

Р. В. Янко, В. Я. Березовський, О. Г. Чака, Л. М. Плотнікова, М. І. Левашов, І. Г. Літовка СТАН РЕСПІРАТОРНОГО ВІДДІЛУ ЛЕГЕНЬ ГІПЕРТЕНЗИВНИХ ТА НОРМОТЕНЗИВНИХ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВПЛИВУ МЕЛАТОНІНУ

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

СОСТОЯНИЕ РЕСПІРАТОРНОГО ОТДЕЛА ЛЕГКИХ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ И НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА

Р. В. Янко, В. А. Березовский, Е. Г. Чака, Л. Н. Плотникова,
М. И. Левашов, И. Г. Литовка

Резюме

Цель: исследовать и сравнить влияние экзогенного мелатонина на морфологические и биохимические показатели функционального состояния и структуру респираторного отдела легких (РОЛ) у крыс двух разных линий.

Методы: исследования проведены на 48 молодых крысах-самцах линии Wistar и SHR (спонтанно-гипертензивные животные). Животным ежедневно перорально вводили мелатонин в 10 часов утра в дозе 5 мг/кг массы тела. Продолжительность эксперимента составляла 28 суток. Исследование изменений в структуре РОЛ осуществляли с помощью морфологических, морфометрических и биохимических методов.

Результаты: после 28-суточного введения мелатонина у крыс линии Wistar наблюдали достоверное увеличение площади поперечного сечения, среднего диаметра, глубины и ширины входа в альвеолы по сравнению с контролем. У спонтанно-гипертензивных подопытных крыс обнаружили достоверное снижение толщины межальвеолярной перегородки, тенденцию к снижению оксипролина в легких, что может свидетельствовать об уменьшении количества элементов соединительной ткани и улучшении альвеолярно-капиллярного обмена газов.

Выводы: 28-суточное введение экзогенного мелатонина (в дозе 5 мг/кг) крысам как линии Wistar (в большей степени), так и линии SHR приводит к возрастанию общей площади альвеолярной поверхности. У животных линии SHR обнаружено снижение количества элементов соединительной ткани в РОЛ, что может увеличивать эффективность газообмена.

Ключевые слова: мелатонин, респираторный отдел легкого, соединительная ткань легкого.

Укр. пульмонолог. журнал. 2017, № 4, С. 68–71.

Янко Роман Васильович

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАНУ

Відділ клінічної фізіології сполучної тканини

Старший науковий співробітник, канд. біол. наук

м. Київ, вул. Богомольця, 4, 01024.

Тел.: 38 (044) 256-24-77, e-mail: biolag@ukr.net

STATE OF THE RESPIRATORY PART OF THE LUNG OF HYPERTENSIVE AND NORMOTENSIVE RATS AFTER MELATONIN EXPOSURE

R. V. Yanko, V. A. Berezovskiy, O. G. Chaka, L. M. Plotnikova,
M. I. Levashov, I. G. Litovka

Abstract

Aim: to investigate and compare the effects of exogenous melatonin on morphological and biochemical indicators of the structure and function of the respiratory part of the lung (RPL) in two different lines of rats.

Methods. The study was conducted on 48 young Wistar and spontaneously hypertensive (SHR) male rats. Melatonin was administered daily at 10 am orally at a dose 5 mg/kg of body mass. Duration of the experiment was 28 days. Evaluation of the structural changes in RPL was performed using morphological, morphometric and biochemical methods.

Results. After 28-day treatment with melatonin in Wistar line rats we observed a significant increase in cross-sectional area, mean diameter, depth and width of the entrance to the alveoli compared to the control group. In SHR we found the significant decrease of alveolar wall thickness, the tendency to reduction of hydroxyproline concentration in lungs, which may indicate a decrease in the number of connective tissue elements and improvement of alveolar-capillary gas exchange.

Conclusion. 28-day administration of exogenous melatonin to Wistar and SHR rats causes an increase of total alveolar surface area. We observed the decrease in the number of connective tissue elements in RPL in SHR line rats, which can increase the effectiveness of gas exchange.

