

В. Я. Березовський, Р. В. Янко, О. Г. Чака, М. І. Левашов
ВПЛИВ ЕКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНІНУ НА СТРУКТУРУ ТА СТАН СПОЛУЧНОТКАНИННИХ
ЕЛЕМЕНТІВ РЕСПІРАТОРНОГО ВІДДІЛУ ЛЕГЕНЬ

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА СТРУКТУРУ И
СОСТОЯНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
РЕСПИРАТОРНОГО ОТДЕЛА ЛЕГКИХ

В. А. Березовский, Р. В. Янко, Е. Г. Чака, М. И. Левашов

Резюме

Цель — исследовать влияние экзогенного мелатонина на морфофункциональные и биохимические показатели состояния респираторного отдела легких (РОЛ) молодых крыс.

Методы. Эксперимент проведен на 24 крысах-самцах линии Wistar (3-месячных) в весенний период. Мелатонин животным вводили перорально в 10 часов утра в дозе 5 мг/кг массы тела. Продолжительность эксперимента составляла 28 суток. Исследование изменений в структуре РОЛ проводили с помощью морфологических, морфометрических и биохимических методов.

Результаты. После 28-суточного введения мелатонина наблюдали тенденцию к снижению площади и среднего диаметра альвеол, глубины и ширины входа в альвеолу. В то же время отмечено уменьшение диаметра просвета респираторных бронхиол, альвеолярных ходов и мешочков. При этом количество функционирующих альвеол в поле зрения микроскопа увеличилось, возросла общая площадь альвеолярной поверхности. Выявлено уменьшение толщины межальвеолярной перегородки, содержания общего оксипролина и увеличение свободного оксипролина в ткани легких, что свидетельствует о снижении количества элементов соединительной ткани в РОЛ.

Выводы. 28-суточное введение экзогенного мелатонина (в дозе 5 мг/кг массы тела) молодым крысам приводит к увеличению общей площади альвеолярной поверхности, снижению количества элементов соединительной ткани в легких, что может способствовать повышению эффективности газообмена.

Ключевые слова: мелатонин, респираторный отдел легкого.

Укр. пульмонолог. журнал. 2015, № 3, С. 61–64.

Березовский Вадим Акимович
Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины
Заведующий отделом клинической патофизиологии
Доктор мед. наук, профессор
4, ул. Богомольца, 01024, Киев, Украина
Тел./факс: 38 (044) 256-24-95, vadber@biph.kiev.ua

THE EFFECT OF EXOGENOUS MELATONIN ON THE STRUCTURE AND
STATE OF CONNECTIVE TISSUE ELEMENTS OF THE RESPIRATORY
PORTION OF LUNG

V. A. Berezovskiy R. V. Yanko, E. G. Chaka, M. I. Levashov

Abstract

Aim. We studied the effect of exogenous melatonin on the morphological-functional and biochemical indices of the respiratory portion of the lung (RPL) in young rats.

Methods. The trial was conducted in the spring period (April) on 24 three-month Wistar male rats. Exogenous melatonin (Unipharm Inc., USA) was administered to experimental group of animals daily at 10 am orally at a dose 5mg/kg of body weight. Duration of the experiment was 28 days. The changes in the structure of RPL were assessed by means of histological, morphological, morphometric and biochemical methods.

Results. We found the tendency to reduction of mean diameter, cross-sectional area, depth and entrance size of alveoli after 28-day injection of melatonin. At the same time the total width of respiratory bronchioles, alveolar ducts and alveolar sacs in rats was decreased. Thus the amount of alveoli per vision field and the total alveolar surface area were increased. We have detected the reduction of alveolar wall thickness, concentration of general hydroxyproline and increase of free hydroxyproline in the lungs. This testified for the reduction of amount of connective tissue elements in RPL.

Conclusion. 28-day administration of exogenous melatonin (5 mg/kg body mass) to young rats increased the total alveolar surface area, reduced the amount of connective tissue elements in lungs, improving effectiveness of gas exchange.

Key words: exogenous melatonin, respiratory portion of the lung.

Ukr. Pulmonol. J. 2015; 3:61–64.

