

"Reahim" (Ukraine), at 1.5 mg / kg for 1 day (n = 6), 2 days (n = 6), 6 days (n = 6), 12 days (n = 6), and 30 days (n = 6). An epactal admission of NO leads to morphological changes of the pancreas: vasodilation with stasis of blood cells after 1 and 2 days; focal necrosis, destruction of acinar tissue, ductal dilatation with moderation of pancreatic outflow after 6 days; adipose degeneration, segmental apoptosis after 12 days; compensated microcirculatory changes, accompanied by the formation of fibrous tissue in periductal and perivascular areas with engaging of the interlobular space after 30 days. Biochemical tests shows signs of pancreatic dysfunction (exocrine): increased activity of pancreatic enzymes- α -amylase and trypsin after 6 days, and after 30 days - a significant decrease of enzymes activity, accompanied by the increasing of the biochemical markers of fibrosis in blood and the development of incretory dysfunction; that is, changes, indicative for development of chronic experimental pancreatitis.

Key words: nitric oxide, sodium nitroprusside, pancreas, experimental pancreatitis, fibrosis.

Рецензент: д.мед.наук, професор Шевченко Б.Ф.

Статья поступила в редакцию 8.04.2015 г.

Бабий Олександр Михайлович - к.мед.н., ст. наук. сп. відділу хірургії органів травлення ДУ "Інститут гастроентерології НАМН України"; +38 067 902-00-42; Aleksandr_babiy@ukr.net

© Власова К.В., Давиденко І.С., Булик Р.Є.

УДК: 612.826.4.:591.147:591.044

Власова К.В.*, Давиденко І.С.***, Булик Р.Є.*

Буковинський державний медичний університет, *кафедра медичної біології та генетики, **кафедра патологічної анатомії (вул. Федьковича, 15, м.Чернівці, 58022, Україна)

ІМУНОГІСТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЩІЛЬНОСТІ МЕЛАТОНІНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ 1А ТИПУ В НЕЙРОНАХ СУПРАОПТИЧНОГО ЯДРА ГІПОТАЛАМУСА БІЛИХ ЩУРІВ ЗА ЗМІНЕНОГО ФОТОПЕРІОДУ

Резюме. У статті шляхом імуногістохімічного аналізу охарактеризовано щільність мелатонінових рецепторів 1а типу в нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса білих щурів і встановлено її чіткий циркадіанний ритм. У середньому найвища щільність рецепторів відмічається о 02.00 год доби, о 14.00 год вона суттєво знижується, а за умов пригнічення активності шишкоподібної залози порушується циркадіанний ритм функціонування мелатонінових рецепторів у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса.

Ключові слова: гіпоталамус, супраоптичні ядра, нейрони, мелатонінові рецептори, імуногістохімічний аналіз.

Вступ

Згідно із сучасними відомостями провідним центром керування циркадіанною системою ссавців вважають супрахіазматичні ядра гіпоталамуса (СХЯ) [Чибисов и др., 2013]. Водночас організація циркадіанних ритмів біологічних систем залежить від взаємодії центральних ланок керування коливальними процесами в організмі і мозкових структур посередників у вигляді т.з. функціональних хронобіологічних блоків [Хильдебрандт и др., 2006].

Один із подібних блоків формується внаслідок відносин між СОЯ та шишкоподібною залозою (епіфізом мозку) [Reiter et al., 2014]. Вона синтезує значну кількість біогенних амінів, а також основну масу головного епіфізарного гормону - мелатоніну (МТ) [Пішак та ін., 2012]. Показано, що секреція мелатоніну підпорядкована чітким добовим варіаціям з мінімальним значенням вдень і максимумом близько 02.00 год [Hasler et al., 2010; Trivedi, Kumar, 2014; Rivara et al., 2015].

Через мелатонінові рецептори (мембранні, цитозольні та ядерні) гормон контролює стан гіпоталамо-гіпофізарної системи й активність ендокринних залоз [Ishii et al., 2009]. Окрім того, за механізмом зворотного зв'язку він втручається в діяльність супраоптичного ядра гіпоталамуса (СОЯ) [Juszczak et al., 2014]. Авторадіографія і радіоімунний аналіз показали присутність мелатонінових рецепторів у різних структурах мозку людини,

кишечнику, яєчниках і кровоносних судинах [Chan, Wong, 2013; Sampaio et al., 2012]. Припускають, що мелатонінові рецептори СОЯ причетні до регуляції циркадіанних ритмів [Wu et al., 2006]. Однак, відомості щодо характеристики мелатонінових рецепторів у нейронах СОЯ гіпоталамуса мозку щурів практично відсутні.