Key words: melatonin, respiratory part of the lung, lung connective tissue.

Ukr. Pulmonol. J. 2017; 4: 68–71.

Roman V. Yanko

Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine

Senior research assistant, PhD

4, Bogomolets St., Kiev 01024, Ukraine.

Tel.: 38 (044) 256-24-77, e-mail: biolag@ukr.net

В структурі загальної смертності у світі хронічні хвороби легень займають третє місце. За даними ВООЗ понад 210 мільйонів людей мають ті чи інші форми патології легень. Найбільш часто страждають респіраторні відділи легень (РВЛ). Одним із можливих методів попередження та профілактики захворювань легень може бути застосування гормону мелатоніну. Відомо, що мелатонін є регулятором метаболічних, імунних і регенераторних процесів, приймає участь у механізмах терморегуляції та старінні [1].

В науковій літературі опубліковано факти щодо лікувального ефекту мелатоніну при деяких захворюваннях легень [10, 16]. Показано, що після інтраперитонеальних ін'єкцій мелатоніну (в дозі 10 і 15 мг/кг протягом 23 діб)

значно поліпшується стан хворого на бронхіальну астму [11]. Відмічено, що екзогенний мелатонін здійснює захисну дію при гіпероксичному пошкодженні легень [12]. Введення гормону в дозі 10 мг/кг знижує перекидне окислення ліпідів в легенях при переривчастій гіпобаричній гіпоксії [8]. Група науковців дослідила, що у процесі старіння мелатонін зменшує ступінь пошкоджень мітохондрій альвеолоцитів [7]. Проте роботи, присвячені впливу екзогенного мелатоніну на морфофункціональні показники РВЛ та на стан сполучної тканини в ньому, поодинокі.

Більшість досліджень, присвячених впливу мелатоніну на стан легень, проведено на щурах лінії Wistar [2, 8, 13, 14]. Тоді, як робіт, в яких би досліджувався вплив екзогенного мелатоніну на стан РВЛ у тварин, або людей з артеріальною гіпертензією нами не виявлено. Загальновідомо, що артеріальна гіпертензія — одне з

поширених захворювань, яким страждають 20–30 % дорослого населення. Широке поширення поєднаної патології органів дихання і кровообігу вимагає комплексного підходу не тільки до лікування таких хворих, але і вдосконалення існуючих методів ранньої діагностики та профілактики даних захворювань. Тісний функціональний взаємозв'язок серцево-судинної і дихальної систем в значній мірі визначає ефект взаємно обтяжливого впливу серцево-судинної патології на перебіг пульмонологічних захворювань, і навпаки. Механізми розвитку змін в легенях при артеріальній гіпертензії досліджені недостатньо. Встановлено, що на початкових стадіях гіпертонії в легенях хворих не відзначається виражених морфологічних змін, хоча часто спостерігаються ознаки порушення функції зовнішнього дихання і кисневої недостатності. На більш пізніх стадіях хвороби з'являються гістоморфологічні ознаки застійних явищ в малому колі кровообігу і набряку легенів. Введення мелатоніну людям, або тваринам з підвищеним артеріальним тиском може призвести до зміни стану РВЛ. Виникає потреба провести такі дослідження на тваринах з підвищеним артеріальним тиском.

