кислі білки, на відміну від темних пінеалоцитів, де основних білків більше, характеризуючи тим самим достатню активність пінеалоцитів старих щурів. Ультрамікроскопічні дослідження нирок та епіфіза мозку вказують на їхній фізіологічний стан. Такі мікроскопічні та ультраструктурні ознаки пінеалоцитів старих щурів свідчать про дещо знижену синтетичну активність клітин. Біохімічне вивчення процесів пероксидації характеризує активні процеси ВРОЛБ у старих щурів. При впливі зовнішнього подразнювача у вигляді іммобілізаційного стресу виявлено значні зміни у співвідношенні світлих і темних пінеало-

цитів, понизивши коефіцієнт співвідношення до $1,12 \pm 0,024$, що вказує на негативний ефект стресового чинника. Рівень ОМБ підвищився у всіх досліджуваних елементах, вказуючи на значний негативний ефект стресу щодо системи вільнора-

дикального окиснення ліпідів.

Перспективи подальших досліджень. Дослідити морфофункціональні особливостей пінеальної залози у старих щурів за зміненого режиму освітлення та іммобілізаційного стресу.

Список використаної літератури

1. Kus I. Light and electron microscopic examination of pineal gland in rats exposed to constant light and constant darkness / I. Kus, M. Sarsilmaz, O. Ozen // *Neuro Endocrinol. Lett.* – 2004. – Vol. 25, № 1-2. – P. 102-108.
2. Lewczuk B. Qualitative and quantitative studies on the ultrastructure of ovine pinealocytes during postnatal development / B. Lewczuk, B. Przybylska-Gornowicz, H. Brzostowski // *Neuro Endocrinol Lett.* – 2004. – Vol. 25, № 1-2. – P. 127-134.
3. Sahin E. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold) / E. Sahin, S. Gimel // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – Vol. 34, № 5-6. – P. 425-431.
4. Hardeland R. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug / R. Hardeland, S. Pandi.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ СТАНДАРТНЫХ РЕЖИМА ОСВЕЩЕНИЯ У СТАРЫХ КРЫС

Резюме. Проведенные эксперименты позволяют установить морфофункциональное состояние эпифиза мозга старых крыс при стандартном освещении, учитывая концентрацию мелатонина в плазме крови при параллельном изучении гистохимической характеристики окислительной модификации белков пинеальной железы. Основным направлением этой серии исследований было выбрано изучение вышеупомянутых параметров на фоне одночасового иммобилизационного стресса.

Ключевые слова: пинеальная железа, старые крысы, иммобилизационный стресс, морфология.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE PINEAL GLAND WITH STANDARD MODE OF LIGHT IN OLD RATS

Abstract. Conducted experiments enable to detect morphological-functional condition of the pineal gland in old rats under standard illumination considering concentration of melatonin in the blood plasma in parallel study of histochemical characteristics of oxidative modification of the pineal gland proteins. The main focus of this series of studies is investigation of mentioned above characteristics against the background of a one hour immobilization stress.

Key words: pineal gland, old rats, immobilization stress, morphology.

Higher State Educational Establishment of Ukraine
“Bukovinian State Medical University” (Chernivtsi)

Надійшла 17.04.2016 р.
Рецензент – проф. Федонюк Л.Я. (Тернопіль)