Ця стаття є продовженням публікування отриманих результатів імуногістохімічних досліджень мелатонінових рецепторів нейронів різної локалізації головного мозку щурів у циркадіанній залежності за стандартних та гіперліюмінізованих умов [Пішак, Булик, 2010] та передуює аналогічним за методиками (імуногістохімія) запланованим дослідженням зі зміною світлового режиму.

Мета дослідження - на підставі імуногістохімічної методики, поєднаної з комп'ютерною мікроденситометрією, надати кількісну циркадіанну характеристику щільності мелатонінових рецепторів у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса щурів.

Матеріали та методи

Експерименти проведені на 40 статевозрілих безпородних білих самцях щурів масою 0,15-0,18 кг. Тварин утримували у твариннику при сталій температурі, вологості повітря й вільному доступі до води та їжі. Дослідних тварин поділено на 2 серії, у кожній з кот-

Таблиця 1. Циркадіанна динаміка оптичної щільності імуногістохімічного забарвлення на мелатонінові рецептори 1A у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса щура ($x \pm Sx$).

Години доби	Оптична густина специфічного забарвлення (в.о.опт.щільності) (n=10)	Величина вірогідності (p) розбіжностей між групами дослідження за критерієм Ньюмена-Кейлса
02.00	0,488±0,0024	p=0,002*
14.00	0,464±0,0023	

Примітка: n - кількість тварин, * - вірогідність різниці порівняно з попереднім часовим інтервалом.

рих було 2 групи (по 10 особин у кожній), які перебували за умови стандартного світлового режиму - 12.00С : 12.00Т (світло з 08.00 до 20.00 год, лампи денного світла ЛБ-40, освітленість приміщення на рівні тварин 200 Лк) та гіперліюмінізованого (цілодобове світло (24.00С : 00Т) лампами денного світла ЛБ-40, освітленість приміщення на рівні тварин 500 Лк) впродовж 7 діб. З метою виявлення циркадіанних відмінностей мелатонінових рецепторів та враховуючи циклічність продукції мелатоніну етаназію щурів виконували з 12-годинним інтервалом (02.00 год та 14.00 год) шляхом декапітації на 8 добу. Обрані терміни проведення експерименту зумовлені різною функціональною активністю шишкоподібної залози та продукцією провідного хронобіотика - МТ у вказані часові періоди.

Комісією з біоетичної експертизи Буковинського державного медичного університету встановлено, що всі етапи експерименту проведені з дотриманням основних вимог Гельсінської декларації та вимог Ради Європи щодо прав людини та біомедицини (1977), положень ВООЗ, Міжнародного кодексу медичної етики (1983) та законів України (протокол № 22 від 28 листопада 2007р.).

Для імуногістохімічного дослідження фрагменти великих півкуль мозку з ділянкою супраоптичного ядра гіпоталамуса фіксували у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну впродовж 22 год. Після цього виконували прискорене зневоднювання у спиртах висхідної концентрації, заливали у парафін при температурі 58°C з наступним отриманням гістологічних зрізів 5 мкм завтовшки.

З метою виконання імуногістохімічної методики використані поліклональні антитіла до мелатонінових рецепторів 1A виробника Abscam (Велика Британія) та стрептавідинбіотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника Chemicon International Inc. (США). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Ядра дофар-

бовували гематоксиліном Майєра.

Кількісні дослідження інтенсивності зафарбовування проводили за наступною схемою. Спочатку (за допомогою об'єктива мікроскопа x40) отримували цифрові копії оптичного зображення, які в подальшому аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВідеоТест - Размер 5.0" (ООО Видеотест, Росія), а саме - проводили комп'ютерну мікроденситометрію. Використовуючи мікрозондову методику у місцях позитивного забарвлення за показником "Оптична щільність" (у відносних одиницях з діапазоном 0-1, причому "0" відповідає абсолютній оптичній прозорості у мікрозонді, а "1" - абсолютній оптичній непрозорості) аналізували отримані результати вимірів. Інтенсивність специфічного зафарбовування (показник "Оптична щільність") ототожнювали зі ступенем щільності мелатонінових рецепторів.

Враховуючи необхідність виконання множинних статистичних порівнянь середніх величин у статистичних вибірках, для визначення відмінностей між сукупностями використаний критерій Ньюмена-Кейлса.