Vadim A. Berezovskiy
A. A. Bogomolets Institute of physiology NAS of Ukraine
Chief of clinical pathophysiology department
Doctor of medicine, professor
4, Bogomolets str., 01024, Kyiv, Ukraine
Tel./fax: 38 (044) 256-24-95, vadber@biph.kiev.ua

Смертність від патології органів дихання знаходиться на 3-му місці, після серцево-судинних та онкологічних захворювань. Хронічна легенева патологія часто супроводжується збільшенням кількості елементів сполучної тканини (пневмофіброз), що призводить до порушення вентиляції, погіршення умов газообміну та розвитку дихальної недостатності [6]. Тому, пошук нових шляхів профілактики і лікування порушень газообміну та методів попередження розвитку процесів пневмофіброзу є досить актуальним питанням.

Останнім часом увагу вчених привертає вплив гормону епіфіза мелатоніну на ті чи інші системи організму [2]. Мелатонін має універсальні адаптогенні властивості, які реалізуються на різних функціональних рівнях і стосуються більшості органів та систем. Він є регулятором ряду метаболічних, імунних і репродуктивних процесів,

приймає участь в механізмах терморегуляції та старінні [1]. В науковій літературі опубліковано ряд робіт, де показано лікувальний ефект мелатоніну при різних захворюваннях легень [11, 13]. В той же час робіт, присвячених впливу екзогенного мелатоніну на морфофункціональні показники респіраторного відділу легень та на стан сполучної тканини в ньому, обмаль.

Мета роботи — дослідити морфофункціональні зміни структури респіраторного відділу легень у молодих щурів після введення екзогенного мелатоніну.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження здійснено на 24 щурах-самцях (3 місячних) лінії Wistar у весняний період (квітень). Щури дослідної групи отримували препарат мелатонін (Unipharm Inc., США) один раз на добу (о 10 годині ранку) в дозі 5 мг/кг маси тіла. З метою уникнення стресу, при примусовому введенні тварині мелатоніну, препарат вводився в

їжу (сирна маса), з візуальним контролем повного з'їдання порцій. Щури контрольної групи отримували порцію сирної маси без мелатоніну. Тривалість експерименту становила 28 діб. Щури контрольної та дослідної групи перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування та природнім циклом світло/темрява. Роботу з щурами проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

По закінченню експерименту відбирали зразки тканини легень для гістоморфологічних та біохімічних досліджень. Гістологічні препарати виготовляли за стандартною методикою: фіксували в рідині Буена, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (від 70° до 96°) та діоксани. Отримані зразки заливали в парафін. Парафінові зрізи, завтовшки 5–6 мкм, виготовляли на санному мікромомі. Забарвлення отриманих зрізів здійснювали оглядовими фарбниками: гематоксиліном Бемера та еозином. Для візуалізації елементів сполучної тканини застосовували методи дво- та триколіорового забарвлення по Ван-Гізону, Массона та Малорі [4]. З використанням цифрової фотокамери мікропрепарати фотографували на мікроскопі «Nicon» (Японія). На цифрових зображеннях мікропрепаратів здійснювали морфометрію (при збільшенні в 200 разів) за допомогою комп'ютерної програми «ImageJ».

На гістологічних зрізах тканини легень вимірювали: середній діаметр просвіту альвеол, глибину та площу альвеол, визначали ширину входу в альвеолу, товщину міжальвеолярної перетинки, діаметр респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів та мішечків. Визначали співвідношення ширини входу в альвеолу до її глибини та співвідношення діаметру респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків до подвійної глибини альвеоли [3].

Для проведення біохімічних досліджень виділені легені відмивали в фізіологічному розчині від залишків крові, висушували до постійної маси. Для визначення вмісту загального оксипроліну зразок легень гідролізували у 6 N розчині HCl, а для визначення вільного оксипроліну проводили гідроліз у дистильованій воді. В отриманих екстрактах фотометрично визначали вміст оксипроліну методом окислення його в реакції з хлораміном T [5].