Мета роботи — дослідити та порівняти вплив екзогенного мелатоніну на морфологічні та біохімічні показники функціонального стану структури РВЛ у нормо- та гіпертензивних щурів.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 48 щурах-самцях лінії Wistar та спонтанно-гіпертензивних щурах (лінія SHR) в осінній період року. На кінець експерименту вік тварин становив 4 місяці. Щурів розподілили на 4 групи: I і II — контрольні щури лінії Wistar та SHR відповідно; III і IV — тварини лінії Wistar та SHR, які отримували мелатонін. Щури контрольних та дослідних груп перебували в уніфікованих умовах зі стандартним раціоном харчування та природнім циклом світло / темрява. Препарат мелатонін (Unipharm Inc., США) щурам вводили перорально один раз на добу (о 10 годині ранку) в дозі 5 мг/кг маси тіла. Тривалість експерименту становила 28 діб. 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 діоксані. Отримані зразки заливали в парафін. Парафінові зрізи, завтовшки 5-6 мкм, виготовляли на санному мікроскопі. Забарвлення отриманих зрізів здійснювали оглядовими фарбниками: гематоксиліном Бемера та еозином. Для візуалізації елементів сполучної тканини застосовували методи дво- та триколіорового забарвлення по Ван-Гізоні, Массону 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 зразки легень гідролізували у 6 N розчині HCl. В отриманих екстрактах фотометрично визначали вміст оксипроліну методом окиснення 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 Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними серіями дослідів при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Респіраторний відділ легень (РВЛ) представлений респіраторними бронхіолами (РБ), альвеолярними ходами (АХ), альвеолярними мішечками (АМ) та альвеолами. На гістологічних зрізах неможливо чітко виявити 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 дослідних груп щурів просвіти РБ, АХ та АМ були вільними. Десквамації альвеолярного епітелію не відмічено.

Виявлено деякі відмінності в морфометричних показниках стану РВЛ між контрольними щурами різних ліній. Так, тварини лінії SHR мали вірогідно менший діаметр просвіту РБ, АХ і АМ (на 10 %), показник відношення діаметру РБ, АХ і АМ до подвійної глибини альвеоли (на 13 %) та більшу товщину міжальвеолярної перетинки (на 31 %) порівняно з щурами лінії Wistar (таблиця). Такі відмінності можуть бути пов'язані з наявністю артеріальної гіпертензії у щурів лінії SHR.

У щурів лінії Wistar, які зазнавали введення мелатоніну, спостерігали вірогідне зростання площі поперечного перерізу (на 14 %), середнього діаметру (на 14 %), глибини (на 15 %) та ширини входу в альвеолу (на 17 %) порівняно з контролем. Ширина просвіту РБ, АХ та АМ і товщина міжальвеолярної перетинки залишалися на рівні контрольних значень (таблиця). Тобто, введення мелатоніну збільшує загальну площу альвеолярної поверхні, повітряність альвеол, що сприяє активації процесів газообміну.

У дослідних щурів лінії SHR виявлено вірогідне зменшення товщини міжальвеолярної перетинки на 31 %, що може свідчити про зменшення кількості елементів сполучної тканини і покращення альвеолярно-капілярного обміну газів. У тварин цієї ж лінії спостерігали лише тенденцію до зростання середнього діаметру (на 6 %),

площі альвеол (на 8 %), ширини входу в альвеоли (на 7 %), діаметру просвіту РБ, АХ та АМ (на 3 %) порівняно з контролем (таблиця).

Таблиця

Морфометричні показники стану респіраторного відділу легень щурів контрольних та дослідних груп
($M \pm m$, $n = 12$)

Показники	Wistar		SHR	
	Контроль	Мелатонін	Контроль	Мелатонін
Середній діаметр просвіту альвеоли, мкм	25,30 ± 0,63	28,80 ± 0,81*	25,00 ± 0,95	26,40 ± 0,49
Глибина альвеоли, мкм	24,10 ± 0,89	27,70 ± 0,83*	25,40 ± 0,93	25,40 ± 0,95
Ширина входу в альвеолу, мкм	15,00 ± 0,51	17,50 ± 0,89*	14,70 ± 0,52	15,80 ± 0,61
Площа поперечного перерізу альвеоли, мкм ²	908,0 ± 28,3	1036,0 ± 20,7*	909,00 ± 33,12	982,00 ± 41,13
Ширина просвіту РБ, АХ та АМ, мкм	73,60 ± 2,79	71,1 ± 2,8	66,20 ± 1,13	67,90 ± 3,82
Товщина міжальвеолярної перетинки, мкм	5,20 ± 0,22	5,20 ± 0,44	6,80 ± 0,44	4,70 ± 0,25*
Відношення ширини входу в альвеолу до її глибини	0,62 ± 0,03	0,630 ± 0,036	0,59 ± 0,02	0,62 ± 0,04
Відношення діаметру РБ, АХ та АМ до подвійної глибини альвеоли	1,53 ± 0,06	1,28 ± 0,05*	1,33 ± 0,08	1,34 ± 0,09