Результати. Обговорення

Чітке позитивне імуногістохімічне забарвлення визначалось у нейронах супраоптичного ядра гіпоталамуса у вигляді гранул різних розмірів та оптичної щільності, які концентрувалися переважно по периферії кожної клітини, що вочевидь відображає трансмембранне розташування мелатонінових рецепторів 1A. Імуногістохі-

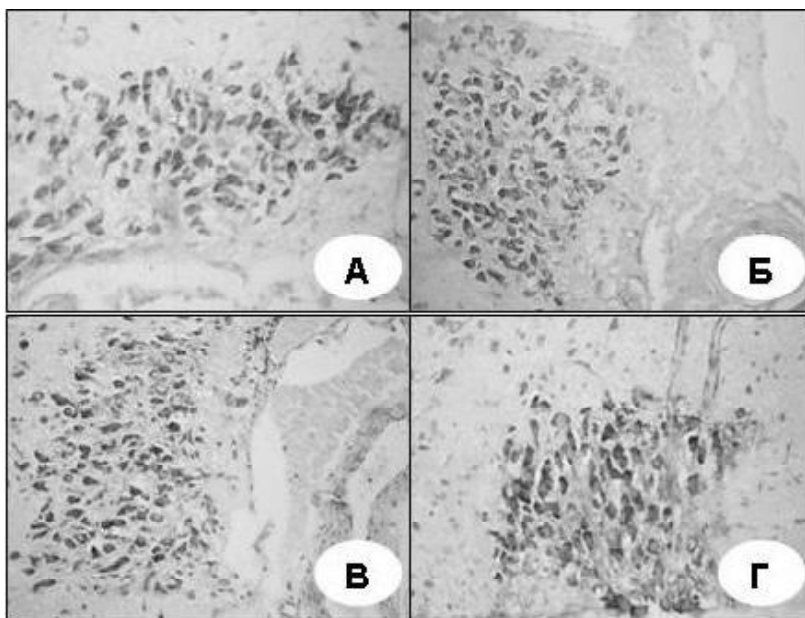


Рис. 1. Мелатонінові рецептори 1A у нейронах СОЯ щура: за стандартних умов освітлення об 02.00 год (А) та 14.00 год (Б); за умов гіпофункції шишкоподібної залози о 14.00 год (Г).

Примітка: Показано "робоче" збільшення - Об.40х, Ок.10х. Імуногістохімічна методика з поліклональними антитілами до мелатонінових рецепторів 1A та стрептавідинбіотиною системою візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин). Дофарбовування клітинних ядер гематоксиліном Майєра.

мічного забарвлення ядер не спостерігали - вони профарбовувалися виключно гематоксиліном і характеризувалися типовою для нейронів СОЯ гіпоталамуса морфологією.

Мікрофотографії виконані на менших, ніж "робоче" збільшення і носять виключно ілюстративний характер для демонстрації однотипності реакції мелатонінових рецепторів нейронів СОЯ гіпоталамуса різної локалізації.

Результати вимірів оптичної щільності специфічно забарвлення на мелатонінові рецептори 1A за умови стандартного світлового режиму подані у таблиці 1.

Як видно з даних таблиці 1, найвища щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СОЯ щурів відмічається о 02.00 год доби порівняно з 14.00 год (у полі зору площею 1600 мкм² - $p=0,002$ за критерієм Ньюмена-Кейлса).

За умов цілодобового освітлення кількість позитивно забарвлених на мелатонінові рецептори 1A нейронів СОЯ у полі зору площею 1600 мкм² становила: о 02.00 год - $0,216\pm 0,0017$, о 14.00 год - $0,214\pm 0,0021$ в. о. опт. щільності. Розбіжності за критерієм Ньюмена-Кейлса між вказаними групами дослідження невірні ($p>0,05$).

Однак, має місце суттєве зниження даного показника у досліджувані періоди ($p<0,001$) порівняно з твари-

нами, яких утримували за умов стандартного світлового режиму.

Вказані закономірності проілюстровані на мікрофотографіях імуногістохімічних препаратів ділянок мозку щурів з нейронами СОЯ гіпоталамуса (рис. 1).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Щільність мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СОЯ гіпоталамуса щурів у нормі характеризується чітким циркадіанним ритмом. У середньому найвища щільність рецепторів відмічається о 02.00 год доби, а 14.00 год вона суттєво знижується ($p=0,002$).