Статистичну обробку морфометричних даних здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Statistica 5.0. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Достовірною вважали різницю між порівнюваними серіями досліду при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

У щурів після 28-добового введення мелатоніну виявлена тенденція до зменшення маси легень на 12 % порівняно з контролем. Респіраторний відділ легень (РВЛ) представлений респіраторними бронхіолами (РБ), альвеолярними ходами (АХ) та альвеолярними мішечками (АМ). На гістологічних зрізах неможливо чітко бачити структурні відмінності між АХ і АМ. Також, не завжди

вдається відрізнити периферичні бронхіоли від АХ. Тому, їх прийнято розглядати, як одну групу [3]. На гістологічних зрізах легень обох груп щурів просвіту РБ, АХ та АМ були вільними. Десквамації альвеолярного епітелію не відмічено.

Після завершення курсу введення мелатоніну в РВЛ щурів виявлена тенденція до зменшення площі поперечного перерізу, середнього діаметру просвіту та глибини альвеол порівняно з контролем. Ширина входу в альвеолу в дослідній групі тварин вірогідно зменшилась на 17 % порівняно з контрольною групою. Водночас відмітили і зменшення ширини просвіту РБ, АХ та АМ на 14 % у тварин, які отримували мелатонін. Співвідношення ширини входу в альвеолу до її глибини та співвідношення діаметру просвіту РБ, АХ і АМ до подвійної глибини альвеоли залишалось на рівні контрольних значень. В легенях дослідної групи тварин відмічено зростання кількості альвеол в полі зору мікроскопа (пов'язане зі зменшенням розмірів останніх). Такі зміни можуть вказувати на збільшення загальної площі альвеолярної поверхні, що призводить до поліпшення ефективності газообміну (рис. 1, табл.).

Складовою частиною всіх органів, у тому числі й легень, є сполучна тканина (СТ). У легеневій стромі переважають елементи механічного функціонування — колагенові та еластинові волокна. При пошкодженні легень різними фізичними чи хімічними факторами відбувається розростання СТ в паренхімі легень. В цьому процесі важливого значення набувають фіброласти, що мають високу активність синтезу та гістіоцити, які виконують

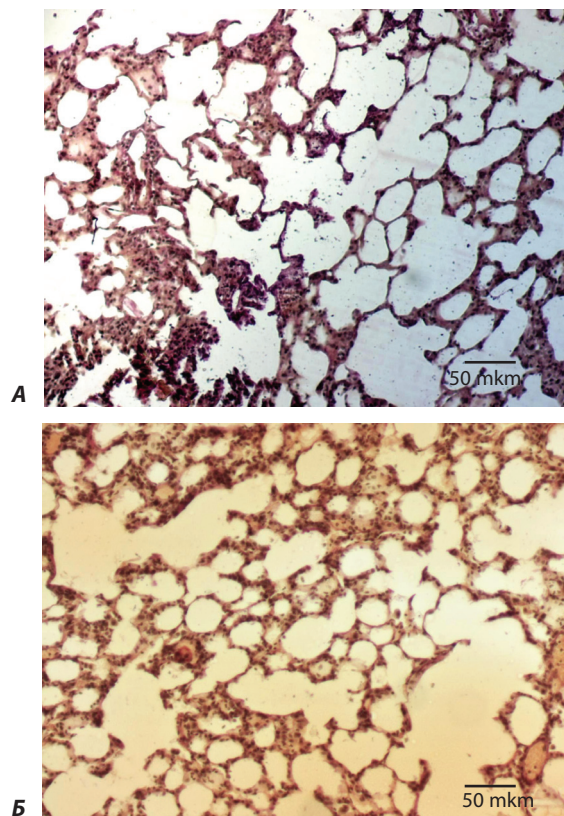


Рис. 1. Мікрофотографія легень інтактних тварин (А) та щурів, яким вводили мелатонін (Б). Забарвлення по Ван-Гізону. Збільшення 200.