Примітка. * — вірогідні відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$)

Складовою частиною всіх органів, у тому числі й легень, є сполучна тканина. У легеневій стромі переважають елементи механічного функціонування — колагенові та еластинові волокна. Після впливу мелатоніну в щурів лінії SHR, при забарвленні гістологічних препаратів легень по Ван-Гізону, Масону та Малорі [4], у РВЛ відмічали зменшення інтенсивності забарвлення елементів сполучної тканини. У щурів лінії Wistar такої різниці між контрольними і дослідними тваринами не виявлено. У обох групах дослідних тварин найбільшу кількість колагенових волокон виявляли навколо РБ, кровоносних судин, в меншій мірі — в міжальвеолярних перетинках.

Визначення концентрації оксипроліну, маркерної амінокислоти колагену, часто застосовують для аналізу

стану активності сполучної тканини в різних органах. Тенденцію до зниження вмісту загального оксипроліну в легенях виявили лише у дослідних щурів лінії SHR. Зниження вмісту загального оксипроліну може свідчити на порушення динамічної рівноваги між деструкцією та біосинтезом колагену. Такі зміни характеризують відносну перевагу процесів деградації колагену [6].

Зменшення частки сполучної тканини та зниження процесів фіброзу в легенях після впливу екзогенного мелатоніну спостерігали також інші науковці [13]. Показано, що введення мелатоніну (в дозі 4 мг/кг) зменшувало розростання сполучної тканини в легенях при штучно індукованому фіброзі [9, 14]. Zhou L. та співав. дослідили, що у мишей з хронічною бронхіальною астмою, після впливу мелатоніну, зменшилась сумарна площа колагенових фібрил [15]. Показано, що введення мелатоніну (4 мг/кг) щурам запобігає розвитку патологічних змін (переальвеолярний набряк, перебронхіальна та переваскулярна інфільтрації, потовщення міжальвеолярної перетинки) після впливу циклоспорину [10]. Можна вважати доведеним, що прийом мелатоніну в різних дозах зменшує пошкодження епітелію, запалення та товщину міжальвеолярних перетинок, попереджує розвиток бронхо-легеневої патології [16].

Висновки

1. Морфометричні показники стану респіраторного відділу легень у інтактних спонтанно-гіпертензивних щурів (лінія SHR) характеризувались вірогідно меншим діаметром просвіту РБ, АХ і АМ та більшою товщиною міжальвеолярної перетинки порівняно з нормотензивними тваринами лінії Wistar.

2. Введення екзогенного мелатоніну (в дозі 5 мг/кг, протягом 28-ми діб) щурам як лінії Wistar (в більшій мірі), так і лінії SHR (в меншій мірі) призводить до збільшення розмірів альвеол, глибини та ширини входу в них. Це може сприяти збільшенню сумарної площі альвеолярної поверхні.

3. Показано, що у щурів лінії SHR, після введення мелатоніну, зменшується товщина міжальвеолярної перетинки та вміст оксипроліну в легенях. Це може сприяти прискоренню дифузії кисню через альвеоло-капілярні мембрани.