2. Імуногістохімічне дослідження дозволило виявити, що за умов пригнічення активності шишкоподібної залози порушується циркадіанний ритм щільності мелатонінових рецепторів у нейронах супраоптичних ядер гіпоталамуса, що характеризується невірною різницею показників у досліджувані періоди доби.

У подальшому планується провести імуногістохімічний аналіз при світловій депривації щурів для виявлення можливих порушень циркадіанного ритму щільності мелатонінових рецепторів 1A у нейронах СОЯ гіпоталамуса.

Список літератури

- Пішак В.П. Молекулярно-генетичні маркери циркадіанних ритмів за фізіологічних умов /В.П.Пішак, Р.Є.Булик //Буковинський мед. вісник.- 2010.- Т.14, №2.- С.12-19.
- Хильдебрандт Г Хронобиология и хрономедицина /Г.Хильдебрандт, М.Мозер, М.Лехофер.- М.: Арнебия, 2006.- 144с.
- Чибисов С.М. Биоритмы и космос: мониторинг космобиосферных связей /С.М.Чибисов, Г.С.Катинас, М.В.Разгульская.- М.: Монография, 2013.- 442с.
- Шишкоподібна залоза: патоморфологія, патологічна фізіологія, фармакологія /В.П.Пішак, Р.Є.Булик, І.І.Заморський [та ін.].- Чернівці, 2012.- 264с.
- Chan K.H. A molecular and chemical perspective in defining melatonin receptor subtype selectivity /K.H.Chan, Y.H.Wong //Int. J. Mol. Sci.- 2013.- Vol.14(9).- P.18385-18406.
- Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone /Y.H.Wu, J.N.Zhou, R.Balesar [et al.] //J. Comp. Neurol.- 2006.- Vol.499(6).- P.897-910.
- Gene structures, biochemical characterization and distribution of rat melatonin receptors /H.Ishii, N.Tanaka, M.Kobayashi //J. Physiol. Sci.- 2009.- Vol.59.- P.37-47.
- Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology /R.J.Reiter, D.X.Tan, A.Korkmaz [et al.] //Hum. Reprod. Update.- 2014.- Vol.20(2).- P.293-307.
- MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro /R.V.Sampaio, S.Conceicao, M.S.Miranda [et al.] //Reprod. Biol. Endocrinol.- 2012.- Vol.10.- P.103.
- Phase relationships between core body temperature, melatonin, and sleep are associated with depression severity: Further evidence for circadian misalignment in non-seasonal depression /B.P.Hasler, D.J.Buysse, D.J.Kupfer [et al.] //Psychiatry Research.- 2010.- Vol.178.- P.205-207.
- The influence of melatonin receptors antagonists, luzindole and 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4-P-PDOT), on melatonin-dependent vasopressin and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) release from the rat hypothalamo-hypophysial system. In vitro and in vivo studies /M.Juszczak, M.Roszczyk, E.Kowalska[et al.] //J. Physiol. Pharmacol.- 2014.- Vol.65(6).- P.777-784.
- Therapeutic uses of melatonin and melatonin derivatives: a patent review (2012 - 2014) /S.Rivara, D.Pala, A.Bedini [et al.] //Expert Opin. Ther. Pat.- 2015.- "in press"
- Trivedi A.K. Melatonin: an internal signal for daily and seasonal timing / A.K.Trivedi, V.Kumar //Indian J. Exp. Biol.- 2014.- Vol.52(5).- P.425-437.

Власова Е.В., Давыденко И.С., Булик Р.Е.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЛОТНОСТИ МЕЛАТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ 1А ТИПА В НЕЙРОНАХ СУПРАОПТИЧЕСКОГО ЯДРА ГИПОТАЛАМУСА БЕЛЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОГО ФОТОПЕРИОДА

Резюме. Путем иммуногистохимического анализа в статье охарактеризовано плотность мелатониновых рецепторов 1а типа в нейронах супраоптических ядер гипоталамуса белых крыс и установлено её чёткий циркадианный ритм. В среднем самая высшая плотность рецепторов отмечается в 02.00 суток, а в 14.00 час она существенно снижается, а в условиях подавления активности шишковидной железы нарушается циркадианный ритм функционирования мелатониновых рецепторов в нейронах супраоптических ядер гипоталамуса.

Ключевые слова: гипоталамус, супраоптические ядра, нейроны, мелатониновые рецепторы, иммуногистохимический анализ.