Таблиця

Морфометричні показники стану респіраторного відділу легень щурів контрольної та дослідної групи (M ± m, n =12)

Показатель	Контроль	Мелатонін
Середній діаметр просвіту альвеоли, мкм	29,0 ± 1,47	27,0 ± 1,48
Глибина альвеоли, мкм	29,0 ± 1,94	25,0 ± 1,34
Ширина входу в альвеолу, мкм	18,3 ± 1,07	15,1 ± 1,14*
Площа поперечного перерізу альвеоли, мкм ²	1085 ± 106	1065 ± 118
Ширина просвіту РБ, АХ та АМ, мкм	86,4 ± 4,52	74,3 ± 5,26
Товщина міжальвеолярної перетинки, мкм	7,0 ± 0,34	5,4 ± 0,43*
Відношення ширини входу в альвеолу до її глибини	0,63 ± 0,03	0,60 ± 0,02
Відношення діаметру РБ, АХ та АМ до подвійної глибини альвеоли	1,49 ± 0,13	1,49 ± 0,08

*P<0,05 — достовірність порівняно з контролем

захисну роль. Фібробласти проліферують в місці пошкодження легень, виробляючи колаген та вуглеводо-білкові макромолекули [10].

При забарвленні гістологічних препаратів легень по Ван-Гізону, Масону та Малорі [4] виявлено зниження кількості елементів СТ в дослідній групі тварин. Найбільша кількість колагенових волокон розташовувалась навколо РБ, кровоносних судин, в меншій мірі в міжальвеолярних перетинках (рис. 1).

Товщина міжальвеолярної перетинки у контрольних тварин у середньому становить 7 мкм. Після введення мелатоніну товщина перетинки вірогідно зменшується на 23 % (до 5,4 мкм) порівняно з контролем. Це свідчить про зменшення кількості елементів СТ в РВЛ, що може сприяти покращенню альвеолярно-капілярного обміну газів.

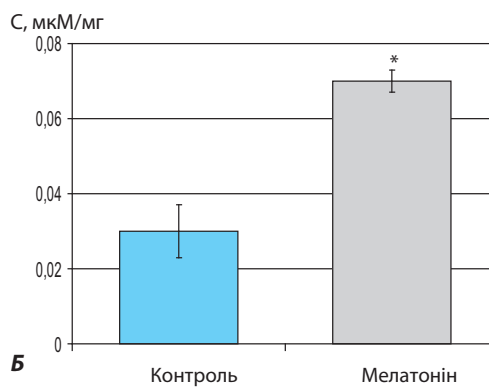
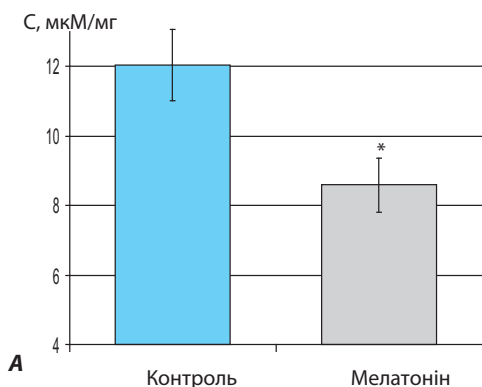


Рис. 2. Вміст загального (А) та вільного (Б) оксипроліну в тканині легень контрольних та дослідних щурів. *P<0,05 — достовірність порівняно з контролем.

Визначення концентрації оксипроліну (амінокислоти колагену) часто застосовують для аналізу стану СТ в різних органах. У щурів, які отримували мелатонін, вірогідно знижується вміст загального оксипроліну в легенях на 29 % порівняно з контролем. Вміст вільного оксипроліну при цьому, навпаки — зростає вдвічі (рис. 2). Зниження вмісту загального оксипроліну може вказувати на порушення динамічної рівноваги між деструкцією та біосинтезом колагену, в бік відносної переваги процесів його деградації. Відомо, що в процесі біосинтезу

колагену оксипролін утворюється внаслідок окислення пептидозв'язаних залишків проліну. Вільний оксипролін не входить до складу поліпептидного ланцюга колагену, тому збільшення його вмісту спостерігається при посиленні катаболізму колагенових фібрил. Зниження вмісту загального та збільшення вільного оксипроліну в стромі легень свідчить про активацію процесів катаболізму колагену, що призводить до зменшення кількості сполучної тканини [7]. Це може сприяти поліпшенню газо-транспортних функцій легень.