ЛІТЕРАТУРА

- Анисимов ВН. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике. Санкт-Петербург: Система. 2007; 40 с.
- Березовський ВЯ, Янко РВ, Чака ОГ, та ін. Вплив екзогенного мелатоніну на структуру та стан сполучнотканинних елементів респіраторного відділу легень. Укр. пульмонолог. журн. 2015;(3):61–64.
- Вейбель ЭР. Морфометрия легких человека. Москва: Медицина. 1970; 175 с.
- Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит. 2010; 95 с.
- Кузнецова ТП, Прошина ЛЯ, Приваленко МН. Модификация определения оксипролина в сыворотке крови. Лабораторное дело. 1982;(8):8–10.
- Поливанов ТВ, Манчук ВТ. Морфофункциональные параметры коллагена в норме и патологии. Успехи современного естествознания. 2007;(2):25–30.
- Acuña-Castroviejo D, Carretero M, Doerrier C, et al. Melatonin protects lung mitochondria from aging. Age (Dordr). 2012;34(3):681–692.
- Farias 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.
- Karimfar M, Rostami S, Haghighi K, et al. Melatonin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Biol Regul Homeost Agents. 2015;29:327–334.
- Kuruş M, Eşrefoğlu M, Otlı A. An Experimental study of the histopathological effects of melatonin on cyclosporin induced lung damage. Turkish Thoracic J. 2008;8(1):1–6.

REFERENCES

- Anisimov VN. Melatonin: rol v organizme, primeneniye v klinike (Melatonin: the role in the body, use in the clinic). Sant-Petersburg: Sistema. 2007;40 p.
- Berezovsky VYa, Yanko RV, Chaka OH, et al. Vplyv ekzogennoho melatoninu na strukturu ta stan spoluchnotkannynnykh elementiv respiratornogo viddilu legen (Effect of exogenous melatonin on the structure and condition of connective tissue elements of the respiratory lung unit). Ukr. Pulmonol. Journal. 2015;(3):61–64.
- Veybel ER. Morfometriya legkikh cheloveka (Morphometry of the human lungs). Moscow: Meditsina. 1970;175 p.
- Korzhhevskiy DE, Gilyarov AV. Osnovy gistologicheskoy tekhniki (Fundamentals of histological technique). Sant-Petersburg: SpetsLit. 2010;95 p.
- Kuznetsova TP, Proshina LYa, Privalenko MN. Modifikatsiya opredeleniya oksiprolina v syvorotke krovi (Modification of the determination of hydroxyproline in serum). Laboratornoye delo. 1982;(8):8–10.
- Polivanov TV, Manchuk VT. Morfofunktsionalnyye parametry kollagena v norme i patologii (Morphofunctional parameters of collagen in norm and pathology). Uspekhii sovremennogo yestestvoznaniya. 2007;(2):25–30.
- Acuña-Castroviejo D, Carretero M, Doerrier C, et al. Melatonin protects lung mitochondria from aging. Age (Dordr). 2012;34(3):681–692.
- Farias 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.

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. Taslidere E, Esrefoglu M, Elbe H, et al. Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Lung Res*. 2014;40:59–65.
14. Yildirim Z, Kotuk M, Erdogan H, et al. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pineal Res*. 2006;40(1):27–33.
15. Zhou L, Qian ZX, Li F, et al. 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 He Hu Xi Za Zhi*. 2007;30(7):527–532.
16. Wei H, Zhiqiang M, Shuai J, et al. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? *J Pineal Res*. 2016;60(2):121–131.
9. Karimfar M, Rostami S, Haghani K, et al. Melatonin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biol Regul Homeost Agents*. 2015;29:327–334.
10. Kuruş M, Eşrefoğlu M, Otlı A. An Experimental study of the histopathological effects of melatonin on cyclosporin induced lung damage. *Turkish Thoracic J*. 2008;8(1):1–6.
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. Taslidere E, Esrefoglu M, Elbe H, et al. Protective effects of melatonin and quercetin on experimental lung injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Lung Res*. 2014;40:59–65.
14. Yildirim Z, Kotuk M, Erdogan H, et al. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pineal Res*. 2006;40(1):27–33.
15. Zhou L, Qian ZX, Li F, et al. 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 He Hu Xi Za Zhi*. 2007;30(7):527–532.
16. Wei H, Zhiqiang M, Shuai J, et al. Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis? *J Pineal Res*. 2016;60(2):121–131.