Vlasova K.V., Davydenko I.S., Bulyk R.Ye.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS MELATONIN RECEPTOR 1A TYPE DENSITY IN THE NEURONS OF THE HYPOTHALAMIC SUPRAOPTIC NUCLEUS IN WHITE RATS DURING ALTERED PHOTOPERIOD

Summary. *This article had described melatonin receptors 1a type density in the neurons of hypothalamus supraoptic nucleus in rats and had installed its clear circadian rhythmicity by means of immunohistochemical analysis. The highest receptors density is observed at 02.00 pm and at 14.00 am is significantly reduced. The melatonin receptors circadian rhythm functioning disturbed in neurons of the hypothalamus supraoptic nuclei under suppression conditions of pineal gland.*

Key words: *hypothalamus, supraoptic nucleus, neurons, melatonin receptors, immunohistochemical analysis.*

Рецензент: д.мед.н., професор Роговий Ю.Є.

Стаття надійшла до редакції 14.05.2015 р.

Власова Катерина Василівна - аспірант кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медуніверситету; +38 066 530-33-31; cathia143@gmail.com

Давиденко Ігор Святославович - д.мед.н, професор, зав. кафедри патологічної анатомії, Буковинського державного медуніверситету; +38 095 193-61-46

Булик Роман Євгенович - д.мед.н, професор, зав. кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медуніверситету; +38 095 041-00-43

© Пискун Р.П., Савицкая Е.А., Лилевская А.А.

УДК: (616.37+616.13-004.6):57.08

Пискун Р.П.¹, Савицкая Е.А.², Лилевская А.А.²

Вінницький національний медичний університет імені Н.І.Пирогова, ¹кафедра медичинської біології, ²кафедра внутрішньої медицини №1 (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна)

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АТЕРОСКЛЕРОЗА

Резюме. *В статье представлены результаты морфологического изучения структуры поджелудочной железы кроликов при экспериментальном атеросклерозе в условиях коррекции его препаратами разного механизма действия и разного происхождения. Экспериментальный атеросклероз вызывали классическим методом Аничкова на протяжении трех месяцев. В течении 4 месяца кроликам давали препараты: винборон (спазмолитик) - отечественный синтетический препарат бензофуранового ряда, полисорб (атоксил) - энтеросорбент кремнеземной природы и полиспонин - препарат растительного происхождения гипохолестеринемического действия. После фиксации в жидкости Буэна парафиновые срезы окрашивались методом Дыбана. Результаты изучения показали, что при экспериментальном атеросклерозе в большинстве панкреатических островков кроликов развиваются явления гипофункции инсулярного аппарата, что характеризуется уменьшением размера инсулоцитов и их ядер, а также количества альдегид-фуксифильной зернистости в цитоплазме. Животных, леченных винбороном, полисорбом и полиспонином явления гипофункции уменьшаются.*

Ключевые слова: *поджелудочная железа, атеросклероз, коррекция.*

Введение

Изменение микровязкости мембран сосудистой стенки, связанное с избытком холестерина, неизбежно приводит к нарушению кровотока. В результате органы и ткани страдают от недостаточного газообмена и обмена веществ. Именно такое состояние связывают с атеросклерозом и всеми его последствиями и прежде всего с сердечно-сосудистыми заболеваниями и диабетом, которые занимают первые места в ряду наиболее распространенных причин инвалидности и смертности взрослого населения. Учитывая это обстоятельство, состояние поджелудочной железы вызывает определенный интерес, особенно учитывая влияние различных лекарственных препаратов, применяемых при атеросклерозе и его осложнениях. Среди них выделяют энтеросорбенты - препараты, способные удалять различные метаболиты из желудочно-кишечного тракта, не вмешиваясь в метаболизм кишечной стенки и других заинтересованных органов. Этому условию удовлетворяют вещества, не всасывающиеся в желудочно-

кишечном тракте и не выделяющие в него биологически активные соединения. Применение энтеросорбентов - энтеросорбция - один из бурно развивающихся в последние годы разделов эфферентной медицины (медицины выведения) находит свое приложение и при лечении атеросклероза и его осложнений как в эксперименте, так и в клинике.

В литературе описывается успешное применение полисорба в лечении больных ишемической болезнью сердца, стенокардией, гиперлипидемией и гиперхолестеринемией. Эффективность и безопасность энтерального применения полисорба показана в ряде работ [Луцок и др., 1990; Пентюк и др., 1990]. Исследование антиатерогенного действия полисорба показало, что введение последнего кроликам с экспериментальной гиперхолестеринемией приводило к нормализации большинства биохимических показателей липидного обмена сыворотки крови, а также к уменьшению явлений мелкоочагового диффузного корона-