Іншими дослідниками також відмічено зменшення елементів СТ та зниження процесів фіброзу в легенях після введення екзогенного мелатоніну. Так, група вчених на чолі з Yildirim Z. [13] виявила, що введення мелатоніну в дозі 4 мг/кг маси тіла зменшило розростання СТ в легенях при штучно створеному фіброзі. Показано, що у мишей з хронічною астмою, які отримували мелатонін, знизилась площа колагенових фібрил [14].

В літературі наводяться дані про лікувальний ефект мелатоніну при різних захворювань легень. Так, Shin I. S. з спіавт. [11] показав, що після інтраперитонеальних ін'єкцій мелатоніну (в дозі 10 і 15 мг/кг) протягом 23 днів значно зменшилась кількість запальних клітин, імунoglobуліну Е, знизилась прояви запалення дихальних шляхів і секреція слизу, що значно покращило перебіг бронхіальної астми. Виявлено, що введення екзогенного мелатоніну має захисну дію при гіпероксичному пошкодженні легень [12]. Farías J. G. та спіавт. [9] дослідили, що мелатонін в дозі 10 мг/кг знижував перекисне окислення ліпідів в легенях при переривчастій гіпобаричній гіпоксії. А група вчених на чолі з Acuña-Castroviejo D. [8] виявила, що введення мелатоніну зменшило ступінь пошкодження мітохондрій в легенях, пов'язане зі старінням.

Висновки

Проведені нами дослідження показали, що 28-добове введення екзогенного мелатоніну (в дозі 5 мг/кг) збільшує загальну площу альвеолярної поверхні у молодих щурів лінії Wistar, знижує товщину міжальвеолярної перетинки, зменшує вміст загального та збільшує вміст вільного оксипроліну в легенях. Це свідчить про зменшення кількості елементів сполучної тканини в респіраторному відділі легень, що може сприяти поліпшенню газообмінних процесів у легенях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Анисимов, В. Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике [Текст] / В. Н. Анисимов. — СПб.: Система, 2007. — 40 с.
2. Березовский, В. А. Реактивность паренхимы печени крыс после введения экзогенного мелатонина [Текст] / В. А. Березовский, Р. В. Янко, И. Г. Литовка, О. И. Волович // Украинський морфологічний альманах. — 2012. — Т. 10. — № 4. — С. 178–181.
3. Вейбель, Э. Р. Морфометрия легких человека [Текст] / Э. Р. Вейбель. — М.: Медицина, 1970. — 175 с.
4. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники [Текст] / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. — СПб.: СпецЛит, 2010 — 95 с. — ISBN 978-5-299-00438-0.
5. Кузнецова, Т. П. Модификация определения оксипролина в сыворотке крови [Текст] / Т. П. Кузнецова, Л. Я. Прошина, М. Н. Приваленко // Лабораторное дело. — 1982. — № 8. — С. 8–10.
6. Есипова, И. К. Патологическая анатомия легких [Текст] / И. К. Есипова. — М.: Медицина, 1976. — 183 с.
7. Поливанов, Т. В. Морфофункциональные параметры коллагена в норме и патологии [Текст] / Т. В. Поливанов, В. Т. Манчук // Успехи современного естествознания. — 2007. — № 2. — С. 25–30.
8. Acuña-Castroviejo, D. Melatonin protects lung mitochondria from aging [Text] / D. Acuña-Castroviejo, M. Carretero, C. Doerrier, L. López, L. García-Corzo, J. Tresguerres, G. Escames // Age (Dordr). — 2012. — Vol. 34. — № 3. — P. 681–692.
9. Fariás, J. G. Melatonin protects the heart, lungs and kidneys from oxidative stress under intermittent hypobaric hypoxia in rats [Text] / J. G. Fariás, A. B. Zepeda, G. M. Calaf // Biol Res. — 2012. — Vol. 45. — № 1. — P. 81–85.
10. Castelino, F. V. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management [Text] / V. Flavia Castelino, V. John // Arthritis Research & Therapy. — 2010. — Vol. 12. — P. 210–213.
11. Shin, I. S. Melatonin reduces airway inflammation in ovalbumin-induced asthma [Text] / I. S. Shin, J. W. Park, N. R. Shin, C. M. Jeon, O. K. Kwon, J. S. Kim, J. C. Kim, S. R. Oh, K.S. Ahn // Immunobiology. — 2014. — № 10. — P. 138–147.
12. Suleymanoglu, S. Protective effects of melatonin therapy in model for neonatal hyperoxic lung injury [Text] / S. Suleymanoglu, F. Cekmez, M. Cetinkaya, C. Tayman, F. E. Canpolat, I. M. Kafa, A. Tanju, I. K. Arziman, M. Fidanci, T. Tunc, S. U. Sarici // Altern Ther Health Med. — 2014. — V. 20. — № 5. — P. 24–29.
13. Yildirim, Z. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats [Text] / Z. Yildirim, M. Kotuk, H. Erdogan, M. Iraz, M. Yagmurca, I. Kuku, E. Fadillioglu // J Pineal Res. — 2006. — Vol. 40 (1). — P. 27–33.
14. Zhou, L. The effect of melatonin on the regulation of collagen accumulation and matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and protein in a murine model of chronic asthma [Text] / L. Zhou, Z. X. Qian, F. Li, R.Y. Liu // Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi. — 2007. — Vol.30 (7). — P. 527–532.

REFERENCES

1. Anasimov VN. Melatonin: rol v organizme, primeneniye v klinike (Melatonin: role in the organism and clinical use). SPb: Sistema. 2007;40 p.
2. Berezovskyy VA, Yanko RV, Litovka IG, Volovich OI. Reaktivnost parenkhimy pecheni kryss posle vvedeniya ekzogenogo melatonina (Reactivity of rat liver parenchyma after injection of exogenous melatonin). Ukrayinskyy morfologichnyy almanakh. 2012;No 10(4):178–181.
3. Veybel ER. Morfometriya legkikh cheloveka (Morphometry of the human lungs). Moscow: Meditsina. 1970;175 p.
4. Korzhevskiy DE, Gilyarov AV. Osnovy gistologicheskoy tekhniki (Basics of histologic technique). SPb: SpetsLit. 2010;95 p.
5. Kuznetsova TP, Proshina LYa, Privalenko MN. Modifikatsiya opredeleniya oksiprolina v syvorotke krovi (Modification of hydroxyproline determination in serum). Laboratornoye delo. 1982; No 8–10.
6. Yesipova IK. Patologicheskaya anatomiya legkikh (Pathological anatomy of the lungs). Moscow: Meditsina. 1976;183.
7. Polivanov TV, Manchuk VT. Morfofunktsionalnyye parametry kollagena v norme i patologii (Morphological and functional parameters of collagen in health and disease). Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2007;No 2:25–30.
8. Acuña-Castroviejo D, Carretero M, Doerrier C, et al. Melatonin protects lung mitochondria from aging. Age (Dordr). 2012;34(3):681–692.
9. Fariás JG, Zepeda AB, Calaf GM. Melatonin protects the heart, lungs and kidneys from oxidative stress under intermittent hypobaric hypoxia in rats. Biol Res. 2012;45(1):81–85.
10. Castelino FV, Varga J. Interstitial lung disease in connective tissue diseases: evolving concepts of pathogenesis and management. Arthritis Research & Therapy. 2010;12:210–213.
11. Shin IS, Park JW, Shin NR, et al. Melatonin reduces airway inflammation in ovalbumin-induced asthma. Immunobiology. 2014;10:138–147.
12. Suleymanoglu S, Cekmez F, Cetinkaya M, et al. Protective effects of melatonin therapy in model for neonatal hyperoxic lung injury. Altern Ther Health Med. 2014; 20(5):24–29.
13. Yildirim Z, Kotuk M, Erdogan H, Iraz M, Yagmurca M, Kuku I, Fadillioglu E. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. J Pineal Res. 2006;40(1):27–33.
14. Zhou L, Qian ZX, Li F, Liu RY. The effect of melatonin on the regulation of collagen accumulation and matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and protein in a murine model of chronic asthma. Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi. — 2007;30(7):527–532.